

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
Институт Функциональной Геномики МГУ  
НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ

---

*На правах рукописи*

**Аверина Ольга Александровна**

**Изучение физиологической роли нового митохондриального белка  
Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом**

1.5.3. Молекулярная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., член-корр. РАН Сергиев П.В.

к.б.н., доцент Высоких М.Ю.

Москва – 2023

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность проблемы.....	5
Степень разработанности темы.....	5
Цели и задачи исследования.....	6
Объект исследования.....	6
Предмет исследования.....	6
Научная новизна исследования.....	6
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	7
Методология диссертационного исследования.....	7
Основные положения, выносимые на защиту.....	8
Степень достоверности и апробация результатов.....	9
Личный вклад автора.....	10
Структура и объем диссертации.....	10
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
§1. Специфика CRISPR/Cas опосредованного редактирования генома.....	11
Эндонуклеазная система редактирования генома CRISPR/Cas.....	11
Разрывы ДНК.....	23
Ингибиторы NHEJ.....	26
Регуляция ключевых факторов HDR пути.....	30
Контроль клеточного цикла.....	33
Статус хроматина.....	34
ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации.....	36
Редактирование оснований.....	40
Праймированное редактирование.....	59
Пути эффективной доставки конструкций для редактирования генома.....	65
Заключение по §1 главы 1.....	73
§2. Митохондриальные микропептиды.....	74

Длинные некодирующие РНК.....	74
Короткие открытые рамки считывания.....	75
Микропептиды.....	76
Микропептиды митохондриального происхождения .....	78
Митохондриальные микропептиды, кодируемые ядерным геномом .....	80
Миторегулин .....	81
Заключение по §2 главы 1.....	86
§3. Митохондриальные заболеваний, вызванные мутациями в ядерных генах, к которым разработаны соответствующие животные модели .....	87
Митохондриальные расстройства.....	87
Дефицит митохондриального комплекса I, вызванного мутациями ядерной ДНК ....	88
Животные модели митохондриальных расстройств .....	90
Сводная таблица животных моделей митохондриальных заболеваний человека, вызванных мутациями в ядерных генах.....	93
Заключение по §3 главы 1.....	110
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ.....	112
Источник получения инбредных линий.....	112
Содержание животных .....	112
Конструирование генетических редакторов PE2 и трансфекторов Cas9 .....	112
Создание и идентификация <i>ΔMiln</i> мышей.....	114
Мониторинг набора веса .....	116
Оценка скорости клубочковой фильтрации.....	117
Тест силомер.....	117
Магнитно-резонансная томография (МРТ).....	117
Эвтаназия.....	118
Критерии для эвтаназии животных по соображениям гуманности .....	118
Измерение электростимулированного сокращения мышц .....	119
Гистологический анализ.....	120
Анализ метаболитов сыворотки крови .....	121

Выделение митохондрий исследуемых тканей .....	123
Анализ эффективности дыхания митохондрий.....	123
Оценка активности креатинкиназы и анализ олигомеризации митохондриальной креатинкиназы.....	123
Анализ липидов.....	124
Реализация иммуноблотинга .....	126
Проведение количественной ПЦР .....	126
Анализ данных .....	126
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ .....	127
§1. Исследование новых подходов усовершенствования технологии создания мышей с измененным геномом.....	127
Сравнительный анализ эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей.....	127
Сравнительный анализ стратегий получения крупных жизнеспособных помётов мышей с измененным геномом .....	140
§2. Исследование на мышинной модели фенотипических, физиологических и биохимических последствий нокаута гена <i>1500011k16Rik</i> , кодирующего митохондриальный белок Mtlн .....	150
Исследование влияния митохондриального пептида Mtlн на окислительный метаболизм мышей.....	153
Исследование функциональной роли Mtlн в скелетных мышцах.....	163
Исследование влияния митохондриального пептида Mtlн на функцию почек мышей .....	174
Обсуждение.....	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ и ВЫВОДЫ.....	190
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	191
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	195

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Митохондриальные расстройства – крайне гетерогенная группа наследственных заболеваний, связанных с мутациями в генах, кодируемых мтДНК или яДНК. В то время как патогенные мутации митохондриальных генов, кодируемых яДНК затрагивают все митохондриальные процессы, мутации митохондриального генома приводят к нарушениям дыхания и окислительного фосфорилирования. Данный спектр митопатологий характеризуется высокой вариабельностью и перекрывающимися клиническими проявлениями, что часто крайне затрудняет постановку диагноза. Поскольку многие из этих заболеваний проявляются уже в младенчестве или в раннем детском возрасте и приводят к летальному исходу, остро стоят задачи фенотипирования митохондриальных мутаций и выявления механизмов, приводящих к их проявлению на уровне целого организма. Особенно важно описать мутации в генах, кодирующих неизвестные и/или малоизученные митохондриальные белки, для которых еще не был выявлен клинический случай. Тогда, при обнаружении у пациента мутации в этом гене, уже будет известен спектр возможных физиологических изменений, которые можно будет диагностировать на ранних стадиях, что, как известно, часто определяет успешность терапии. Репрезентативным модельным животным объектом исследований генетических митопатологий считаются мыши с направленным изменением генома. Поэтому создание мышей с мутациями в генах, кодирующих новые малоизученные митохондриальные белки, и изучение их физиологической роли в развитии митопатологий является актуальной задачей как фундаментальных, так и прикладных исследований в области биомедицины.

### Степень разработанности темы

Исследуемый в данной работе митохондриальный белок Миторегулин (Mtlн) относится к недавно идентифицированному классу биологически активных молекул, кодируемых небольшими открытыми рамками считывания [1; 2; 3]. В международных публикациях существует консенсус об участии Mtlн в контроле дыхания митохондрий, однако конкретные данные противоречивы [4; 5; 6; 7; 8]. Представлен ряд возможных физиологических ролей Mtlн, а именно: i) участие в ассоциации дыхательных комплексов [8]; ii) взаимодействие с цитохром b5 редуктазой 3 (CYB5R3), влияющее на состав липидов [4]; iii) активация  $\beta$ -окисления жирных кислот [6; 7]; iv) взаимодействие с АТР-синтазой [6]. Такие фенотипические проявления нокаута по гену, кодирующего Mtlн, как изменение мышечной силы и выносливости, также носят разнонаправленный характер [5; 7; 8], как и в случае оценки массы тела и накопления жировой ткани [6; 5; 7; 9]. Поэтому в связи с неоднозначными данными по функциям Mtlн, была поставлена цель исследовать на мышинной модели фенотипические, физиологические и

биохимические последствия нокаута гена *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок MtlN.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящей работы является изучение физиологической роли нового митохондриального белка Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Сравнительный анализ и подбор оптимальных технологий и условий для создания мутантных мышей.
2. Подробное фенотипирование мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*.

### **Объект исследования**

Объектом исследования в настоящей работе является белок MtlN, кодируемый геном *1500011k16Rik*. Этот белок состоит из 56 аминокислот и локализован в межмембранном пространстве митохондрий, содержит один гидрофобный сегмент, предположительно трансмембранный, расположенный вблизи его N-конца и положительно заряженную C-концевую часть. MtlN консервативен у позвоночных.

### **Предмет исследования**

Предметом исследования данной работы является физиологическая роль белка MtlN в функционировании целого организма – лабораторной мыши *Mus musculus*.

### **Научная новизна исследования**

В данной работе впервые было показано, что на фоне высокожировой диеты в течение 19-недельного периода у мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок MtlN, наблюдается чрезмерное увеличение массы тела за счет накопления жира. С учетом полученных данных по концентрации сывороточных ацилкарнитинов и жирных кислот, а также о значительном повышении в сыворотке крови уровня триглицеридов, можно судить о влиянии пептида MtlN на бета-окисление жирных кислот.

Результаты гистопатологического анализа мышц и измерение параметров дыхания мышечных митохондрий подтвердили данные о зависимости нормального функционирования мышц от активности MtlN.

Проведённые исследования связи уровня митохондриального липида кардиолипина, необходимого для функционирования дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы, с активностью белка MtlN, дают возможность предполагать участие MtlN в защите кардиолипина, помимо Суb5r3-опосредованной протекции.

В дополнение предыдущих исследований, указывающих на влияние белка Mtlп на функционирование почек, в ходе данной работы было продемонстрировано, что снижение экспрессии гена *1500011k16Rik* вызывает возрастные патологические изменения в почках, представляющие угрозу жизни.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Использование животных моделей при анализе последствий мутаций в генах, кодирующих малоизученные митохондриальные белки, связанные с функционированием митохондрий, позволяет получать не только новые фундаментальные знания об физиологической роли таких белков, но и важную информацию о механизмах митохондриальных нарушений у человека.

Хотя всего десять лет назад область генома, кодирующая митохондриальный пептид Mtlп, рассматривались как некодирующая, сегодня стало понятно, что мутации в этом гене приводят к митохондриальным расстройствам.

В связи с этим, в настоящем исследовании был проведен анализ физиологических функций ядерно-кодируемого белка Mtlп.

Представленные в данной работе результаты исследования роли Mtlп в физиологии лабораторной мыши позволяют не только охарактеризовать функции нового малоизученного белка, но и предоставляют сценарий возможной клинической картины при мутации гена LINC00116, кодирующего данный белок у человека.

### **Методология диссертационного исследования**

В настоящей работе был использован ряд современных методов и подходов, соответствующих мировым стандартам проведения подобного рода исследований. Все манипуляции с животными объектами проводились в соответствии с требованиями регламентирующей документации FELASA Working Group, 2007 и были утверждены локальной комиссией по биоэтике.

Для решения задачи оптимизации технологии создания мутантных мышей были исследованы современные технологии редактирования генома на основе CRISPR/Cas, а именно - гомологичная рекомбинация с использованием различных вариаций ДНК-матриц и технология праймированного редактирования второго поколения. Параллельно был произведен анализ последних подходов к трансфекции при генетическом редактировании путем микроинъекции мРНК Cas9, мРНК Cas9-mSA или белка Cas9. Также в протокол подготовки эмбрионов для микроинъекций генетическими редакторами был введен недавно разработанный подход гормональной стимуляции самок-доноров зигот с использованием антител к ингибину.

В экспериментах с использованием животных объектов были задействованы современные неинвазивные методы исследования, такие как миниатюрный флуоресцентный детектор для

прижизненного анализа функциональной активности почек и магнитно-резонансная томография.

При патоморфологическом анализе органов использовались как классические методы (окрашивание срезов гематоксилином и эозином), так и инновационные подходы - такие как окрашивание трихромом по Гомори для выявления миофибрилл с признаками митохондриальных аномалий и метод окрашивания бета-галактозидазоположительных стареющих клеток.

Исследование метаболитов сыворотки крови мышей осуществляли методами биохимического и ЯМР анализа, тандемной масс-спектрометрии со стандартами, содержащими стабильные изотопы или газохроматографии/масс-спектрометрии, а для выделения жирных кислот использовали метод экстракции Фолча (Folch).

В работе было произведено разностороннее исследование выделенных митохондрий, включающее: полярографический анализ дыхания, исследование липидного состава методом тонкослойной хроматографии, спектрофотометрическое определение активности креатинкиназы, определение соотношения октамер/димер креатинкиназы с использованием электрофореза в целлюлозо-полиацетатном геле.

Так же в ходе выполнения задач исследования были задействованы технологии иммуноблотинга и количественной ПЦР.

Все полученные результаты прошли детальный статистический анализ.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Оптимальным выбором технологии целевого редактирования генома мышей является подход eгРНК-направленного расщепления ДНК-мишени Cas9, при последующей гомологичной рекомбинации с использованием матрицы оцДНК.
2. Для получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом необходимо учитывать условия гормональной стимуляции самок-доноров эмбрионов для микроинъекции генетической конструкции, а также характеристики линий мышей самок-доноров эмбрионов и суррогатных матерей.
3. Патологические состояния почечной и мышечной тканей мышей, опосредованные дисфункцией митохондриального белка Mtlн, связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи.
4. Митохондриальный белок Mtlн у мышей влияет на бета-окисление жирных кислот, обеспечивает сохранность пула кардиолипина, необходимого для функционирования первого комплекса дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы.



## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими российскими и мировыми компаниями.

Результаты диссертационной работы представлены на заседании ученого совета НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета и на заседании ученого совета Института функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова.

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

1. **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Guseva EA, Grigoryeva OO, Lovat ML, Egorova AE, Grinchenko AV, Kumeiko VV, Marey MV, Manskikh VN, Dontsova OA, Vysokikh MY, Sergiev PV. “Kidney-Related Function of Mitochondrial Protein Mitoregulin” // *International journal of molecular sciences* (2023) May 22;24(10):9106. **IF 5.6** (Web of Science), doi: [10.3390/ijms24109106](https://doi.org/10.3390/ijms24109106).
2. **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Grigoryeva OO, Lovat ML, Egorova AE, Grinchenko AV, Kumeiko VV, Marey MV, Manskikh VN, Dontsova OA, Vysokikh MY, Sergiev PV. “Mitoregulin Contributes to Creatine Shuttling and Cardiolipin Protection in Mice Muscle” // *International journal of molecular sciences* (2023) Apr 20;24(8):7589. **IF 5.6** (Web of Science), doi: [10.3390/ijms24087589](https://doi.org/10.3390/ijms24087589).
3. **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Grigoryeva OO, Gulyaev MV, Pavlova OS, Mariasina SS, Frolova OY, Kurkina MV, Baydakova GV, Zakharova EY, Marey MV, Tsarev DA, Tashlitsky VN, Popov VS, Lovat ML, Polshakov VI, Vysokikh MY, Sergiev PV. “Mitochondrial peptide Mtlm contributes to oxidative metabolism in mice” // *Biochimie* (2023) Jan;204:136-139. **IF 3.9** (Web of Science), doi: [10.1016/j.biochi.2022.09.009](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.09.009).
4. **Averina OA**, Permyakov OA, Grigorieva OO, Starshin AS, Mazur AM, Prokhortchouk EB, Dontsova OA, Sergiev PV. “Comparative Analysis of Genome Editors Efficiency on a Model of Mice Zygotes Microinjection” // *International journal of molecular sciences* (2021) Sep 23;22(19):10221. **IF 5.6** (Web of Science), doi: [10.3390/ijms221910221](https://doi.org/10.3390/ijms221910221).
5. **Averina OA**, Vysokikh MY, Permyakov OA, Sergiev PV. “Simple Recommendations for Improving Efficiency in Generating Genome-Edited Mice” // *Acta Naturae* (2020) Jan-Mar;12(1):42-50. **IF 2** (Web of Science), doi: [10.32607/actanaturae.10937](https://doi.org/10.32607/actanaturae.10937).

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора в проведенное исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении основных экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, в написании научных публикаций по теме диссертации. Во всех работах по теме диссертации, опубликованных в соавторстве [644; 645; 646; 268; 287], основополагающий вклад принадлежит соискателю, а также анализ и статистический обсчет полученных данных, все манипуляции с лабораторными грызунами, в частности создание мутантных линий мышей, проведение поведенческих и физиологических тестов, взвешивание и оценка общего состояния животных, отбор биологических материалов, хирургические процедуры и некропсия были произведены лично Авериной Ольгой Александровной. В том числе в исследовании функционирования мышц мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik* [645], Ольга Александровна проводила оценку работоспособности изолированных мышц при электростимулированном сокращении *ex vivo*, а в исследовании функционирования почек мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik* – оценку клубочковой фильтрации с помощью трансдермального датчика [644]. Так же в данных двух работах [644; 645] Аверина О.А. осуществляла фракционирования митохондрий исследуемых органов, оценку митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, определение активности, количества и степени олигомеризации митохондриальной креатинкиназы, содержание кардиолипина и монолизокардиолипина в изолированных митохондриях. При сравнительном анализе эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей Ольга Александровна проводила все манипуляции с мышинными эмбрионами, описанные в публикации [268].

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 236 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список сокращений, библиографический список. Материал иллюстрирован 43 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 646 процитированных работ.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### §1. Специфика CRISPR/Cas опосредованного редактирования генома

За последнее десятилетие были разработаны новые методы и процедуры создания мутантных мышей для исследования функций малоизученных белков и моделирования заболеваний человека. Инструменты редактирования генома, такие как технологии на основе CRISPR/Cas создают сайт-специфические повреждения ДНК, которые редактируются посредством подверженной ошибкам или безошибочной репарации, прямого изменения последовательности нуклеотидов целевого участка генома, что приводит к мутагенезу ДНК или замене целевых геномных последовательностей. В зависимости от своих отличительных особенностей редакторы генома обладают различными сильными и слабыми сторонами, которые необходимо детально исследовать и учитывать при создании мышей с измененным геномом.

### Эндонуклеазная система редактирования генома CRISPR/Cas

Изначально в природе CRISPR/Cas — это прокариотическая адаптивная защитная система, нацеленная на чужеродные генетические элементы вторгшихся фагов. Главным компонентом системы CRISPR/Cas является белок Cas, расщепляющий нуклеиновую кислоту атакующих фагов, тем самым дезактивируя их. Специфичность в отношении целевого участка нуклеиновой кислоты фагов достигается за счет малых некодирующих РНК, известных как гРНК, которые составляют клеточную память о прошлых инфекциях. Гидовая РНК представляет собой две молекулы РНК, одна из которых crРНК, содержащая варибельную спейсерную последовательность, которая направляет Cas в гомологичную целевую область протоспейсера в геноме инфекционных элементов, а вторая tracrРНК служит каркасом для связывания с Cas.

Этот механизм лег в основу системы редактирования генома CRISPR/Cas для изучения функций генов, создания мутантных клеточных линий и животных, диагностики и терапии различных заболеваний.

CRISPR-системы подразделяют на два класса, в зависимости от архитектуры их эффекторных комплексов, и в каждом выделяют по 3 типа (*Таблица 1.*) [10]:

- ✓ в системах первого класса несколько белковых единиц образуют эффекторный комплекс с crРНК для распознавания и расщепления целевой последовательности.
- ✓ системы второго класса состоят из односубъединичных эффекторных нуклеаз с разнообразными функциональными свойствами.

Для создания мутантных животных наиболее широко используют систему CRISPR/Cas9 второго класса подтипа II-A *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), поскольку она относительно просто устроена и хорошо изучена [11]. Для адресации Cas9 на целевой участок генома в некоторых исследованиях используют гРНК с отдельными компонентами crРНК и tracrРНК. Этот вариант хорош, когда необходимо одновременно использовать множество различных crРНК, сочетаемых с одной tracrРНК. Для единичного разрезания более удобно использовать egРНК, где специально разработанная короткая последовательность crРНК связана линкерной петлей (тетрапетля) с каркасной последовательностью tracrРНК (*Рисунок 1.*) [12]. В итоге egРНК стала наиболее популярным форматом направляющих РНК, поэтому термины egРНК и гРНК часто начали использовать в сообществе CRISPR в одном и том же значении. Для более эффективного использования и повышения стабильности по отношению к нуклеазной деградации, crРНК и tracrРНК могут быть химически синтезированы с введением химических модификаций. В недавнем обзоре «Руководство по модификации гРНК как способу улучшения систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas9» подробно описаны стратегии создания искусственных гРНК с различными модифицированными компонентами, такими как изменения остова, нативные структурные мотивы и метки для визуализации. Описаны различные подходы к улучшению функции синтетической направляющей РНК посредством модификации нуклеотидов (*Рисунок 1.*) [13]. Химические модификации компонентов гидовой РНК могут повышать ее устойчивость к гидролизу, изменять термодинамическую стабильность комплексов РНК-белок и РНК-ДНК, снижать иммуногенный и цитотоксический эффекты. В целом, можно проводить широкомасштабные химические модификации, подвергая изменениям около 70% нуклеотидов, при этом избегая модификации 2'ОН и фосфатных групп в egРНК, которые взаимодействуют с белком Cas9. В итоге, в среднем химически модифицированные направляющие РНК сохраняют высокую специфичность [14; 15]. При этом, неудачный дизайн egРНК может привести к более низкой специфичности и более высокому проценту нецелевых мутаций. Так, например, усечение с 5'-конца egРНК (2-3 п.н.) значительно снижает количество нецелевых мутаций при сохранении эффективности, но если egРНК укоротить до 16 нуклеотидов или менее, её активность резко падает, как и при усечении с 3'-конца или добавлении на 5'-конце (-GG) [16]. Чтобы избежать неудачного дизайна, egРНК необходимо точно спроектировать с помощью вычислительных инструментов, таких как CRISPR-P 2.0, E-CRISP и CasFinder [17]. Таким образом, оптимальный дизайн направляющей РНК является ключом к CRISPR/Cas-опосредованному точному редактированию генома.

Впервые система CRISPR/Cas9 была применена в 2013 году в клетках млекопитающих для локального редактирования генома. Сейчас использование CRISPR/Cas9 позволяет создавать животные модели с точечными мутациями, добавлением или удалением нескольких

нуклеотидов без добавления иных генетических элементов вблизи места редактирования, например маркеров для селекции клеток по чувствительности к препарату в культуральной среде, и рекомбинантных элементов, таких как loxP или FRT сайты [18]. После внедрения системы CRISPR/Cas9 стало возможным создание мутантных мышей на генетических фонах, ранее недоступных для редактирования генома с использованием более ранних подходов, например, иммунодефицитной линии NOD/Scid-ILgamma (NSG) [19]. А также CRISPR/Cas9 была адаптирована для биаллельного редактирования в разных локусах и создания мышей с мутациями в двух генах [20; 21; 22; 23]. Прямое сравнение системы редактирования генома CRISPR/Cas с предыдущими платформами такими как HE, ZFN, TALEN (*Рисунок 2.*) и методами ES, ясно показывает, что CRISPR/Cas обладает рядом преимуществ, таких как более высокая эффективность, простота использования, относительно низкая стоимость, компактность и т. д. [18].

Благодаря высокой эффективности SpCas9, стало возможным идентифицировать потенциально важные гены с помощью полногеномного функционального скрининга. Так, задействовав лентивирусные гРНК для генерации большого количества нокаутных клеток, после положительного и отрицательного скрининга, можно идентифицировать важные гены и мишени для лекарств [24; 25; 26].

Таблица 1. Классификация и организация системы CRISPR/Cas.

Класс	Тип	Подтип	Гены, связанные с белками Cas	Организация оперонов для типа Cas в зависимости от вида бактерий
Класс 1	Тип 1	I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F, I-U	Cas1, Cas2, Cas3 <sup>1</sup> , Cas3 <sup>2</sup> , Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8/LS	I-A: <i>Archaeoglobus fulgidus</i> I-B: <i>Clostridium kluyveri</i> I-C: <i>Bacillus halodurans</i> I-D: <i>Cyanothece</i> sp. I-E: <i>Escherichia coli</i> K12 I-F: <i>Yersinia pseudo-tuberculosis</i> I-U: <i>Geobacter sulfurreducens</i>
				III-A: <i>Staphylococcus epidermidis</i> III-B: <i>Pyrococcus furiosus</i> III-C: <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> III-D: <i>Synechocystis</i> sp.
	Тип 3	III-A, III-B, III-C, III-D	Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7, Cas9, Cas10, SS	IV: <i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix
	Тип 4		Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7, SS	
Класс 2	Тип 2	II-A, II-B, II-C	Cas1, Cas2, Cas4, Cas9, RnaseIII, Csn	II-A: <i>Streptococcus pyogenes</i> II-B: <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris II-C: <i>Neisseria lactamica</i> 020-06
				V-A: <i>Francisella</i> cf. <i>novicida</i> Fx1 V-B: <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> V-C: <i>Oleiphilus</i> sp. V-D: <i>Bacterium</i> CG09_39_24 V-E: <i>Delta</i> proteobacteria bacterium
	Тип 5	V-A, V-B, V-C, V-D, V-E	Cas1, Cas2, Cas4, Cas12	VI-A: <i>Leptotrichia shahii</i> VI-C: <i>Fusobacterium prefoetens</i> VI-B1: <i>Prevotella buccae</i> VI-B2: <i>Bergeyellazooheicum</i>
	Тип 6	VI-A, VI-C, VI-B1, VI-B2	Cas1, Cas2, Cas13	

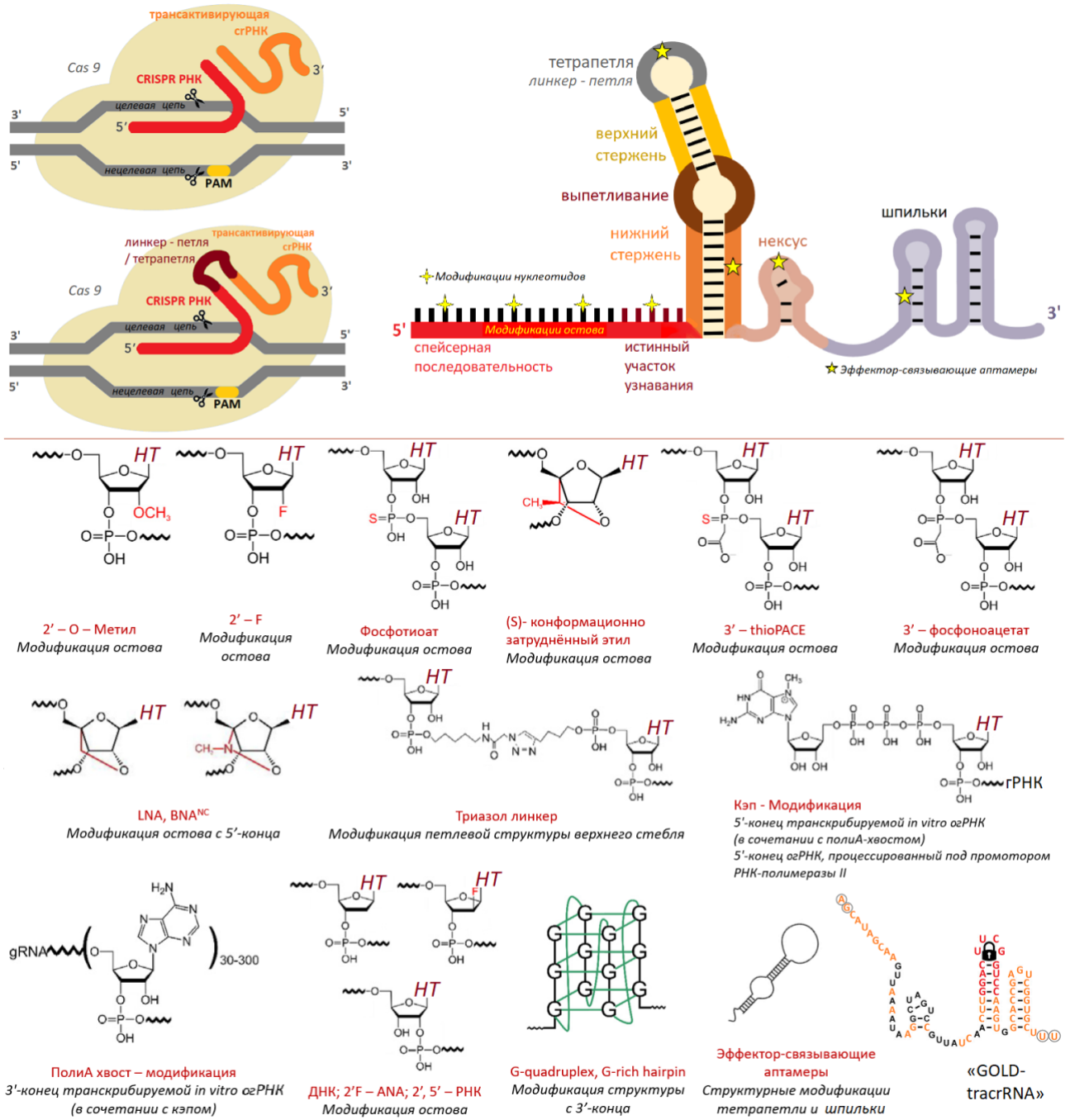


Рисунок 1. Структура и вариации гидовой РНК.

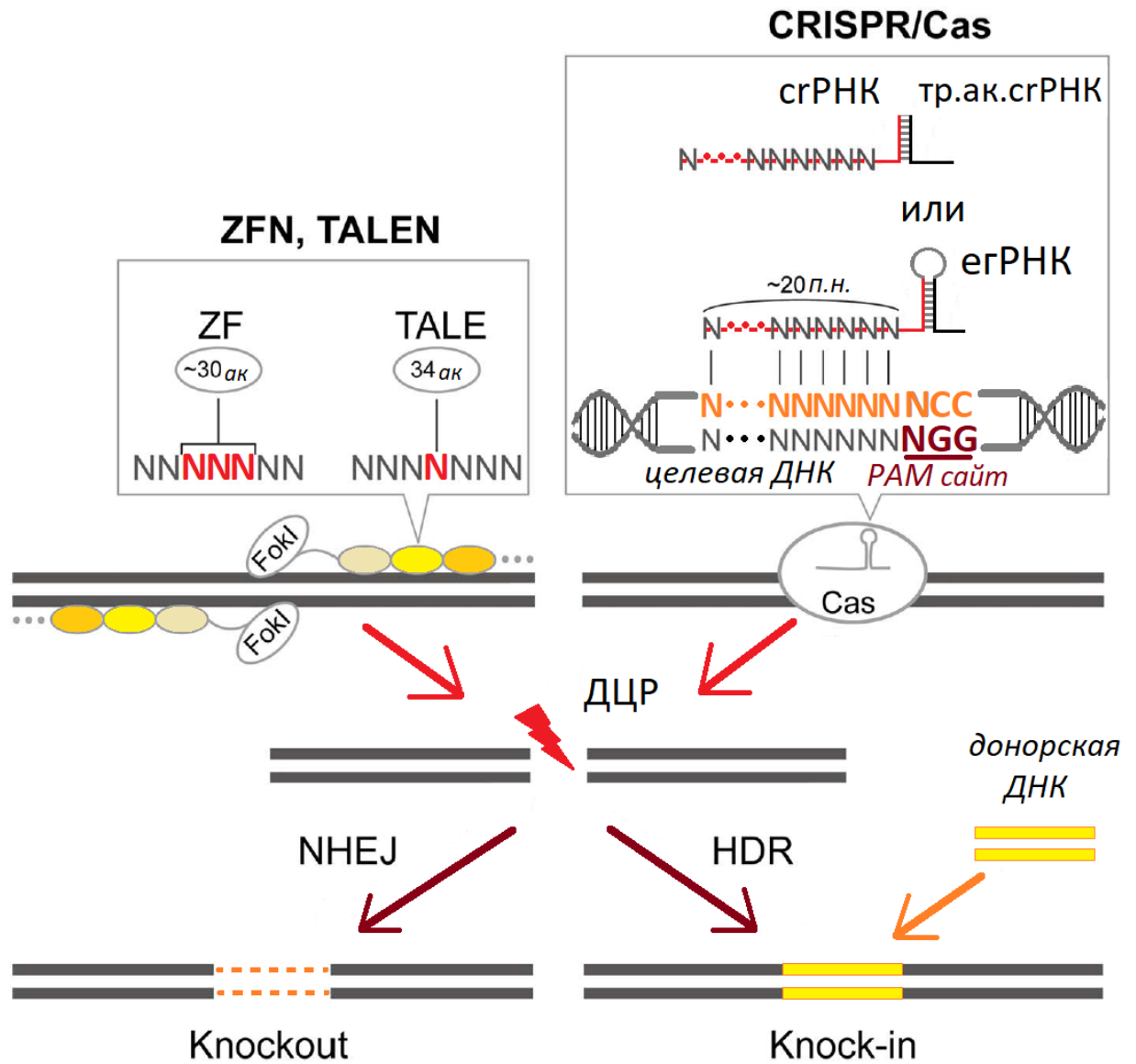


Рисунок 2. Эндонуклеазные системы редактирования генома ZFN, TALEN, CRISPR.



Несмотря на то, что SpCas9 проявил себя мощным и универсальным инструментом генной инженерии, совершившим революцию в биологических и биомедицинских исследованиях, этот метод имеет ряд ограничений и иногда может создавать нежелательные ДЦР в нецелевом геномном локусе [27]. Специфичность расщепления ДНК определяется структурой Cas9, комплементарностью гРНК к ДНК и наличием последовательности PAM, прилегающей к целевой последовательности (Рисунок 3.). Однако гибридизация допускает несоответствие между гРНК и ДНК [28], или доступности и распознавания сайтов PAM, так как SpCas9 может принимать последовательности PAM, отличные от 5'-NGG-3', но со значительно более низкой эффективностью расщепления, такой как 5'-NAG-3' [29]. Другим фактором может стать количество ошибок спаривания оснований, когда при возникновении двух и более ошибок активность эндонуклеазы падает [30]. Логично, что после возникновения незапланированных ДЦР могут возникнуть случайные мутации вследствие запуска самого естественного, но подверженного ошибкам пути восстановления ДНК – негомологичного соединения концов [31]. Эти нежелательные нецелевые ДЦР также могут привести к аномалиям хромосомного масштаба [32]. При работе с Cas9 наблюдались непреднамеренные крупные делеции в масштабе тысяч пар нуклеотидов, нацеленные на различные локусы в разных хромосомах, которые вызывают большую интерстициальную «потерю гетерозиготности» [33; 34; 35]. Самое опасное, что такие непредвиденные большие делеции трудно обнаружить с помощью классических методов скрининга. Были описаны случаи обнаружения делеции в 5,2 т.п.н. с помощью количественной ПЦР и флуоресцентной гибридизации *in situ* [34], и от 100 п.н. до 9,5 т.п.н. с помощью технологии ПЦР длинных фрагментов [36].

Среди несовершенств SpCas9 также рассматривают и большой размер, что ограничивает выбор вирусных векторов для доставки (емкость AAV приблизительно 4,7 т.п.н., а SpCas9 вместе с гРНК около 4,2 т.п.н.) [37], а препятствиями для распространения технологии в клиническом применении называют иммуногенность, отсутствие безопасной и эффективной системы доставки к мишени, нецелевые разрезания и этические проблемы [38].

Для решения обозначенных проблем был разработан целый ряд систем и технологий.

Во-первых, была разработана серия высокоточных вариантов SpCas9: eSpCas9 1.0 & 1.1, SpCas9-HF1, НураCas9, Sniper-Cas9, SpG-HF1, SpRY-HF1, HiFi-iSpyMac и вариантов способных распознавать широкий спектр последовательностей PAM: SpCas9-EQR/ VQR/ VRER/ VRQR/ NRRH/ NRCH/ NRTH, xCas9 [39], среди которых варианты SpG, SpRY, iSpyMac-Cas9 почти полностью устраняют ограничения PAM [40]. Во-вторых, в качестве альтернативы SpCas9 можно использовать нуклеазы SaCas9 и CjCas9, которые проявляют сниженную нецелевую нуклеазную активность, поскольку распознают более длинные PAM, 5'-NNGRRT-3' и 5'-NNNRYAC-3', соответственно [41], или варианты Cas10 и Cas14, которым вообще не

требуется последовательность PAM [42]. Мутантный вариант *Acidaminococcus* Cas12a - E174R/S542R/K548R, распознает различные PAM, включая 5'-TTYN-3', 5'-VTTV-3', и 5'-TRTV-3', а другие мутанты AsCas12a - RR и RVR распознают TYCV и 5'-TATV-3' PAM соответственно [43]. Кроме того, мутации G532R/K595R были введены в *Lachnospiraceae* Cas12a для создания варианта LbCas12a-RR, который распознает 5'-TYCV-3' PAM, расширяя область нацеливания [44]. В-третьих, несмотря на то, что ДЦР и последующая репарация ДНК считается краеугольным камнем направленного редактирования генома, уже понятно, что этот путь может привести к хромосомным транслокациям, нецелевым и неконтролируемым мутациям. Из-за ненадежности этой технологии, были разработаны дополнительные инструменты редактирования генов, которые не используют генерацию ДЦР. Cas9 использует два нуклеазных домена для образования ДЦР: расщепляющий цепь, на которую направлена гРНК, и расщепляющий нецелевую цепь ДНК. Инактивация любого из доменов приводит к образованию nCas9, осуществляющий расщепление только одной из цепей ДНК [45; 12], в то время как инактивация обоих нуклеазных доменов приводит к образованию dCas9 [46]. Никазы Cas9 со способностью к одноцепочечному расщеплению и каталитически мертвые варианты Cas9 без способности к расщеплению составляют строительные блоки редакторов генома без ДЦР. Эти каталитически поврежденные нуклеазы образуют системы с другими функциональными молекулами для создания дополнительных инструментов, таких как редакторы оснований и праймированные редакторы. В последующих поколениях генетических редакторов белок dCas был объединен с белками-регуляторами транскрипции или ферментами, модифицирующими хроматин, чтобы регулировать только уровень транскрипции без необратимого изменения генома, что привело к созданию систем интерференции и активации CRISPR. В системах CRISPRi репрессор KRAB (Krüppel-associated box), объединенный с dCas9, взаимодействует с образующими гетерохроматин комплексами, которые могут индуцировать метилирование и деацетилирование гистонов для ингибирования связывания РНК-полимераз с энхансерными или промоторными областями, инактивируя транскрипцию [47]. Напротив, системы CRISPRa способствуют транскрипции с помощью доменов активации VP16 или более эффективных *in vivo* VP64 и VP192, путем взаимодействия с TATA-связывающим белком, TFIIB и гистон-ацетилазой SAGA [48; 49]. Технологии CRISPRi и CRISPRa предлагают использовать в генетическом скрининге, для иммунотерапевтического лечения опухолей и перепрограммирования плюрипотентных стволовых клеток [50; 51; 52]. Возможность устойчивой наследуемой модификации метилирования ДНК, подавляющей транскрипцию генов, может обеспечить временная экспрессия эпигенетического редактора CRISPRoff, созданного путем слияния dCas9 с KRAB и DNMT3A (ДНК [цитозин-5]-метилтрансфераза 3A). Ранее было показано, что dCas9-DNMT3A может индуцировать сайт-специфическое

метилирование CpG, приводящее к сайленсингу транскрипции. CRISPRoff может найти свое применение в скрининге генома, клеточной инженерии, подавлении энхансеров и генетическом механизме эпигенетической модификации [53]. В-четвертых, уменьшить нецелевые эффекты CRISPR/Cas9 можно за счет снижения чрезмерной и длительной экспрессии этой системы. Для этого используют естественный защитный механизм фагов от CRISPR/Cas-опосредованного иммунитета бактерий, а именно белки Acr, нацеленные на нуклеазы Cas. В общей сложности идентифицировано 44 белка Acr для CRISPR/Cas типа I, II и V, но не для подтипа II-B и типа VI [54]. Acr-опосредованное ингибирование может быть достигнуто с помощью трех механизмов: ингибирование связывания Cas9 с ДНК, вмешательство в связывание Cas9 с gРНК и блокирование активности Cas9 [55; 56]. В настоящее время в качестве инструментов для уменьшения нецелевых эффектов используются только AcrIIA2 и AcrIIA4. Конкурируя с сайтом PAM и/или другими участками ДНК за Cas9, белки Acr блокируют расщепляющую активность Cas9, предотвращая чрезмерную и длительную активацию CRISPR/Cas9 и, таким образом, уменьшая нецелевые эффекты [57].

В качестве ухода от проблемы большого размера SpCas9 используют ее ортологи, некоторые из которых достаточно малы, чтобы их можно было легче упаковать в вирусные векторы, однако необходимо учитывать архитектуру нуклеаз, разнообразие необходимых последовательностей PAM и относительную эффективность редактирования. Например, CjCas9 размером 2,95 т.п.н., SaCas9 - 3,16 т.п.н., CasX (Cas12e) - 2,94 т.п.н., Cas14 - 2,85 т.п.н., а Cas13d – 2,79 т.п.н., и даже более крупный Cas12a размером 3,6–3,9 т.п.н. можно упаковать в аденоассоциированные вирусные векторы [58; 59; 60; 61].

Значительные успехи применения системы CRISPR/Cas9 в редактировании генома экспериментальных объектов дали толчок в исследованиях других систем CRISPR/Cas для достижения потенциально более высокой эффективности редактирования и новых приложений. Двумя наиболее изученными белками Cas после Cas9 являются Cas12 и Cas13 (Рисунок 3.).

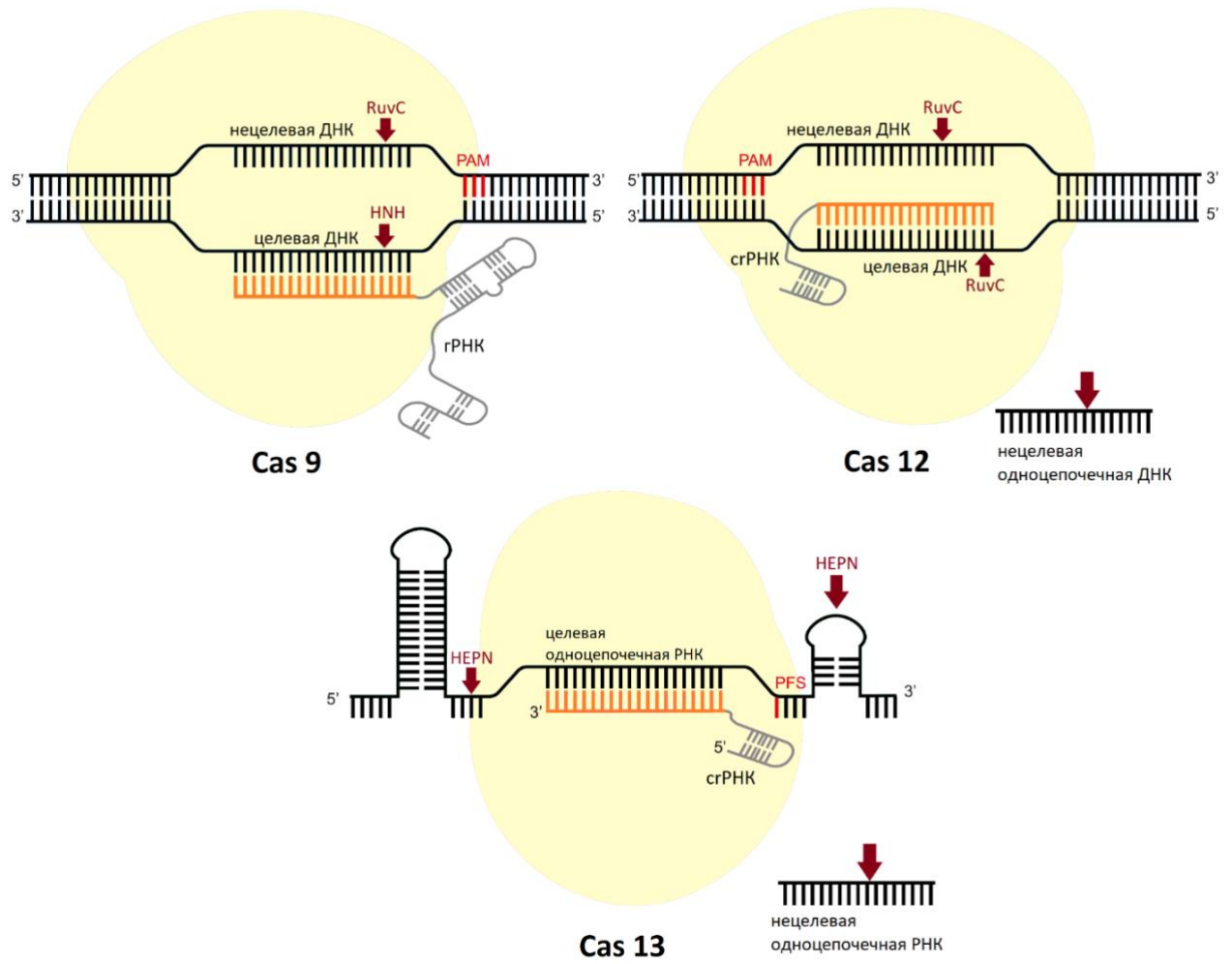


Рисунок 3. Организация систем CRISPR/Cas 9, /Cas12, /Cas13.

Cas12 представляет собой эффекторный белок класса 2 типа V, использующий только домен RuvC без домена HNH и производящий ступенчатые разрывы с липкими концами, по сравнению с Cas9, который образует тупые концы. Показано, что Cas12 успешно распознает двухцепочечную ДНК (Cas12a/Cpf1) и может расщеплять одноцепочечную ДНК (Cas12f/Cas14). Кроме того, Cas12 управляется единственной относительно компактной crРНК и не нуждается в tracrРНК. Фермент также удобно использовать для мультиплексного редактирования, поскольку активность РНКазы III, характерная для Cas12, позволяет получать множество crРНК из единого предшественника. В отличие от Cas9, Cas12 может расщеплять целевую последовательность – цис-расщепление, а также активировать свою способность расщеплять нецелевые последовательности – транс или коллатеральное расщепление [62]. Благодаря транс-расщепляющей активности, Cas12 можно использовать для обнаружения нуклеиновых кислот [63]. Также Cas12 был перепрофилирован в нацеленный на ДНК-эндонуклеазу CRISPR трансрепортер (DETECTR), который способен обнаруживать присутствие оцДНК. Эта технология применима для обнаружения ДНК-вирусов в клинических исследованиях [62]. В целом семейство Cas12 характеризуется множеством вариантов, включающих Cas12a (Cpf1) Cas12b, Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12f (Cas14), Cas12j (CasF), Cas12h, Cas12i и Cas12c [42]. Наиболее известный Cas12a демонстрирует эффективность, сравнимую с таковой SpCas9, однако широкого применения в клетках млекопитающих не нашел, в основном из-за строгой потребности в последовательности смежного мотива протоспейсера TTTV (PAM). Напротив, его ортолог Mb3Cas12a (*Moraxella bovoculi* AAX11\_00205) может эффективно редактировать геном мыши на основе последовательности TTV PAM, более того, использование Mb3Cas12a, меченного мономерным стрептавидином в сочетании с биотинилированной ДНК матрицей для гомологичной рекомбинации приводит к рождению мышей поколения F0 в 40% случаев с желаемой отредактированной последовательностью [64]. Недавно, реконструируя эволюцию эндонуклеаз Cas9 и Cas12, как в прокариотах, так и в эукариотических клетках было обнаружено семейство транспозон-кодируемых РНК-управляемых систем, названных OMEGA. Хотя эти программируемые нуклеазы, включая IscB, IsrB и TnpB, имеют большие перспективы для нацеливания и редактирования генома, их активность и биологическая значимость до сих пор полностью не охарактеризованы [65].

Cas13 представляет собой белок класса II и типа VI. Члены семейства CRISPR/Cas13 работают как двухкомпонентные системы, в которых crРНК без участия tracrРНК образует комплекс с белком Cas13, состоящего из двух нуклеотид-связывающих доменов HEPN, каждый из которых содержит сайт расщепления РНК. Также как для Cas9 и Cas12, для Cas13 требуются фланкирующие последовательности протоспейсеров, называемые PFS, которые действуют

аналогично последовательности РАМ Cas9 и, следовательно, необходимы для активности расщепления РНК, но недавно было обнаружено, что не все системы типа VI-Cas13 требуют PFS (Таблица 2.) и это обеспечивает большую гибкость для нацеливания и легкого расщепления любой последовательности нуклеиновых кислот. Кроме того, Cas13 единственная известная прокариотическая система CRISPR/Cas, нацеленная на одиночную РНК, т.е. обладая уникальной двойной РНКазной активностью, он способен катализировать HEPN-независимый процессинг пре-crРНК в зрелую crРНК и производить HEPN-зависимое расщепление РНК [42; 60]. Cas13 также можно перепрофилировать в редактор оснований РНК. dPspCas13b был объединен с ADAR2 для разработки REPAIR, который может реализовать преобразование А→I в РНК. В процессе трансляции и сплайсинга инозин читается как гуанин, поэтому инструмент REPAIR может восстанавливать патогенные мутации G→A. Впоследствии была разработана система RESCUE, которая не только сохраняет исходную активность дезаминазы А→I, но также так же осуществляет переход С→U. Эффективность редактирования и специфичность редакторов оснований РНК пока невысоки, и необходимы дальнейшие исследования [66; 67]. Как упоминалось выше, существуют вариации Cas13, каждая со своими особенностями, сгруппированными в таблице вариантов Cas13. Среди них Cas13d (CasRx) считается одним из самых перспективных подтипов Cas13, продемонстрировавшим ряд преимуществ, особенно при работе с млекопитающими, с точки зрения структуры и функций:

1. небольшой размер, подходящий для упаковки в вирусные вектора;
2. низкая нейротоксичность;
3. двойная нуклеазная активность;
4. не требуется фланкирующая последовательность протоспейсера для активности расщепления РНК;
5. значимо низкая нецелевая активность, более высокая эффективность и специфичность в расщеплении целевой РНК.

Характеристики Cas13d делают его важным кандидатом для пространственно-временной инженерии транскриптома, обнаружения нуклеиновых кислот, мультиплексной регуляции генов, посттранскрипционного молчания генов, альтернативного сплайсинга, отслеживания и эпигенетической регуляции РНК [60].

Таблица 2. Варианты Cas13.

Характеристики	<i>Cas13a</i>	<i>Cas13b</i>	<i>Cas13d</i>
Длина стебля (п.н.)	5-6	9-14	8-10
Длина петли (п.н.)	7-9	3-6	4-6
Процессинг пре-гРНК	HEPN-независимый процессинг; Helical-1	HEPN-независимый процессинг; RRI-2	HEPN-зависимый процессинг; HEPN-2
Распознавание дуплекса гРНК-мишени	HEPN-1, HEPN-2, Helical-2, Helical-3	Helical-1, Helical-2, RRI-1, RRI-2, HEPN-1	два HEPN и два Helical домена
Требование к протоспейсерному фланкирующему участку (PFS)	PFS, включающий 5' non-G	PFS, включающий 5' non-C or 3' NAN или NNA	PFS не требуется
Размер белка Cas (аминокислота)	~1250	~1150	~930
Наличие модульного белка	Вспомогательных белков не обнаружено	Дополнительные белки Csx27 и Csx28	Белки, содержащие домен WYL

## Разрывы ДНК

Клетки подвергаются многочисленным спонтанным повреждениям ДНК, до  $10^5$  на клетку каждый день, потенциально нарушающим стабильность генома, провоцирующим хромосомные перестройки, дестабилизирующим структуру и функции генов, и приводящим к развитию патологических состояний [68; 69; 70]. Разрывы в фосфодиэфирном остове ДНК бывают одно- или двуцепочечные. ДЦР являются наиболее радикальной формой повреждения ДНК, поскольку оба конца ДНК оказываются топологически разделены, что может вызвать вредные кариотипические изменения. Несмотря на все риски, разрывы ДНК занимают центральное место в важнейших биологических процессах, включая мейоз [71] и иммунологическую рекомбинацию V(D)J, при которой гены, кодирующие компоненты антител, рекомбинируют с образованием огромного разнообразия конечных продуктов [72]. Целенаправленная индукция сайт-специфических расщеплений ДНК стала краеугольным камнем технологий редактирования генома. Так, нуклеазы Cas осуществляют различные разрывы, например Cas9 может производить ДЦР с тупыми концами (без неспаренных оснований, в отличие от липких концов), Cas12a (Cpf1) – с липкими концами, а nCas9 производят парные или одиночные ОЦР [73].

Соответственно, клетки развили способность восстанавливать повреждения ДНК, инициируя сложный сигнальный ответ, который модулирует клеточный цикл, изменяет хроматиновое окружение и рекрутирует факторы репарации [73]. Считается, что оба варианта разрыва ДНК репарируются специализированными путями, хотя на практике граница между восстановлением ОЦР и ДЦР размыта, т.к. ОЦР могут быть преобразованы в ДЦР, например, путем прохождения репликативной вилки или когда два соседних ОЦР спонтанно образуют ДЦР с "липкими" концами [74].

Клетки млекопитающих используют два основных механизма репарации разрывов ДНК: негомологичное соединение концов (NHEJ) и репарация с помощью гомологичной рекомбинации (HDR). На протяжении всего клеточного цикла NHEJ является наиболее часто используемым путем восстановления ДЦР. Этот путь может приводить к мутациям. Однако, на поздней стадии S-фазы и в фазе G2, при наличии естественной гомологичной матрицы в виде сестринской хроматиды или искусственно добавленных доноров ДНК, запускается путь HDR. Гомологичная рекомбинация может пойти по нескольким путям в зависимости от типа и размера матричной ДНК. Так, в присутствии двуцепочечного донора ДНК со средними плечами гомологии >200 п.н. репарация может осуществляться посредством SSA, при более длинных плечах ( $\geq 400$  п.н.) восстановление пойдет по пути канонической HR, а когда плечи гомологии в районе 30 н. и при этом матрица одноцепочечная, выбирается SDSA путь. Альтернативным путем репарации является MMEJ, который имеет сходство как с NHEJ, так и с HDR. Подобно NHEJ, MMEJ активен в течение большинства периодов клеточного цикла, однако, как и HDR, нуждается в первоначальной резекции концов ДЦР, при этом использует чрезвычайно короткие плечи гомологии от 5 до 40 пар нуклеотидов (*Рисунок 4.*) [75].

Выбор пути между HDR и NHEJ диктуется сложностью участков разрыва из-за концевой резекции и фаз клеточного цикла. В отсутствие гомологичной матрицы резекция приводит к репарации по механизму MMEJ, тогда как обширная резекция с помощью экзонуклеаз и геликаз (CtIP, WRN и Exo1) в присутствии гомологичной матрицы направляет процесс репарации в сторону HR и SSA. Без экзогенных доноров ДНК два конца ДЦР точно или неточно лигируются через путь NHEJ. Наиболее частые мутации, возникающие при пути NHEJ – небольшие вставки или делеции (InDel) размером 1–4 п.н. В присутствии донора дцДНК без плеч гомологии с помощью NHEJ ДНК-матрица может быть встроена в сайт ДЦР, и этот путь был обозначен как NIT1 (*Рисунок 4.*) [75].



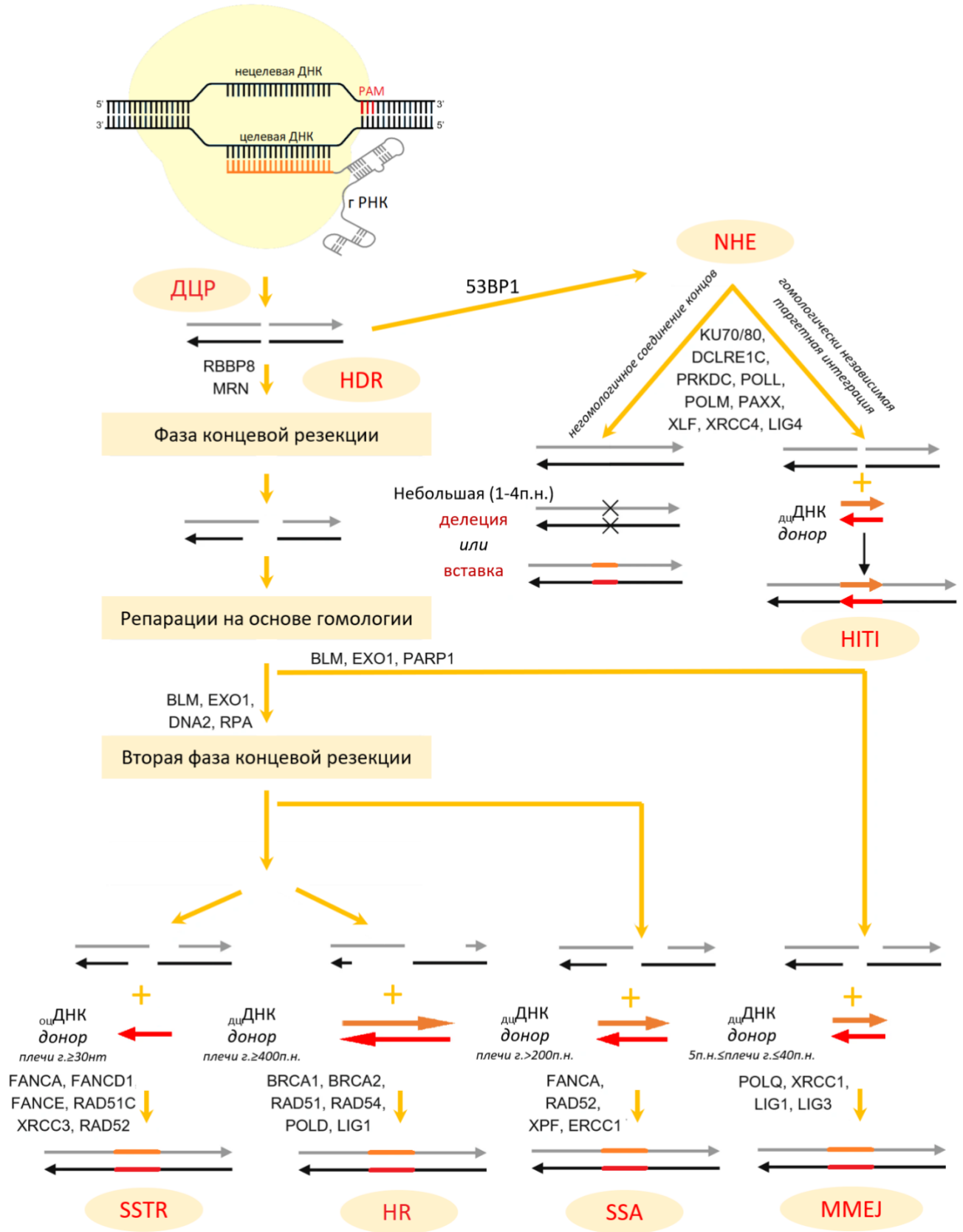


Рисунок 4. Пути репарации разрывов ДНК: HDR, NHEJ, MMEJ и соответствующие доноры ДНК (матрицы).

Понимание детерминант, которые направляют восстановление Cas-индуцированного разрезания ДНК по определенному пути репарации, имеет решающее значение для прогнозирования и контроля результата редактирования генома, а регуляция ключевых факторов конкурирующих путей репарации ДНК влияет на эффективность этого процесса.

### **Ингибиторы NHEJ**

Как мы уже определили NHEJ и HDR — два конкурирующих пути репарации ДНК при Cas9 индуцируемом ДЦР. NHEJ является преобладающим путем восстановления ДЦР в клетках млекопитающих по сравнению с HDR. Так происходит из-за того, что HDR зависит от фаз клеточного цикла и наличия эндогенных матриц для репарации. При создании трансгенных животных выбор пути репарации может иметь принципиальное значение. Если необходимо только нарушить функцию гена, сбив рамку считывания, путь NHEJ является оптимальной стратегией, однако если целью является внесение точных правок в целевые участки — необходимо задействовать HDR путь. При втором варианте, так как репарация автоматически запустится по пути меньшего сопротивления, необходимо искусственно сместить баланс в сторону HDR. Самым очевидным решением становится подавление NHEJ. Существуют несколько регуляторов ключевых факторов NHEJ пути - сравним их эффективность, а также плюсы и минусы.

Наиболее часто используемым ингибитором NHEJ является SCR7, который уменьшает сродство ДНК-лигазы IV к ДЦР. Однако, вернемся к нему чуть позже и пройдем путь NHEJ поэтапно.

NHEJ использует механизм прямого лигирования разъединенных концов ДНК независимо от степени гомологии между нуклеотидными последовательностями, не полагаясь на резекцию концов. На данном этапе подавить NHEJ путь можно с помощью регуляции каскада 53BP1 – PTIP / RIF1 – Shieldin-CST (*Рисунок 5.*), ингибирующего резекцию концов в G1 фазе клеточного цикла, которая в противном случае должна генерировать 3'-выступы оцДНК, необходимые для поиска гомологичных матриц. Во главе каскада стоит 53BP1 и именно вычлняя его из процесса репарации, можно подавить NHEJ-путь. Существуют два подхода к контролю 53BP1. Во-первых, можно подавить его рекрутирование в ДЦР, например, RAD18 связывает H2AK15Ub с большей аффинностью, чем 53BP1, тем самым ингибируя рекрутирование 53BP1 в ДЦР или DN1S, являясь доминантно-негативной версией 53BP1, конкурирует с эндогенным 53BP1 или вытесняет его, уменьшая привлечение эффекторов NHEJ [76; [77; 78]. Во-вторых, можно запустить активное удаление 53BP1 из ДЦР, например, полиубиквитинированием 53BP1, опосредованным убиквитинлигазой E3 SPOP [79].

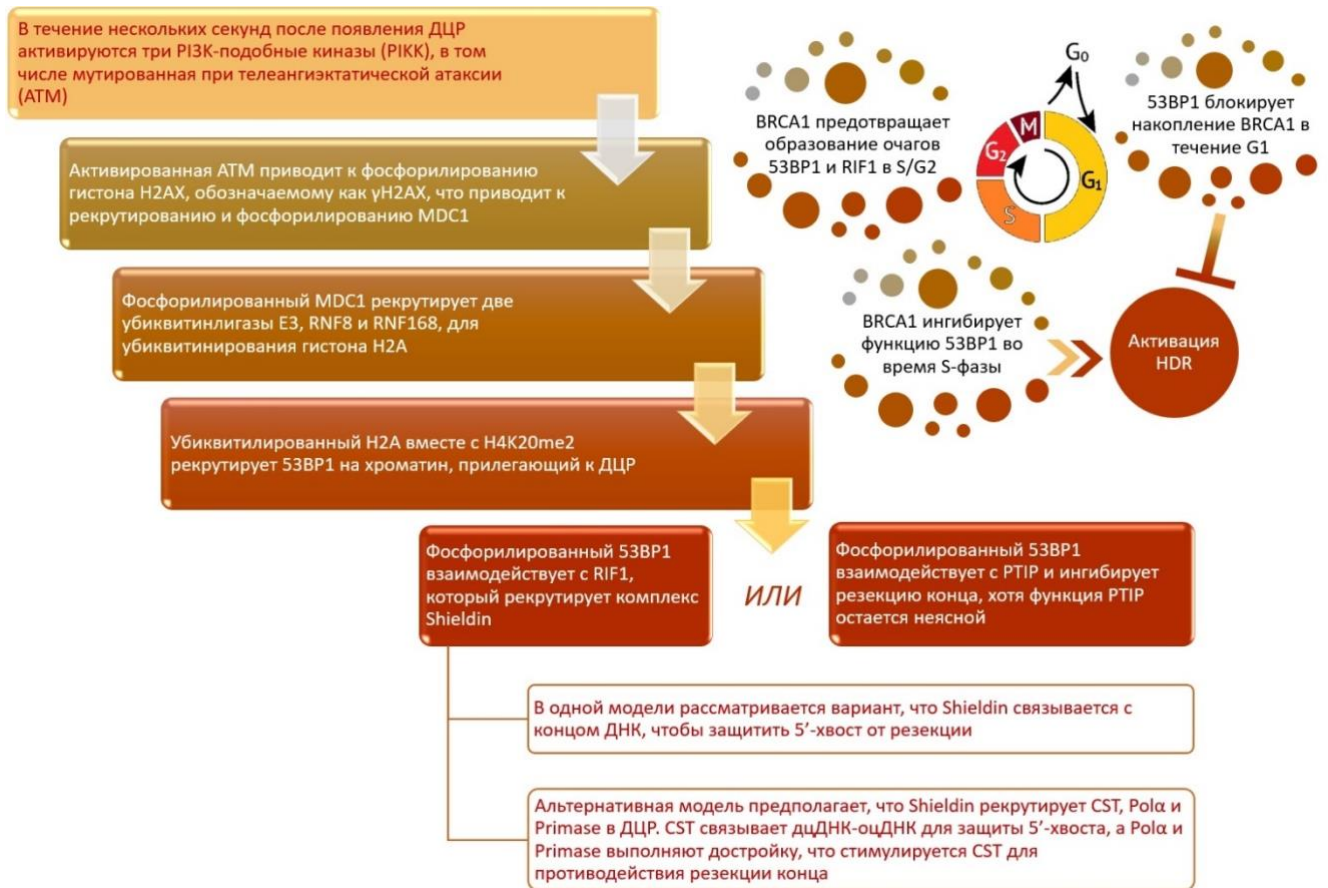


Рисунок 5. Схема активации пути 53BP1-PTIP-RIF1-Shieldin-CST.

На следующем этапе NHEJ, кольцообразные гетеродимеры белка Ku70/Ku80 распознают и связываются с ДЦР, по одному на каждый конец ДНК, претерпевают конформационные изменения, которые защищают свободные концы, предотвращая резекцию 5'-конца. Комплекс Ku70/Ku80 рекрутирует и активирует каталитическую субъединицу ДНК-ПК, активность которой необходима для NHEJ. Несмотря на решающую роль субъединиц Ku на ранних этапах пути NHEJ, в настоящее время разработано ограниченное количество ингибиторов Ku70/80, а их эффективность дает смешанные результаты. Использование KU-специфической siRNA подавляет Ku70/Ku80 и в 2 раза увеличивает CRISPR/Cas9-опосредованную эффективность HDR в свиных фибробластах [80]. Многообещающие результаты продемонстрировали низкомолекулярные ингибиторы Ku70/80. Арилалкиловые эфиры производных арилпиразолонкарбоновой кислоты, «5102» и «5135», устраняют связывание Ku до 50% [81], а замена сложноэфирной связи на амидную привела к образованию соединения «68» с четырехкратным увеличением ингибирующей активности связывания Ku-ДНК. Дальнейшие модификации, по замене двойных связей, привели только к увеличению активности против Ku в анализе связывания ДНК:  $68 < 149 < 322$ . Самые яркие эффекты продемонстрированы со

соединением «245», когда была произведена замена биоизостером карбоновой кислоты, тетразолом. Редактирование генома системой CRISPR/Cas9 в присутствии «245», демонстрирует 6-кратное увеличение опосредованной HDR вставки в ДЦР в целевом сайте. В итоге эти ингибиторы были выделены в отдельный класс Ku-DBi, и определены как высокоэффективные и специфичные ингибиторы связывания Ku-ДНК, которые напрямую взаимодействуют с Ku и ингибируют NHEJ [82]. Подавление Ku70 и Ku80 с помощью CRISPR значительно повышает эффективность HDR [83]. Так, активация системы CRISPRi приводит к увеличению эффективности HDR в 1,85 раза при подавлении Ku70 и в 1,58 раза в случае Ku80 [84]. Однако, некоторые исследования показали, что подавление Ku не влияет на HDR [85] или, что происходит угнетение не только NHEJ, но и HDR параллельно [86]. Интересно, что ингибирование Ku не всегда может привести к переходу на HDR-путь. Например, в качестве ингибитора гетеродимеров Ku70/Ku80 было заявлено низкомолекулярное соединение L – STL127705, идентифицированное с помощью скрининга библиотеки *in silico* [87]. Хотя нет отчетов о проверке влияния непосредственно этого ингибитора на эффективность HDR, исследование его 4-фторфенильного аналога STL127685 не показало никакого влияния на снижение NHEJ или увеличение HDR [88].

Низкомолекулярные ингибиторы, которые действуют на комплекс Ku70/Ku80, до 90% устраняют и активность ДНК-ПК [81]. Каталитическая субъединица ДНК-ПК отвечает за распознавание ДЦР, фосфорилирование члена X семейства гистонов H2A (H2AX) и рекрутирование / активацию механизма репарации для индукции пути NHEJ [89]. Обработка клеток HEK293T ингибиторами ДНК-зависимой протеинкиназы, NU7441 (или KU57788) и KU-0060648, приводит к двукратному увеличению эффективности HDR в ДЦР [90], а на эмбрионах рыбок *Danio rerio* воздействие NU7441 приводит к повышению частоты HDR в 13,4 раза [91]. Эти данные согласуются с исследованием на плюрипотентных стволовых клетках, где другой ингибитор ДНК-ПК, NU7026, повышал эффективность интеграции донорных олигонуклеотидов до 1,6 раз [88]. Более мощным ингибитором ДНК-ПК считается M3814, его активность вызывает 4-кратное увеличение HDR и позволяет проводить редактирование нескольких локусов одновременно [92]. Комбинация нескольких ингибиторов может носить синэргичный эффект, например, M3814 в сочетании с трихостатином А в 3 раза подавляет путь NHEJ [93], а в сочетании с линейризацией донорной плазмиды и транзиентного нокдауна ДНК-полимеразы  $\theta$  (метод назвали ViPoD) почти полностью подавляет интеграцию на основе NHEJ/MMEJ и обеспечивает быстрое и легкое создание биаллельных knock-in для эмбриональных стволовых клеток мышей [22].

ДНК-ПК фосфорилирует множество субстратов, включая Artemis, XRCC4, ДНК-лигазу IV и XLF, что способствует удержанию концов ДНК и облегчает рекрутирование ферментов процессинга и лигирования.

Из-за важной роли ДНК-лигазы IV в лигировании концов ДЦР во время восстановления по пути NHEJ, использование её ингибиторов считается крайне актуальным для подавления этого пути и, таким образом, стимулирования HDR. SCR7 является наиболее хорошо охарактеризованным ингибитором ДНК-лигазы IV, подробный разбор механизма действия этого соединения приведен в статьях Уджайини Рэя за 2020 и 2021 годы [94; 95]. Пройдемся по самым ярким моментам в истории применения SCR7. Совместная инъекция компонентов CRISPR/Cas9 и SCR7 в зиготы повышает эффективность HDR-опосредованного инсерционного мутагенеза, что приводит к появлению мышей со вставками в нескольких локусах. Применение SCR7 смещает баланс в сторону HDR в 10 раз у эмбрионов мышей и на 46% у крыс, а также в широком диапазоне клеточных линий, включая раковые клетки легких, меланомы, молочной железы, толстой кишки и первичные фибробласты. В случаях вставок длинных фрагментов ДНК использование SCR7 повышает результативность до 13 раз, а с короткими вставками - до 19 раз. [76] Комбинация SCR7 с другими факторами может значительно повысить шансы HDR пути, как в случае с использованием Rad52 до 40% [96], а при совместной инъекции с компонентами CRISPR/Cas9 в зиготы могут быть осуществлены вставки в нескольких локусах [97], и показано, что применение SCR7 усиливает результативность стратегии повышения эффективности HDR до 30 раз [98]. Однако, вопрос об эффективности SCR7 в повышении эффективности HDR за счет NHEJ остается спорным. В целом, активность SCR7, по-видимому, является ткане- и организм-специфичной. Об этом свидетельствуют сообщения о низком влиянии SCR7 на подавление NHEJ или усиление HDR, например, в локусах ROSA26-like (RLL) генома кролика [99], MALAT1 клеток HEK293T [100], pROSA26 эмбриональных фибробластах свиньи [101]; при обработке линии эмбриональных стволовых клеток H1 [102], клеток U2OS DR-GFP [103], HSPC [104], и линии клеток миелогенного лейкоза K562 [105]; при создании CRISPR/Cas12a-опосредованного нокаута в человеческих плюрипотентных стволовых клетках [106], и в случае эмбрионов рыбок *Danio rerio* [91]. Представлены и модифицированные варианты SCR7. Циклизированная форма SCR7 является более стабильным вариантом SCR7 и может быть дополнительно окислена до SCR7-пиразина с сохранением способности подавлять NHEJ [107]. Было показано, что SCR7-пиразин увеличивает эффективность генетического редактирования на 50% в клетках MCF7 [108], но в создании нокаута в *Xenopus* был менее эффективен [109], что опять же говорит о ткане- и видоспецифичности SCR7. Другая модификация SCR7, идентифицированная как SCR130, индуцирует апоптоз и обладает противоопухолевой активностью [110]. В дополнение к низкомолекулярным ингибиторам,

блокирование активности ДНК-лигазы IV возможно за счет shRNA-опосредованного сайленсинга генов и совместной экспрессии системы Cas9 и белков E1B55K и E4orf6 аденовируса 4 вплоть до повышения эффективности HDR до восьми раз и практически полного подавления активности NHEJ в клеточных линиях человека и мыши [83].

Когда концы ДЦР не могут быть напрямую лигированы с помощью XLF-XRCC4 и ДНК-LigIV, например, из-за выступающих частей нескольких нуклеотидов, нуклеазы, такие как Artemis, полинуклеотидкиназа 3'-фосфатаза (PNKP) и ДНК-полимеразы (Pol $\mu$  и Pol $\lambda$ ) могут расщеплять границы оцДНК-дцДНК с образованием совместимых тупых концов [111; 94].

Если не задействовать вышеописанные механизмы подавления NHEJ пути, то на заключительном этапе негомологичного соединения концов ДНК, комплекс XRCC4-ДНК-лигаза IV-XLF выполняет лигирование. Основания ДНК случайным образом добавляются и удаляются за счет активности ДНК-полимераз и нуклеаз, что приводит к небольшим вставкам по сравнению с исходной геномной матрицей, которая составляет основу подверженного ошибкам редактирования на основе NHEJ.

Повышение эффективности направленного редактирования генома возможно не только с помощью ингибирования NHEJ, но и за счет прямой активации HDR. Последнее может быть более безопасным для клеток, т.к. не приводит к гибели клеток из-за нерепарируемых разрывов ДНК.

## **Регуляция ключевых факторов HDR пути**

HDR работает значительно медленнее, чем NHEJ. Этот процесс требует семи и более часов и требует резекции не менее 1 тысячи пар оснований с 5'-конца разрыва для образования 3'-выступающего конца ДНК. Резекция конца ДНК, также называемая 5' – 3' деградация, это биохимический процесс, при котором тупой конец участка двухцепочечной ДНК модифицируется путем отрезания части нуклеотидов от 5'-конца для получения 3'-одноцепочечной последовательности. Это важная часть механизмов MMEJ и HDR репарации DSB ДНК. Наличие участка одноцепочечной ДНК позволяет разорванному концу ДНК гибридизоваться с совпадающей последовательностью матрицы для гомологичной рекомбинации, чтобы при удлинении этого конца ДНК полимеразой можно было точно восстановить последовательность, возможно утраченную в месте разрыва.

Большинство путей HDR (HR, SDSA, BIR, SSA) определяются потребностью в матрице репарации, и RAD51 опосредует поиск донора ДНК вовремя HR. Так, сборка нуклеопротеиновых филаментов RAD51 - оцДНК необходима для HR, SDSA и некоторых BIR, но путь SSA является RAD51-независимым [112]. Недавняя работа показала, что путь FA также

важен для репарации ДЦР. Путь FA включает 19 белков от FANCA до FANCT и множество ассоциированных белков; инактивация любого из генов FA вызывает анемию Фанкони, которая представляет собой генетическое заболевание, характеризующееся недостаточностью костного мозга и предрасположенностью к раку. Путь FA наиболее известен своей ролью в репарации межцепочечных поперечных сшивок дцДНК. Он не влияет напрямую на активность NHEJ, но вместо этого направляет репарацию в сторону SSSTR. Роль белков FA была отмечена в репарации ДЦР, включая FANCD1 (BRCA2), FANCR (RAD51) и FANCD2, хотя он не входит в состав игроков канонических путей репарации ДЦР. Взаимодействие между FA и путями восстановления ДЦР всё ещё изучается, и появляется все больше доказательств того, что FA не только участвует в репарации межцепочечных поперечных сшивок дцДНК, но также играет роль в ДЦР -опосредованном редактировании генома [113].

Основным шагом, который определяет выбор HDR в качестве пути репарации ДЦР, является 5'-3'-резекция конца ДНК с образованием 3'-выступающей одноцепочечной ДНК. Этот процесс инициируется комплексом MRN (MRE11-RAD50-NBS1, MRX для дрожжей), который имеет решающее значение для короткой концевой резекции [114]. Одной из стратегий усиления влияния HDR стала разработка химерной конструкции Cas9 по привлечению MRN к HDR. В этой системе SpCas9 своим N- или C-концом слит с доменом из 126 аминокислот из щелочной нуклеазы HSV-1 (UL12), который и рекрутирует комплекс MRN [115]. Неоднозначная ситуация с PARP1, представителем семейства поли(ADP-рибоза)-полимераз, участвующим в репарации повреждений ДНК и remodelировании хроматина. С одной стороны, он может способствовать вовлечению MRN, что стимулирует MMEJ, SSA или HR [116], однако PARP1 быстро рекрутируется в новые ДЦР и может ингибировать резекцию и привлечь Ku, способствуя пути NHEJ [117].

Фосфорилированный CtIP и комплекс BRCA1-BARD1 стимулируют процесс резекции с помощью MRN, в ходе которого субъединица MRN NBS1 генерирует короткие выступающие концы [118; 119]. На данном этапе чашу весов можно склонить в сторону HDR за счет использования Cas9, гибридного с N-концевым фрагментом CtIP, а именно HE (включая домен мультимеризации и ключевые сайты фосфорилирования CDK), за счет рекрутирования эндогенного CtIP в месте расщепления. Этот эффект был продемонстрирован на клеточных линиях человека, iPS-клетках и зиготах крыс, хотя результативность Cas9-HE зависела от используемой направляющей РНК и варьировала в зависимости от локуса [120].

Короткие выступы, генерируемые MRN, служат местом связывания для ферментов, необходимых для LRR, таких как EXO1 и BLM/DNA2 [121]. EXO1 генерирует длинные 3'-выступы оцДНК за счет своей процессивной 5' экзонуклеазной активности. Стимулировать резекцию с помощью EXO1 может SOSS1, гомолог 1 SSB человека [122], также сам MRN

рекрутирует и усиливает процессивность EXO1, а BLM увеличивает сродство EXO1 к местам разрыва ДНК [121]. Интересный момент с RPA, который может как стимулировать, так и ингибировать активность EXO1, в зависимости от того, фосфорилирован RPA или нет [123]. BLM/DNA2 обладает как 5'-, так и 3'-эндонуклеазной активностью – BLM разделяет нити ДНК, позволяя DNA2 расщеплять оцДНК [121]. Геликазная активность BLM увеличивается при взаимодействии с CtIP, а также CtIP усиливает DNA2 опосредованное расщепление ДНК [124]. RPA ингибирует 3'-эндонуклеазную активность DNA2, одновременно стимулируя ее 5'-эндонуклеазную активность, чтобы обеспечить 5'-3'-полярность резекции [123]. Как сообщалось в части посвященной NHEJ, регуляторный механизм 53BP1 – PTIP / RIF1 – Shieldin-CST, ингибирует LRR, 53BP1 блокирует привлечение BRCA1 к ДЦР во время G1 фазы, в то время как BRCA1 предотвращает образование очагов 53BP1 и RIF1 в ДЦР во время S/G2 [125]. Антагонистические отношения между BRCA1-BARD1 и 53BP1 могут быть связаны с двумя состояниями посттрансляционной модификации гистонов (H2A и H4), убиквитилированием H2A по лизину 15 и метилированием H4 по лизину 20, что влияет на выбор пути репарации ДЦР [126]. Также RAD18, а именно его улучшенный вариант e18, подавляя локализацию 53BP1 в ДЦР, стимулирует CRISPR-опосредованный HDR, тем самым повышая эффективность точного редактирования генома [127].

Поскольку образовавшиеся свободные концы оцДНК очень нестабильны, этот 3'-выступ оцДНК быстро связывается с RPA, который защищает оцДНК от нуклеолитической деградации и предотвращает образование вторичных структур. С помощью «посредников» рекомбинации, таких как BRCA1, BRCA2, а также партнера и локализатора BRCA2 – PALB2, RPA вытесняется белком репарации ДНК RAD51, который затем образует протяженные спиральные нуклеопротеиновые филаменты на оцДНК путем блокирования гидролиза АТФ. RPA представляет собой барьер для сборки филаментов RAD51. Во время G2/S фазы CDK1 фосфорилирует RAD51, что усиливает способность RAD51 конкурировать с RPA за ssDNA [128]. Небольшая молекула RS-1, идентифицированная в результате скрининга библиотеки из 10 000 соединений, может усиливать ДНК-связывающую активность RAD51, что увеличивает Cas9-опосредованный HDR в несколько раз в клетках HEK293A, плюрипотентных стволовых клетках человека, эмбрионах кроликов и рыбок *Danio rerio*. Затем нуклеопротеиновый филамент RAD51 - оцДНК осуществляет поиск комплементарной ДНК матрицы для гомологичной рекомбинации. Инвазия 3'-выступающего конца ДНК в матрицу для репарации приводит к образованию D-петли, за которым следует удлинение 3'-выступающего конца ДНК с помощью ДНК-полимеразы  $\delta$ . Способствовать инвазии ДНК может сверхэкспрессия дрожжевого RAD52 (yRAD52), но не его человеческого аналога, hRAD52; показано, что применение слитого белка yRAD52-Cas9 приводит к увеличению эффективности HDR в клетках



разных организмов. Предполагается, что после образования структуры D-петли, процесс репарации может пойти тремя путями, в зависимости от того, образуются ли одна или две структуры Холлидея. Затем действует группа ферментов, называемых резольвазами, которые завершают процесс репарации и восстанавливают хромосому до ее неповрежденного состояния [77].

Скрининг около 4000 малых молекул выявил две небольшие молекулы, L755507 и Брефельдин А, которые оказались способными повысить эффективность HDR. L755507, агонист  $\beta$ 3-адренергических рецепторов, увеличивал эффективность вставки GFP в 3 раза по сравнению с контрольными клетками. Брефельдин А, ингибитор внутриклеточного транспорта белка из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи, также приводил к повышению эффективности встраивания в 2 раза [129].

Следует отметить, что некоторые ключевые факторы, участвующие в HDR в клетках дрожжей и млекопитающих, подлежат регуляции с помощью присоединения SUMO, небольшого белка из примерно 100 остатков, высококонсервативного среди эукариот, и способного регулировать активность и взаимодействия того белка, к которому присоединяется [130]. Как правило, сумоилирование имеет положительное воздействие на концевую резекцию. Например, SUMO оказывает сильное влияние на функционирование CtIP [131] и способствует стабильности белка EXO1 в клетках млекопитающих [132]. Следовательно, можно предположить, что сумоилирование этих ключевых факторов может обеспечить более высокую эффективность HDR.

Из-за неравномерного распределения активности NHEJ и HDR по клеточному циклу, ингибиторы клеточного цикла используют для повышения эффективности HDR путем остановки или задержки клеток-мишеней в фазе S или G2, в которой HDR активирован.

### **Контроль клеточного цикла**

Поскольку активность репарации HDR ограничена фазами S и G2 клеточного цикла, синхронизация клеток в этих фазах за счет химических веществ может значительно повысить активность репарации с помощью HDR. Такими соединениями стали блокаторы G1/S – афидиколин, гидроксимочевина, мимозин и тимидин повышающие вероятность восстановления ДНК по пути HDR в неонатальных фибробластах [133]. Нокодазол и АВТ-751 останавливают клетки в фазе G2/M, ингибируя полимеризацию микротрубочек. Нокодазол способствует усилению HDR в 1,38 раза в клетках HEK293T [133], а АВТ-751 способствует HDR в линиях стволовых клеток человека и приводит к шестикратному увеличению эффективности редактирования генома [102]. Некоторые блокаторы M/G1 не всегда показывают высокие

результаты в стимуляции HDR, как например ловастатин в неонатальных фибробластах [133]. Недавно было показано, что низкомолекулярное соединение XL413, нацеленное на CDC7 и участвующее в инициации репликации ДНК, замедляет S-фазу, удлиняя фазы S/G2/M, увеличивает эффективность HDR до 3,5 раз [105]. Соединение RO-3306 может временно останавливать переход от фазы G2 к фазе M путем ингибирования функции CDK1, увеличивая количество клеток в фазах S и G2 [134]. RO-3306 в сочетании с Cas9, нуклеазная активность которого снижена в фазе G1, может улучшить соотношение HDR/NHEJ в 20 раз, ограничивая NHEJ [135]. Однако, эффекты блокаторов клеточного цикла зависят от типа клеток-мишеней и могут иметь ограничения для использования *in vivo* из-за потенциальной токсичности. Зависимая от фазы клеточного цикла экспрессия Cas9 может быть дополнительным подходом к синхронизации формирования ДЦР с фазами клеточного цикла. Стратегия контроля экспрессии Cas9 в фазах S и G2 основана на создании комплекса Cas9-hGem (Cas9-геминин). Слияние первых 110 аминокислот геминина с Cas9 приводит к протеолитической деструкции такого гибридного белка, вызванной APC/CDH1-опосредованным убиквитинированием в поздних фазах M и G1, что в итоге увеличивает эффективность HDR до 87% в клетках HEK293T [100]. Эффективность этого подхода была подтверждена на плюрипотентных стволовых клетках человека и фибробластах свиньи, что делает его многообещающим инструментом для улучшения HDR [136; 137]. Кроме того, существуют не прямые методы замедления клеточного цикла, например, было показано, что инкубация эмбрионов рыбок *Danio rerio* на льду, увеличивает результативность HDR в 1,5 раза [91].

### Статус хроматина

Статус хроматина жизненно важен для репарации ДЦР, опосредованной HDR. Система CRISPR-Cas функционирует в различных хромосомных контекстах, таких как эухроматин или гетерохроматин, при этом компоненты и структура хроматина значительно влияют на выбор путей репарации ДЦР, однако детальные механизмы этого процесса остаются неясными.

Фундаментальной единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из двух копий каждого корового гистона (H3, H4, H2A и H2B), обернутых 147 парами оснований ДНК. Неструктурированные концевые области коровых гистонов подвергаются множеству различных посттрансляционных модификаций, среди которых наиболее широко изучены фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и убиквитилирование. Посттрансляционные модификации гистонов, а также метилирование ДНК помогают образовать эухроматин и гетерохроматин. Эухроматин соответствует открытому состоянию хроматина, связан с активной транскрипцией и обогащен H3K4me3, H3K36me3 и

гиперацетилизацией гистонов. Напротив, гетерохроматин более компактен, менее доступен для аппарата транскрипции и обогащен репрессивными гистоновыми посттрансляционными модификациями и, таким образом, транскрипционно неактивен. Гетерохроматин разделяют на факультативный, конститутивный и центромерный. Последний включает вариант гистона H3, CENP-A, который эпигенетически определяет расположение центромера, и перемежается с активными гистоновыми посттрансляционными модификациями H3K4me3, H3K36me3, но лишен репрессивного H3K9me3, характерного для конститутивного гетерохроматина [138; 139]. Как характеристики двух вариаций хроматина определяют выбор пути репарации? Рассмотрим известные факты.

H3K36me3, присутствующий ранее или индуцируемый ДЦР, играет критическую роль в обеспечении репарации по пути HDR в эухроматине [139], но при этом H3K36me3 обнаруживают и в сайтах, склонных к NHEJ [140]. H3K36me2 ведет себя более консервативно и большинство исследований свидетельствуют, что диметилирование H3K36 снижено в ДЦР, выбравших путь HDR и характерно для NHEJ [139]. H3K4me2 в центромерах способствует HDR в фазе G1 клеточного цикла [141]. H3K9me3 способствует восстановлению по пути HDR и уменьшает шансы NHEJ, накапливаясь не только в областях гетерохроматина, но и в ДЦР с образованием транзитного репрессивного хроматина в эухроматине.

В среднем для гетерохроматина более характерны события HDR и MMEJ, по сравнению с NHEJ. Так показано, что использование системы KRAB (Krüppel-associated box), которая рекрутирует компоненты ремоделирования хроматина и нуклеосом, создавая локальные гетерохроматиновые области в геноме, в конечном счете приводит к смещению баланса от NHEJ к HDR [142; 143]. Подобное смещение баланса от NHEJ, характерно и для конкуренции MMEJ и NHEJ [138]. Такое распределение выглядит логично, так как NHEJ по умолчанию (особенно на этапе G1) является более активным, чем MMEJ или HDR, и следовательно, в эухроматине NHEJ может в основном превзойти их, а недоступность участка разрыва ДНК в гетерохроматине и стремление к его ремоделированию может быть медленным процессом, что дает время для активации MMEJ и HDR. Однако, использование ингибиторов гистоновых деацетилаз HDAC1 или HDAC2, но не других HDAC, которые поддерживают компактную природу гетерохроматина, продемонстрировало значительное увеличение скорости как NHEJ, так и HDR – примерно в два-три раза [144]. Так, трихостатин А, ингибитор HDAC класса I/II, увеличивает эффективность редактирования генов до 2,2 раза в экспрессирующих pCas9 клетках, а вальпроевая кислота, также ингибитор HDAC класса I/II, в сочетании со сверхэкспрессией RAD51 значительно увеличивает эффективность биаллельной гомологичной рекомбинации в клетках ES/iPS человека [145]. Напротив, более раннее исследование показало, что не было

очевидных различий в конечном соотношении HDR / NHEJ в отношении различных состояний хроматина [146].

В итоге выбор пути репарации с помощью NHEJ или HDR контролируется статусом метилирования H3K36, а гистоновые посттрансляционные модификации H3K4me2 и H3K9me3 способствуют пути HDR [147]. На сегодняшний день вопрос о точном механизме того, как структуры хроматина влияют на выбор пути репарации Cas9-опосредованного ДЦР, остается открытым. В отношении репарации опосредованных Cas9 разрывов ДНК существует обобщенное мнение, что структура хроматина конечно влияет на активность Cas9 (как *in vivo*, так и *in vitro*), при этом гетерохроматин является препятствием для CRISPR-Cas-опосредованного редактирования генома [148].

### **ДНК-матрицы для гомологичной рекомбинации**

Выбор правильного варианта ДНК матрицы для репарации с помощью гомологичной рекомбинации может значительно повлиять на результативность редактирования генома. Существует три основных варианта донорных матриц: двуцепочечная и одноцепочечная ДНК, а также линейная одноцепочечная ДНК аденоассоциированного вируса.

Матрицы дцДНК широко используются из-за их низкой стоимости и удобства получения, хотя HDR с использованием доноров дцДНК менее эффективен, чем с использованием оцДНК, но позволяет создавать вставки больших фрагментов ДНК (до 7,1 т.п.н.) [75]. Плечи гомологии, необходимые для матриц дцДНК, обычно относительно длинные (0,5-2 т.п.н.), но успешно использовались и плечи гомологии <100 пар оснований [149]. Размер является ограничивающим фактором, поскольку эффективность *knock-in* HDR положительно коррелирует с длиной плеча гомологии дцДНК и отрицательно коррелирует с размером вставки [85].

Матрицы одноцепочечной ДНК имеют короткие плечи гомологии (70–100 оснований) и могут быть легко синтезированы с многочисленными модификациями для повышения эффективности трансформации и стабильности *in vivo*. Общий уменьшенный размер оцДНК делает её более подходящей для точечного редактирования со стратегией короткой вставки (<100 нуклеотидов) вместо целых генов [75].

Одним из вариантов оцДНК является короткий одноцепочечный ДНК-олигонуклеотид длиной около 200 оснований. оцОНК содержит плечо гомологии  $\geq 30$  нуклеотидов как на 5'-, так и на 3'-конце, где более длинное плечо гомологии может повысить эффективность редактирования, но при этом проявляет более выраженную цитотоксичность. Ограниченная длина оцОНК не позволяет делать крупные вставки, хотя использование нескольких оцОНК с перекрывающимися областями увеличивает возможность вставок крупных фрагментов ДНК

[75]. Повышение результативности редактирования с оцОНК было достигнуто за счёт фосфоротионатной модификации, которая стабилизирует матрицу за счет уменьшения вне- и внутриклеточной деградации нуклеазами и увеличивает их способность проникать через плазматическую мембрану клетки-мишени [150]. В настоящее время оцОНК стали рутинным инструментом редактирования как *in vitro*, так и *in vivo*, особенно в экспериментах по изменению нескольких генов [151].

На основе расширения использования оцОНК была разработана система Easi-CRISPR, в которой в качестве донорных матриц используется длинная одноцепочечная ДНК [152]. По сравнению с оцОНК, доцДНК обеспечивает вставки более крупных фрагментов, замены генов в выбранных местах генома и эффективную генерацию условных аллелей, таких, как обрамленные loxP участками экзоны. Как и в случае оцОНК, расстояние между участком целевой модификации и сайтом Cas-расщепления должно быть как можно меньше. Средняя длина доцДНК составляет 0,2–2 т.п.н., при максимальном значении 5000 п.н., после чего они склонны к спонтанным разрывам. При этом доцДНК использует короткое плечо гомологии, обычно 55–329 нуклеотидов на каждом конце. Для доцДНК свойственны недостатки, например она более токсична, чем оцОНК, её производство является более дорогим и громоздким, и несмотря на то, что короткие матрицы считаются более эффективными, репарация с помощью доцДНК приводит к большей частоте ошибок по сравнению с таковой для дцДНК [128; 75].

В дополнение к оцОНК и доцДНК в качестве матриц для HDR используется линейная одноцепочечная ДНК аденоассоциированного вируса, с учетом удаления всех вирусных генов, упакованная в капсид. Сообщается, что оцДНК-ААВ матрица обладает высокой эффективностью точечных мутаций и вставок больших фрагментов ДНК, поскольку вирус обладает естественной способностью стимулировать гомологичную рекомбинацию [153; 154]. В целом длина плеча гомологии оцДНК-ААВ матрицы составляет 400–800 нуклеотидов. В среднем, длина фрагментов вставки, при использовании оцДНК-ААВ матрицы, составляет 771–3300 нуклеотидов и не может превышать 3800. Однако, путем доставки двух доноров оцДНК-ААВ матриц вместе с нуклеазой CRISPR-Cas можно вставить ДНК длиной 5700 оснований в HSPC и Т-клетки [155].

Репарация с помощью гомологичной рекомбинации с двуцепочечным ДНК-донором происходит в основном через путь HR, тогда как при использовании одноцепочечной ДНК матрицы репарация происходит через SSA и SDSA [112]. Однако доноры двуцепочечной ДНК, как плазмидные так и линейные, были задействованы в системах репарации HMEJ, Tild и PTC<sub>h</sub>, в качестве альтернативы HR. В подходе HMEJ в качестве доноров ДНК использовали суперскрученные плазмиды, несущие сайты-мишени синтетической гРНК, и два плеча гомологии (600–900 п.н.) [156], которые в стратегии Tild были заменены на линейные дцДНК с

двумя плечами гомологии по 800 п.н. [157] При этом оба типа доноров ДНК были способны эффективно и точно интегрировать экзогенную ДНК в сайт-мишень. Система PiTCh тоже задействовала сверхскрученные плазмиды, несущие сайты-мишени синтетической гРНК, но с микрогомологическими последовательностями в качестве плеч гомологии (5–25 п.н.), и в итоге донорная последовательность встраивается в геном с помощью MMEJ пути [158], что позволяет работать системе во время фаз G1/ранних S фаз клеточного цикла в отличие от HR. В целом разработка этих стратегий позволила в разы увеличить эффективность HDR, в следующем порядке Tild > HMEJ > PiTCh ≥ HR, где разрыв между Tild и HR достигает около 6 порядков (Рисунок 6.) [157].

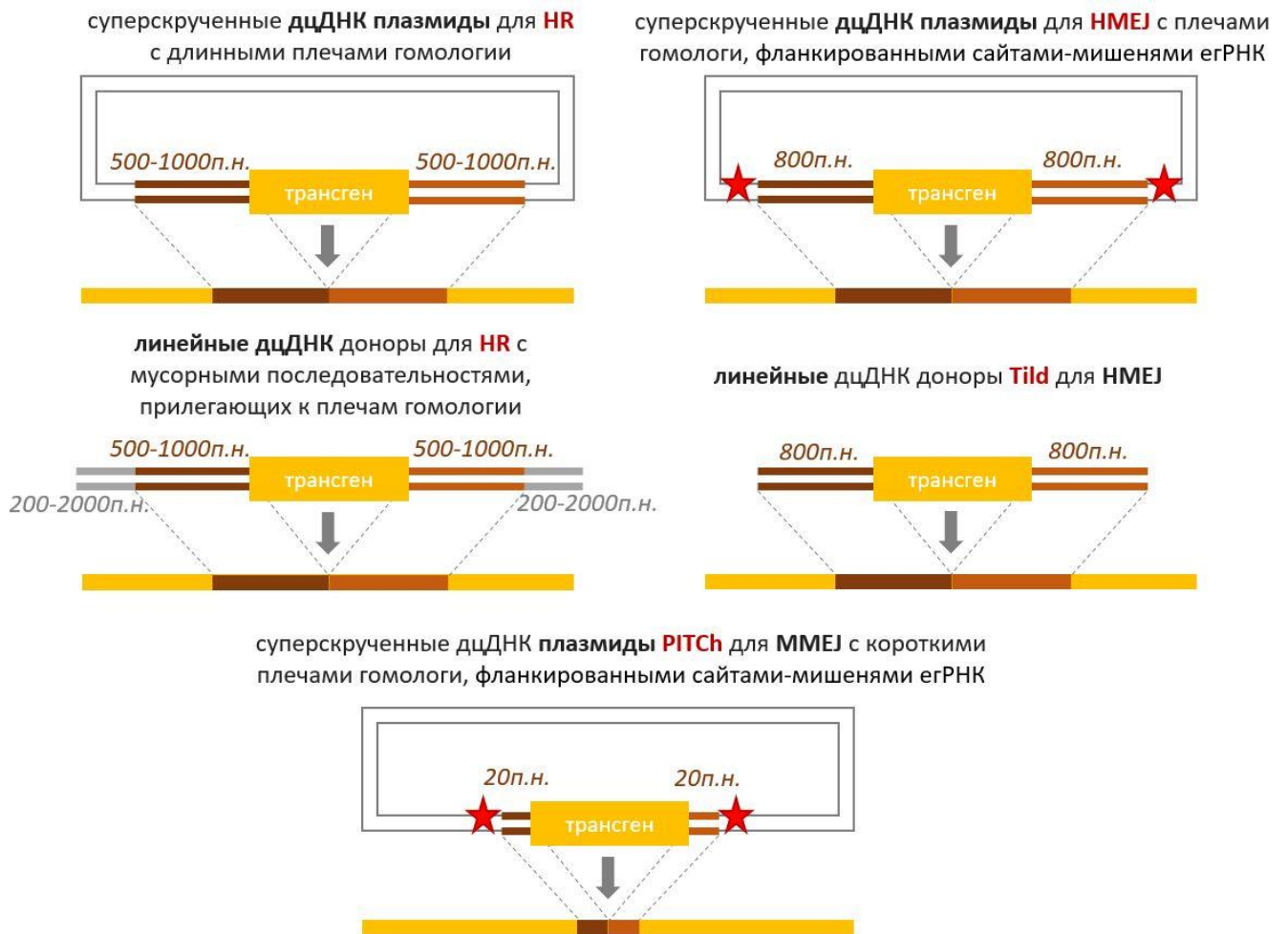


Рисунок 6. Схемы репарации ДЦР на основе гомологии с использованием дцДНК доноров.

Также было показано, что встраивание донорной последовательности можно осуществлять и на основе NHEJ пути. В этом случае двуцепочечные разрывы ДНК вводятся как в целевой геном, так и в донорскую матрицу. Сначала донорскую плазмиду линейаризуют и разрезают, при этом донор с двойным разрезом менее эффективен, чем с единичным, т.к. первый будет генерировать два фрагмента ДНК, конкурирующих за геномную интеграцию, а затем напрямую лигируют с концами разрезанной геномной ДНК в результате репарации NHEJ. NHEJ эффективно повторно лигирует концы ДНК без ошибок и не требует областей гомологии для точной вставки. Однако донор может быть вставлен в любой ориентации относительно концов разорванной геномной ДНК, и нецелевые двуцепочечные разрывы ДНК также могут привести к непреднамеренной вставке в случайные участки генома. Чтобы обойти эту проблему, в донорскую плазмиду вводили короткую гомологичную последовательность-приманку. Оказалось, впрочем, что вставка не зависит от гомологии между локусом-мишенью и «приманкой» в донорской плазмиде [159; 160]. Сходная стратегия NHEJ может быть достигнута с помощью Cas12a (Cpf1) которая, в отличие от Cas9-опосредуемого ДЦР с тупыми концами, генерирует ДЦР с липкими концами, которые потенциально могут способствовать точному редактированию генома [161]. Недавно было обнаружено, что матрица репарации короткой дцДНК, содержащая липкий конец, соответствующий одному из концов Cpf1-опосредованного ДЦР, и гомологичное плечо, разделяющее гомологию с геномной областью, примыкающей к другому концу ДЦР, обеспечивает точную репарацию и вводит желаемую нуклеотидную замену. Эта стратегия задействует как HDR, так и MMEJ механизмы и обозначена, как гомологичная рекомбинация с помощью лигирования [162].

Таким образом, оптимальные результаты редактирования могут быть получены путем выбора подходящей донорной ДНК в соответствии с экспериментальными требованиями. Однако формат предоставления матрицы донорской ДНК, её доступность и концентрация в ядре также важны. Обычно матрица добавляется в виде очищенной или «голой» ДНК, но в естественной среде клетки спираль ДНК обернута вокруг кластера белков – гистонов, в связи с чем было показано, что сконструированные ДНК-матрицы в форме имитирующей хроматин, демонстрируют в 2,3-7,4 раз более высокую эффективность HDR по сравнению с развернутой ДНК, наряду со сниженной цитотоксичностью [163]. Для сближения компонентов CRISPR и донорской ДНК внутри клеток было разработано несколько систем. Во-первых, Simplex в которой модифицированная егРНК, содержащая стрептавидин-связывающий аптамер, была связана с биотинилированным донором оцДНК, образуя комплекс RNP-донор ДНК [164]. Во-вторых, вариант Cas9, слитый с авидином через гибкий линкер и соединенный мостиком с модифицированной биотином оцДНК для увеличения сродства [165], а также аналогично сконструированный комплекс RNP-оцДНК с использованием SNAP-метки [166].

Эффективность этих подходов была увеличена за счет ковалентного связывания одноцепочечной ДНК с комплексом Cas9-RNP, при этом без необходимости модификации eгРНК и оцДНК [98].

### Редактирование оснований

Редактирование оснований — это технология прямого изменения последовательности нуклеотидов целевого участка генома. Подобное редактирование проводится путем дезаминирования основания без введения двуцепочечных разрывов ДНК, репарации с помощью гомологичной рекомбинации, необходимости в донорской матрице или дополнительных экзогенных/эндогенных белковых факторов. Основными составляющими единицами редакторов оснований, международная аббревиатура – BE, являются нуклеозиддезаминаза, каталитически неактивная Cas-нуклеаза и РНК, направляющая комплекс к целевому локусу для преобразования пар оснований. Точечные мутации могут быть внесены как в ДНК, так и в транскрипты РНК. В этом случае технология редактирования оснований РНК предлагает более безопасную стратегию прямого редактирования патогенных транскриптов без изменения генетической информации. Поскольку редактирование РНК носит временный характер, в геномной ДНК не возникнут побочные продукты или нежелательные мутации, которые могут быть переданы дочерним клеткам во время митоза. Это полезно для лечения заболеваний, не имеющих генетического происхождения, и имитации генетических вариантов, которые обеспечивают преимущество для здоровья [167].

Первыми BE стали редакторы, обеспечивающие переходы C→T, т.к. существует суперсемейство природных цитидиндезаминаз APOBEC/AID, которые способны на уровне РНК или ДНК дезаминировать цитидин до уридина, который имеет такие же свойства спаривания оснований, как и тимидин. Первыми охарактеризованными членами суперсемейства стали комплекс APOBEC1 и AID. Белок APOBEC1 является каталитической субъединицей редактирующего комплекса APOB. Фермент AID в адаптивной иммунной системе позвоночных играет ключевую роль в соматической гипермутации и рекомбинации генов иммуноглобулинов в В-клетках при переключении классов антител. Так же в суперсемейство входит группа цитидиндезаминаз APOBEC3 *Homo sapiens* (hA3), которые инактивируют геномы ретровирусных патогенов, таких как ВИЧ с помощью внесения случайных мутаций [168; 169; 170]. Цитидиндезаминазы суперсемейства APOBEC/AID сильно различаются по активности дезаминирования и предпочтениям в отношении нуклеотидного окружения мишени. Например, у APOBEC1 *Rattus norvegicus* (rA1, rAPO1) распределение предпочтений ближайших соседей разложилось в порядке TC≥CC≥AC>GC [171]. В группе дезаминаз hAPOBEC3, все семь членов,



несмотря на структурное сходство, сильно отличаются активностью дезаминирования и предпочтениями в отношении ДНК-субстрата [172]. Так, APOBEC3G *Homo sapiens* (hA3G) преимущественно дезаминирует третий цитидин в мотиве CCCA [173] и проявляет наибольшую активность в отношении второго С в динуклеотидных мотивах CC [174]. Кроме того, сообщалось, что редакторы оснований с hA3G индуцирует превращение С в Т в клетках млекопитающих с меньшей эффективностью по сравнению с rAPOBEC1-содержащими редакторами [175]. Для hAPOBEC3A (hA3A) показано предпочтительное дезаминирование цитидинов в мотиве TCR (где R = A/G) [176]. Редакторы оснований, сконструированные с дезаминазой AID и её ортологами, по-видимому, менее зависят от контекста последовательности протоспейсера, вероятно, из-за более высокой активности дезаминирования ДНК [177], т.к. изначально функционируют на уровне ДНК, а APOBEC1 в природных системах редактирует РНК [168; 169; 170]. Основываясь на активности цитидиндезаминаз суперсемейства APOBEC/AID, почти одновременно были разработаны три системы редакторов оснований, которые параллельно прошли схожие пути усовершенствования. Первые редакторы оснований были сконструированы на основе природной цитидиндезаминазы РНК APOBEC1 *Rattus norvegicus* и обозначены как СВЕ [171]. На основе ферментов, дезаминирующих ДНК, были разработаны редакторы оснований Target-AID и TAM. В системе Target-AID задействован ортолог AID – цитидиндезаминаза PmCDA1 *Petromyzon marinus*, объединённая с N-концом каталитической субъединицы dCas или nCas (d/nCas), ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы и направляющей РНК [178]. Редактор TAM сконструирован непосредственно с цитидиндезаминазой AID, гибридной с d/nCas и направляющей РНК, также при участии ингибитора урацил-ДНК-гликозилазы [179]. Все три системы редактирования оснований обладают не только высокой эффективностью, но и такими формами индивидуальной специфичности, как температурная чувствительность, размер окна активности, предпочтение нуклеотидной последовательности протоспейсера; эти отличия предполагают, что разные ВЕ должны дополнять друг друга и давать возможность выбора для исследователя [180].

Рассмотрим механизм функционирования СВЕ, который был разработан первым среди ВЕ [171]. Редактор цитидина первого поколения был образован путем гибридизации цитидиндезаминазы APOBEC1 *Rattus norvegicus* с N-концом dCas9, содержащей мутации, препятствующие образованию двуцепочечных разрывов ДНК [171]. Механизм СВЕ1 заключается в rAPOBEC1-дезаминировании цитидина до уридина, который корректируется на тимидин (Рисунок 7.). Однако, в технологии СВЕ1 есть нюанс, снижающий эффективность редактирования – это работа фермента UNG. В естественной ситуации функционирования клеток ВЕР является первичным ответом клетки на несоответствие пары «G•U» и иницируется вырезанием уридина с помощью UNG для предотвращения накопления мутаций в результате

спонтанно происходящего окислительного дезаминирования цитидина [181]. В процессе редактирования оснований промежуточно образующаяся пара G•U может репарироваться клеточной системой репарации поврежденных оснований BER с образованием исходной G•C пары. Поэтому, с целью защитить отредактированный промежуточный продукт G•U от удаления с помощью UNG, была проведена модификация CBE1 путем добавления 83-аминокислотного UGI к с С-концу комплекса gAPOBEC1-dCas9 [171]. (Рисунок 7.). Аналогично, UGI включены и в системы редактирования оснований Target-AID и TAM [178; 179]. В этой новой версии CBE2, U не удаляется путем BER с участием UNG, что существенно повышает эффективность редактирования оснований C→T. Для дальнейшего повышения эффективности редактирования оснований была разработана версия CBE3 путем частичного восстановления активности dCas9 до версии с каталитически активной нуклеазой nCas9 (D10A), через возвращение гистидина в положение 840 (обращение мутации H840A) [171]. Этот вариант индуцирует разрыв в недезаминированной цепи ДНК (G-содержащей) в паре G•U. Разрыв стимулирует использование дезаминированной цепи ДНК (U-содержащей) в качестве матрицы для репарации, для перехода в промежуточное состояние с парой A•U, которая в итоге преобразуется в A•T [182]. Эта модификация, а также присоединение второго домена UGI (модификация CBE4) и белка Gam бактериофага Mu, который, как известно, защищает концы DSB от дегградации, дополнительно повысило эффективность редактирования цитидина (Рисунок 7.) [183]. Дальнейшее усовершенствование BE было осуществлено в версии CBE4max путем модификации NLS и оптимизации кодонов [184]. Участок последовательности оцДНК-мишени в пределах протоспейсера R-петли, доступный для дезаминазы, называемый «окном редактирования/активности», остается критичным звеном целевого редактирования оснований.

Классическое окно редактирования BE составляет около пяти нуклеотидов из 20п.н. всего протоспейсера. Это означает, что для дезаминирования доступен только C, присутствующий между позициями 4 и 8, при этом РАМ соответствует положениям с 21 по 23 (Рисунок 7.) [171]. Следовательно, следующим этапом повышения эффективности редактирования должно стать расширение окна активности, но в то же время, если в окне активности или в непосредственном окружении присутствуют несколько нуклеотидов-мишеней, они могут подвергнуться сопутствующей нежелательной конверсии оснований. Поэтому необходимо учитывать оба направления корректировки размера окна активности и выбирать оптимальный вариант в зависимости от последовательности протоспейсера в каждом эксперименте. На окно активности может влиять ряд факторов, в том числе требование подходящего РАМ рядом с целевой последовательностью. Так редакторы оснований, в которых задействованы d/nCas9 *Streptococcus pyogenes*, ограничены редактированием геномных локусов, содержащих NGG РАМ. Для расширения возможностей редактирования были разработаны BE, содержащие

ортологи d/nCas9, распознающие PAM, отличные от NGG для которых окно активности смещается или расширяется до целевых оснований, которые в противном случае были бы недоступны из-за отсутствия оптимального PAM. В недавних публикациях Чжон Ю.Кён «Текущее состояние и проблемы инструментов редактирования оснований ДНК» [180] и Си-Юэ Ю «Расширение целевого диапазона системы редактирования оснований CRISPR за пределами NGG» [185] можно ознакомиться с подробной информацией вариантов BE, созданных на основе разных ортологов spCas9, сопоставление их активности и размера окон редактирования.

В качестве примера, рассмотрим несколько вариантов ортологов spCas9, задействованных в системах BE:

- nSpCas9-VQR распознает NGA PAM [186];
- nSpCas9-EQR распознает NGAG PAM [186];
- nSpCas9-VRER распознает NGCG PAM [186];
- nSpCas9-NG распознает NG PAM [187];
- nSpCas9 варианты совместимые с не-G PAM, а распознающие NRCH / NRTH / NRTN PAM, которые открыли доступ ранее недоступным геномным локусам [188];
- nCas9 *Staphylococcus aureus* (nSaCas9) распознает NNGRRT PAM, при этом имеет меньший размер и сопоставимую активность по сравнению с nSpCas9 [189; 190];
- nSaCas9-KKH, nSaKKH распознает NNNRRT PAM [191; 186];
- nCas9 *Staphylococcus auricularis* (nSauriCas9) распознает NNGG PAM [192];
- nCas9 *Streptococcus macacae* (nSpy-macCas9) распознает TAAA PAM [193].

Важно отметить, что BE *Staphylococcus aureus* имеют расширенное окно редактирования по сравнению с BE *Streptococcus pyogenes*, а именно позиции 3–12, что позволяет редактировать основания, расположенные ближе к PAM [186].

Интересный вариант Cas9 с циклической перестановкой (Cas9-CP). BE-Cas9-CP изменяет локализацию домена дезаминазы по отношению к R-петле и, таким образом, может обеспечить более эффективное преобразование оснований в более широком окне редактирования [194].

Cas12a (Cpf1) также используют для редактирования оснований. BE-dCas12a *Lachnospiraceae* (dLbCas12a или dLbCpf1) распознает TTTV PAM для эффективной конверсии цитидина в расширенном до 6 нуклеотидов окне редактирования [195]. Напротив, BE включающий миниатюрный вариант Cas12f (CasMINI) имеет очень узкое окно, всего из двух нуклеотидов [196]. Оптимизированные версии nCas12a *Acidaminococcus sp* – enAsCas12a и enAsCas12a-HF1 распознают TTTV, TTYN, VTTV, TRTV PAM, а BE-enAsCas12a и BE-enAsCas12a-HF1 демонстрируют улучшенную конверсию C→T [43].

Другим подходом расширить границы зависимости от РАРМ для редакторов оснований, стало создание нуклеазы SpRY. С помощью ВЕ, несущих в своей структуре SpRY, стало возможным нацеливаться на гены ранее недоступные для редактирования [40]. Однако, такая «релаксация» РАРМ снижает специфичность и способствует нецелевому редактированию оснований ДНК. Однако можно предвосхитить возникновение данных «опечаток» редактирования и принять ряд технологических мер по нивелированию проблемы. Рассматривают два типа нецелевых эффектов редакторов оснований ДНК – независимые или зависимые от гРНК [197]. Зависимое от гРНК нецелевое редактирование происходит, когда комплекс ВЕ направляется гРНК к последовательностям ДНК, схожим с протоспейсером. Хотя зависимое от гРНК нецелевое редактирование оснований происходит относительно редко, идентификация этих «опечаток» крайне важна. Для оценки потенциальных нецелевых эффектов ВЕ задействуют полногеномное секвенирование с использованием методов GUIDE-seq [198], Digenome-seq [199] и EndoV-seq [200]. Нивелировать эту проблему можно, задействуя высокоточные варианты Cas, осуществляя тщательный дизайн гРНК, используя РНП/RNP для доставки ВЕ в клетки. Случайные нецелевые мутации в геноме также происходят независимым от гРНК путем, особенно при высоком уровне экспрессии комплекса редактирования. Это явление существенно реже проявляется при использовании дезаминаз AmAPOBEC1, PrAPOBEC1, RrA3F, SsAPOBEC3B [201] и YE1 [202]. Сильное влияние на уровень нецелевого редактирования оказывает то, как дезаминаза гибридизируется с белком Cas [203]. Так, соединение с Cas через N-конец приводит к более частым «опечаткам» редактирования, чем при встраивании редактирующих ферментов в центральную зону (середины) nCas9 (такой вариант конструкции можно встретить с обозначением CE «stands for Cas Embedding») [204]. Логично, что редакторы оснований с более узкими окнами активности демонстрируют значительно меньший уровень нецелевого редактирования всего генома, потому что меньшее количество нуклеотидов доступно для редактирования как в целевых, так и в нецелевых сайтах [202], хотя такой подход часто влечет за собой компромисс между эффективностью и точностью редактирования. Как и в случае с гРНК-зависимыми «опечатками» ВЕ, способом снижения независимого от гРНК нецелевого редактирования является использование РНП или матричной РНК для доставки в клетку, что ограничивает экспрессию ВЕ по времени, уменьшая нецелевое редактирование [201].

Различные варианты дезаминазы также могут влиять на расположение и ширину окна активности, точность и специфичность редактирования (Таблица 3.). Например, классическая дезаминаза APOBEC1 *Rattus norvegicus* в составе CBE3 имеет окно активности в 5 нуклеотидов (позиции 4-8 протоспейсера) [171], но изменения аминокислотных остатков APOBEC1, участвующих в катализе и связывании ДНК, могут привести к сужению окна редактирования.

Так, мутации дезаминаз W90Y и W90F могут снижать гидрофобность активного центра дезаминазы и, соответственно, также снижать внутреннее сродство к ДНК. Такие замены уменьшают неспецифическое дезаминирование и сокращают окно редактирования до 3 нуклеотидов, при этом сохраняя высокий уровень целевого дезаминирования. Оба варианта R126E и R132E влияют на доступность оцДНК, сужают окно активности до 3 нуклеотидов, но снижают эффективность редактора оснований. Манипуляции с объединением мутаций показали, что комбинации W90Y&R126E (итоговое название YE1 или YE), W90Y&R132E (итоговое название YE2), R126E&R132E (итоговое название EE) привели к сужению окна активности до 2 нуклеотидов, при изменении эффективности редактирования оснований в ряду APOBEC1~YE1>YE2~EE. Однако, если пойти дальше и ввести тройную мутацию в APOBEC1 домен редактора CBE3, объединив W90Y/F& R132E&R126E (итоговое название YEE) окно активности не только сократиться до 2 нуклеотидов, но область редактирования сконцентрируется на цитозине в 6 положении протоспейсера, если и в положении 5 тоже будет расположен цитозин. Поэтому при описании мутанта YEE в некоторых публикациях можно встретить информацию, что окно сужается до 1 нуклеотида. В этой ситуации сильно повышается точность редактора, но при этом резко снижается эффективность [186]. Данное распределение эффективностей редакторов оснований с разными вариантами дезаминаз сохраняется и при переходе к более новым типам редакторов BE4, но эффект сужения окна варьирует от 3-4 нуклеотидов для YE1 и 1-3 для YEE. Анализ мутантов дезаминазы APOBEC1 в составе CBE4, по соотношению «размер окна активности / эффективность редактирования», привел к заключению, что именно мутация R132E ответственна за снижение эффективности. В связи с этим в тройном мутанте YEE была произведена замена R132E на Y120F, высоко консервативный сайт дезаминаз, расположенный рядом с активным центром и имеющий решающее значение для контакта с цитозином-мишенью. В итоге новая дезаминаза с тройной мутацией YFE-BE4max (W90Y&Y120F&R126E) продемонстрировала эффективность редактирования на уровне BE4 при сужении окна активности до 3 нуклеотидов [205].

Напротив, задействование цитидиндезаминазы *Homo sapiens* APOBEC3A (hA3A) расширяет окно редактирования по разным данным от 9 (позиции 3–11 протоспейсера) [206] до 12 нуклеотидов (позиции 2–13 протоспейсера) и улучшает преобразование C→T в метилированных областях генома [175]. А включение одноцепочечного ДНК-связывающего домена из белка RAD51 между nCas9 и hA3A расширяет окно редактирования до 13 нуклеотидов (позиции 3–15(~17) протоспейсера) [206]. Одновременное включение нескольких доменов дезаминазы в редактор оснований увеличивает доступность нуклеотидов ДНК-мишени в R-петле, тем самым расширяя окно редактирования оснований. Представителем этой технологии является система «BE-PLUS», nCas9 (D10A) & SunTag & scFv-APOBEC-UGI-GB1 &

sgRNA, где SunTag - довесок, содержащий 10 копий пептида GCN4 из 19 аминокислот. С SunTag специфически взаимодействует антитело с одноцепочечным варибельным фрагментом – scFv. Таким образом, действующий редактор оснований собирается при помощи вышеуказанного взаимодействия и содержит направляющую РНК, pCas9 и 10 молекул гибридного белка scFv-АРОВЕС-UGI-GB1. При этом GB1 домен G белка *Streptococcus* используется для предотвращения агрегации этой белковой конструкции [207]. В свою очередь, повышение точности редактирования hA3A было достигнуто за счет внесения аминокислотной замены N57G. eA3A вошла в состав редактора оснований третьего поколения (BE3). Для eA3A-BE3 была показана специфичность высокоточного, даже по сравнению с вышеописанными редакторами суженного окна, редактирования цитидина в мотиве TCR (R = A или G) [176]. Однако, осталась необходимость такого высокоточного редактирования цитидина и в других мотивах, в частности на целевых сайтах с несколькими С. Решением стала модернизация цитидиндезаминазы *Homo sapiens* АРОВЕС3G (hA3G) и создание на базе BE4max, редактора оснований eA3G-BE с контекстной специфичностью СС. Исходно hA3G имеет С-концевой каталитический домен и второй псевдокаталитический домен на N-конце, который сохраняет ту же пространственную укладку, но не является каталитически активным. В улучшенной версии hA3G был сконструирован С-концевой каталитический домен с образованием hA3G-CTD (eA3G), который преимущественно дезаминирует цитидины в соответствии с иерархией ССС>ССС>СС. Эффективность и точность eA3G-BE редактора была продемонстрирована на клетках человека и эмбрионах кролика, что указывает на потенциал использования в терапии генетических заболеваний и в создании животных моделей с измененным геномом для фундаментальных и доклинических исследований [208].

При использовании цитидиндезаминазы pmCDA1 *Petromyzon marinus* также можно достичь сужения окна редактирования. Система Target-AID позволяет сузить окно активности до 4 нуклеотидов (позиции 16-19 протоспейсера) [178]. Также способна сузить окно редактирования и серия С-концевых усечений PmCDA1, приводящих к возможности выборочного редактирования цитидина в положениях 15 или 16 протоспейсера [209]. Укорочение PmCDA1 возможно произвести не только с С-конца, но и с N-конца, что способствует снижению сродства дезаминазы к ДНК с целью сведения к минимуму неспецифического дезаминирования цитидина. За счет такого одновременного усечения N- и С-концов уменьшается количество участков с «открытыми» гидрофобными остатками, делая поверхность дезаминазы более «гладкой», а внесение мутации W122E и W139Q в эти гидрофобные остатки значительно повышает активность модернизированной цитидиндезаминазы (tCDA1EQ). В этой новой системе была удалена UGI, которая увеличивала скорость мутаций. Поскольку сконструированная tCDA1EQ имеет низкое сродство к ДНК и

менее стабильна, чем исходная PmCDA1, способ присоединения к nCas9 может оказывать огромное влияние на её свойство редактирования. Для минимизации возникновения данной проблемы, tCDA1EQ можно не только соединить с nCas9 через N-конец, но и встроить в середину белка Cas9. Действительно, tCDA1EQ присоединенная через N-конец, показала изменчивую эффективность редактирования, а встроенная внутрь Cas9 версия продемонстрировала стабильно высокую эффективность, сравнимую с редактором Target-AID. В итоге структура «tCDA1EQ - N конец - nCas9» была названа AID-2S, где 2S обозначают «Small & Specific» (маленький и специфичный), а встроенная – AID-3S, где 3S это «Small & Specific & Superior» (маленький, специфичный и улучшенный). Было показано, что AID-2S имеет более узкую область редактирования, тогда как AID-3S демонстрирует сдвиг окна активности в сторону последовательности PAM, по сравнению с исходным Target-AID. По эффективности, AID-2S и AID-3S продемонстрировали высокие результаты на уровне Target-AID, YE1 и YE2, при этом нецелевые эффекты были значительно снижены [210].

Использование улучшенной цитидиндезаминазы AID в составе редактора четвертого поколения, eAID-BE4max, обеспечивает окно редактирования в 11 нуклеотидов и редактирование C в контексте GC [211], а использование нескольких eгРНК, позволяет еще более значительно расширить окно редактирования [179].

Окно редактирования может быть изменено также ориентацией доменов в составе BE и/или свойствами связывающего их линкера (*Таблица 3.*):

- В целом, дезаминазы, соединенные с d/nCas9 через N-конец, имеют более широкие окна редактирования, чем соединенные через C-конец, вероятно, потому что эта ориентация обеспечивает более легкий доступ к оцДНК внутри R-петли [212; 213]. В структурах, где дезаминаза встроена в середину nCas, размер окна редактирования будет варьировать в зависимости от положения дезаминазы в белке [194; 203]. Предположительно, более близкое расстояние между дезаминазой и белком Cas9 приводит к более точному позиционированию дезаминазы на последовательности-мишени [212; 209].
- Модификация линкера между дезаминазой и белком Cas путем укорочения и/или изменения свойств линкера, например увеличения жесткости, приводит к сужению окна активности при сохранении высокой эффективности редактирования [212; 177]. Однако, была представлена и информация, что укороченный линкер существенно не изменяет окно редактирования [186; 176].

Для внесения случайных мутаций в заранее выбранные участки генома была разработана стратегия, использующая CRISPR-направляемые ДНК-полимеразы. ДНК-полимеразы способны создавать все 12 замен, а также делеции, в частности, ДНК-полимеразы, транслирующие односторонний разрыв ДНК, способны инициировать синтез на одноцепочечном разрыве в

двучепочечной ДНК, замещая нуклеотиды расположенные по ходу репликации, т.е. в сторону 3'-конца, а их флэп-эндонуклеазный домен впоследствии разрушает смещенные нуклеотиды, оставляя лигируемый одонитевой разрыв. Именно ДНК-полимеразы, транслирующие одонитевой разрыв ДНК, были задействованы в конструировании новой системы редактирования оснований. Далее было показано, что создание трех мутаций K848A, K1003A и R1060A в pCas9, чтобы способствовать диссоциации комплекса pCas9 и ДНК после разрыва целевого локуса, увеличивает частоту целевых мутаций. Данная усовершенствованная версия pCas9 была обозначена, как enCas9. В итоге гибридизация enCas9 с N-концом варианта ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (PolII), несущего мутации D424A, I709N и A759R (PolI3M) привела к созданию системы enCas9-PolI3M, которая была обозначена, как EvolvR. По сравнению с подходами направленного мутагенеза на основе dCas9-AIDx, где окно редактирования заключено в пределах пяти нуклеотидов, EvolvR способен непрерывно диверсифицировать все нуклеотиды в пределах настраиваемой длины окна, до 350 нуклеотидов, в определяемых локусах. Следовательно, pCas9-PolI3M генерирует более широкий спектр замещающих мутаций, чем dCas9-AIDx, что применимо для крупномасштабных генетических скринингов [214; 215].

Эффективность направленного мутагенеза дополнительно повышается при использовании системы CRISPR-X. В системе CRISPR-X, dCas9 и AID взаимодействуют посредством MS2-шпилек и MS2-связывающих белков. Две шпильки MS2, входящие в состав eРНК, рекрутируют два MS2-связывающих белка, которые соединены с  $\Delta$ AID. Использование MS2- $\Delta$ AID ограничивает локализацию AID в ядре и, как было продемонстрировано, улучшает эффективность образования мутации по сравнению с использованием полноразмерного AID. Более того, гиперактивный вариант AID с усиленной активностью соматической гипермутации увеличивал скорость мутагенеза до  $\sim 1/1000$  оснований. Экспериментально система CRISPR-X была успешно продемонстрирована для использования в направленной эволюции GFP в усиленный GFP (eGFP), а также для идентификации вариантов генов, устойчивых к бортезомибу [216]. Кроме того, CRISPR-X был использован для получения моноклональных антител человека с повышенной аффинностью к антигену в клеточной модели HEK293 [217].

В качестве альтернативного подхода увеличения точности редактирования можно рассматривать систему нековалентного «привлечения» цитозиндезаминазы к конкретной геномной C-мишени. Этот подход основан на идее отойти от классического ковалентного связывания дезаминазы с комплексом Cas9, которое неразрывно связывает события дезаминирования цитозина как на целевых участках генома, так и на близлежащих нежелательных мишенях. Напротив, нековалентное связывание должно способствовать разделению событий редактирования на целевом сайте и рядом с ним, тем самым повышая



вероятность точных мутаций с заменой одного основания. Ключевыми игроками этой системы становятся белки, которые связывают дезаминазу, не блокируя активный сайт от взаимодействия с С-мишенью. Эти белки в связи с комплексом Cas9n/gRNA, используются для «привлечения» коэкспрессируемого фермента АРОВЕС для редактирования целевого цитозина. Отталкиваясь от ассоциации данного процесса с физическим процессом магнетизма, данная технология была названа *магнитным редактором*, MagnEdit [218].

Альтернативным подходом к разработке редакторов оснований стало использование дезаминаз аденина – АВЕ. АВЕ сконструирована на основе ВЕЗ и состоит из nCas, связанной аденозиндезаминазы и гидовой РНК. Система функционирования АВЕ подобна работе СВЕ. Комплекс АВЕ связывается с ДНК-мишенью, после чего аденозиндезаминаза превращает аденозин в инозин, создавая из Т•А пару Т•I, затем путем MMR последовательно Т•I преобразуется в С•I и в итоге в С•G. Отсутствие природной ДНК-аденозиндезаминазы для нацеливания и преобразования оснований А→G привело к созданию искусственного фермента, мутантной версии аденозиндезаминазы тРНК *Escherichia coli* (TadA<sup>wt</sup>) – TadA\*, способную эффективно дезаминировать около 53 процентов аденозина в ДНК (Рисунок 7.). В зависимости от вводимых в гомодимер TadA мутаций были созданы версии АВЕ нескольких поколений, подробно описанные в работе Николь М. Гауделли в 2017 году [219]. Среди них выделяют наиболее эффективные АВЕ6.3, АВЕ7.8, АВЕ7.9 с окнами редактирования в 3 нуклеотида (позиции 8–10 протоспейсера) и АВЕ7.10 с окном редактирования в 4 нуклеотида (позиции 4-7 протоспейсера), которая состоит из гетеродимера TadA\*-TadA<sup>wt</sup>. Кроме того, АВЕ7.10 демонстрирует высокоэффективное редактирование аденозина в линиях клеток мышей [220] и человека [219]. Активность АВЕ7.10 была дополнительно усилена путем модификации NLS и оптимизации кодонов до версии АВЕmax [184] Стратегии для изменения окна активности для АВЕ развивались сходным путем, как и для СВЕ. В зависимости от поставленной экспериментальной задачи окно редактирования можно сузить, вводя, например, мутацию F148A в домен TadA [221], или расширить, используя Cas9-CP [194] а также вышеописанную систему SpRY [40]. Подход с заменой классического SpCas9 ортологами позволил проводить конверсию А→С в геномных сайтах, содержащих *не-NGG* PAM [222; 188] Например, nSpCas9 был заменен на nSaKKH или nSpCas9-VQR в АВЕ7.10 и АВЕmax для создания редакторов основания аденина, нацеленных на сайты, содержащие NNNRRT и NGA PAM, соответственно. При этом Sa-АВЕmax и SaKKH-АВЕmax имеют большое окно редактирования (позиции 4–14 протоспейсера), хотя эффективность редактирования невысока [223; 194]. Использование xCas9, разработанную для работы с широким спектром последовательностей PAM [192], в АВЕ7.10 и АВЕmax позволило распознавать широкий спектр последовательностей *не-NGG* PAM, включая NR, NG, GAA и GAT [194]. Однако, в отличие от усовершенствованных версий СВЕ, АВЕ,

сконструированные с ортологами SpCas9, показали более низкую эффективность редактирования оснований по сравнению с каноническим ABE, потому что белок TadA изначально усовершенствовали в виде гибрида с SpCas9. Чтобы решить эту проблему, путем удаления TadA<sup>wt</sup> и введения дополнительных восьми мутаций в TadA\*, были разработаны новые TadA с более быстрой кинетикой дезаминирования – TadA-8e и TadA-8s. Важно, что удаление из гетеродимера TadA<sup>wt</sup> не повлияло на активность редактирования ABE8, что указывает на то, что оптимизированный TadA-8e/s может эффективно работать как мономер [224; 198]. Так, ABE8e проявляет более высокую эффективность редактирования по сравнению с ABE7.10 при сочетании дезаминазы не только с SpCas9, но и с SpnCas9-NG, SaCas9, SaCas9-KKH, LbCas12a, enAsCas12a, и демонстрирует более широкое окно активности (позиции 3–10 протоспейсера) [224]. Со своей стороны, ABE8s также показал высокую эффективность редактирования в сочетании с SaCas9 и SpCas9-NG [198]. Менее эффективной, по сравнению с TadA-8, но не менее интересной является новая версия аденозиндезаминазы с добавлением мутаций V82G и A56G, и тоже с исключенным TadA<sup>wt</sup>. Идея этой двойной мутации заключается в том, что включение мутации V82G (версия miniABE) нивелирует неспецифическое сродство к РНК-субстратам [225], что является проблемой редакторов оснований как ABE, так и CBE, которые могут индуцировать независимое от гРНК редактирование оснований РНК в масштабах всего транскриптома [226]. Однако, на фоне решения проблемы нецелевого редактирования РНК, мутация V82G также снижает сродство TadA к ДНК-субстратам, что конечно отрицательно влияет на эффективность редактирования. Поэтому в miniABE была добавлена вторая мутация A56G для увеличения сродства к ДНК-мишени. В итоге версия TadA-A56G&V82G обладает хорошей эффективностью редактирования ДНК-мишени, на фоне сниженной нецелевой активности дезаминирования РНК [227]. Дополнительно с большинством модификаций ABE можно ознакомиться в публикации Чжон Ю.Кён «Текущее состояние и проблемы инструментов редактирования оснований ДНК» [180].

Следующей ступенью в развитии технологии редакторов оснований стала возможность целевой конверсии C→G. Сначала был представлен редактор оснований, обозначенный как GBE, осуществляющий трансверсии C→A в *Escherichia coli* и C→G в клетках млекопитающих. GBE состоит из pCas9, цитидиндезаминазы и Ung. Важным отличием данной системы от ранее описанных является замена домена UGI на саму UNG. После дезаминирования и образования дезоксиуридинового остатка урацил-ДНК гликозилаза вырезает основание U, созданное дезаминазой, образуя AP сайт. В то же самое время никазная активность pCas9 вносит одноцепочечный разрыв, создавая предпосылки для удлинения 3'-конца этого разрыва, используя в качестве матрицы ДНК цепь, содержащую AP-сайт. В зависимости от организма и свойств ДНК-полимераз, осуществляющих репарацию, напротив AP-сайта могут встраиваться

разные нуклеотиды. Для трансверсии C→A *Escherichia coli* используют в качестве цитидиндезаминазы AID, а в клетках млекопитающих в трансверсии C→G задействована rAPOBEC1. Данная система rAPOBEC-nCas9-Ung показала высокую специфичность редактирования в шестой позиции протоспейсера с эффективностью редактирования от 5,3% до 53,0% [228]. Параллельно другой научной группой был разработан редактор оснований C→G на основе платформы BE4max [229]. Первым этапом трансформации BE4max стало удаление двух UGI для создания BE4maxΔUGI, что привело к увеличению количества конверсий C→G и в меньшей степени C→A, при этом наиболее эффективное редактирование также наблюдалось в шестом положении протоспейсера [229]. В качестве цитидиндезаминазы была выбрана rAPOBEC1 с мутацией R33A, для которой была показана сниженная нецелевая активность редактирования РНК и ДНК [226]. После добавления к амино-концу BE4maxΔUGI ортолога UNG из *Escherichia coli* (eUNG) была сформирована система BE4max(R33A)ΔUGI, обозначенная как CGBE1 (Рисунок 7.). Несмотря на высокую эффективность целевого редактирования C→G, редактор оснований CGBE1 оказался довольно громоздким. Для сокращения его размера были произведены несколько делеций. Из CGBE1 был удален домен eUNG, что значительно уменьшило размер редактора на фоне умеренного снижения эффективности. Новая система была обозначена как miniCGBE1 [229]. В отличие от UNG-опосредованной трансверсии C→G [228; 229], где количество переходов C•G→G•C зависит от увеличения генерации AP сайтов, была разработана новая система CGBE, основанная на манипулировании репарацией ДНК после создания AP сайта. Так, при создании AP сайта в Cas9-индуцированной R-петле клеточный UNG замещается APE1, после чего XRCC1 рекрутирует компоненты BER, такие как ДНК-полимераза β (Pol β) и ДНК-лигазы, для заполнения «пробела» гуанозином. Последующая мисматч-репарация ДНК преобразует несоответствие G•G в G•C (Рисунок 7.) [230]. Каждая система описывается как высокоэффективная и обладает широким потенциалом применения в научных и терапевтических целях. Также есть возможность сконструировать уникальные CGBE с различными профилями редактирования. Для предсказания эффективности той или иной модификации редактора оснований, частоты редактирования C•G→G•C и определения оптимальных стратегий редактирования, разработаны модели машинного обучения CGBE-Hive [231].

Недавно стало возможным редактирование оснований в контексте двуцепочечной ДНК, ранее недоступных из-за специфичной для одноцепочечной ДНК активности цитидин- и аденозиндезаминаз. Было показано, что DddA – токсин, секретируемый бактериями *Burkholderia cenocepacia* для индукции репликационного стресса ДНК [232] и нестабильности генома у других бактерий, проявляет активность цитидиндезаминазы в отношении

двухцепочечной ДНК [233]. Для замены пары оснований С•G на Т•А в двухцепочечной ДНК как клеточных линий, так и мышей, был сконструирован редактор DdCBE путем разделения токсичного домена DddA на две нетоксичные части, соединения с UGI и ДНК-связывающими активаторами транскрипции TALE, что позволило восстановить функциональный домен цитидиндезаминазы (*Рисунок 8.*) [234; 235]. Данный редактор может работать не только с ядерной, но и с митохондриальной ДНК, что дает колоссальный толчок в исследованиях митохондриальных заболеваний, ведь более 90% патогенных мутаций мтДНК являются точечными [236], тогда как известные редакторы оснований, управляемые РНК, не подходят для редактирования мтДНК, поскольку направляющие РНК не могут быть доставлены в митохондрии [237]. Для расширения возможностей подобных систем был разработан редактор оснований TALEД, преобразующий А в G в мтДНК. Его отличие от DdCBE, заключается в использовании нетоксичного полноразмерного варианта DddA с мутацией активного сайта E1347A, дезоксиаденозиндезаминазы, полученной из TadA слитой с TALE [238].

В принципе, используя вышеописанные режимы редакторов оснований можно реализовать многоэтапное редактирование. Например, мишень С в С•G может быть первоначально превращена в U с помощью CBE (U•G), а U•G, в свою очередь, может быть преобразована в Т•А с помощью механизмов репликации и репарации клеточной ДНК. В качестве альтернативы С•G можно превратить в G•C с помощью CGBE с последующим опосредованным CBE преобразованием получившейся пары G•C в А•Т. Эта стратегия может затем преобразовать целевой С в Т (CBE), G (CGBE) или А (CGBE + CBE). Точно так же А можно преобразовать в G (ABE), С (ABE + CGBE) или Т (ABE + CGBE + CBE). Тем не менее, многоэтапное редактирование трудно обеспечить с высокой эффективностью и специфичностью из-за ряда ограничений метода редактирования оснований. Редактирование оснований ограничено окном высокой дезаминазной активности, расположенным в определенном положении относительно последовательности PAM. Кроме того, на результат и эффективность редактирования может влиять контекст последовательности целевого локуса. Наличие нескольких редактируемых азотистых оснований в окне активности, а иногда и за его пределами, может привести к нежелательным мутациям [228; [239; 240; 241]. Несмотря на ряд исследований по разработке большого набора редакторов с различными требованиями к PAM и разными окнами редактирования, более высокой эффективностью редактирования и уменьшенным количеством нецелевых мутаций, совместная трансфекция редакторов разных оснований дает низкий коэффициент совместной конверсии А→G и С→Т. Скорее всего это связано и с конкуренцией между разными редакторами оснований за целевой сайт [242].

В 2020 году был представлен ряд редакторов оснований для синхронного введения замен А→G и С→Т в одном и том же целевом сайте. Путем гибридизации цитидиндезаминазы и

адениндезаминазы вместе с pCas9 и гРНК были сконструированы двойные редакторы оснований как для растений, так и для млекопитающих:

1. *STEME* (saturated targeted endogenous mutagenesis editors) в протопластах риса одновременно редактирует цитозин и аденин в одном и том же сайте-мишени с эффективностью 15,10% [243].
2. *SPACE* создан на платформах miniABEmax-V82G 6 и Target-AID с добавлением двух UGI. Несмотря на то, что при непосредственном сравнении SPACE уступает как miniABEmax-V82G по редактированию A→G, так и Target-AID по редактированию C→T, по эффективности SPACE, важным преимуществом этого редактора остается возможность одновременно вводить более одного типа оснований [244].
3. *Target-ACEmax* объединил в себе цитидиндезаминазу PmCDA1 и аденозиндезаминазу TadA для эффективного синхронного редактирования A→G и C→T в клетках HEK293T [245].
4. *A&C-BEmax* сконструирован из цитидиндезаминазы hAID, соединенной с N-концом редактора аденина ABE7.10. Оказалось, что AID *Homo sapiens* обладает более высокой активностью, чем gAPOBEC1. При этом адениндезаминаза тоже должна быть присоединена к pCas9 через N-конец, это важно для высокой эффективности. Комплекс ABE7.10-N-hAIDmax содержит NLS, что увеличивает активность двухкомпонентного редактирования, больше за счет повышения активности CBE, чем ABE. Финальная версия A&C-BEmax дополнена двумя копиями UGI (Рисунок 8.). В итоге A&C-BEmax при сравнении независимого редактирования A→G и C→T показал средний уровень эффективности аналогичный показателям ABEmax и AID-BE4max. По сравнению с A&C-BEmax, совместная трансфекция CBE и ABE7.10 с шестью eгРНК дала очень низкий коэффициент одновременной конверсии A/C для большинства целей. A&C-BEmax проявил высокий уровень эффективности одновременной конверсии не только в клетках HeLa и HEK293T, но и в моделях генетических заболеваний человека, например, β-гемоглобинопатии, и A&C-BEmax даже рассматривают, как возможный терапевтический агент [242].
5. *ACBE* объединяет возможности редакторов Target-AID и ABE-7.10 (Рисунок 8.). В системе ACBE цитозиндезаминаза PmCDA1 и UGI в составе Target-AID соединены через C-конец с редактором основания аденина ABE-7.10, который присоединен к pCas9 через N-конец, при этом NLS расположен в N- и C-концевых участках. В отличие от вышеописанных, особенностью ACBE редактора, считают эффективность введения одновременных точечных мутаций A→G и C→T в соматических клетках млекопитающих – эмбриональных фибробластах мыши и эмбриональных фибробластах свиньи. Данные тест-системы были выбраны для демонстрации возможности применения редактора оснований для создания

трансгенных животных с помощью метода переноса ядер соматических клеток, и коррекции генетических заболеваний человека [246].

6. *AGBE* был представлен одной из последних разработок редакторов нескольких оснований. Система *AGBE*, опосредованная двойной дезаминазой, представляет собой универсальный инструмент для одновременного введения 4 типов конверсий оснований  $C \rightarrow G$ ,  $C \rightarrow T$ ,  $C \rightarrow A$ ,  $A \rightarrow G$ , а также *InDel* на одной и той же цепи ДНК в сайтах-мишенях (Рисунок 8.). Эффективность *AGBE* была показана не только для создания животных с измененным геномом, но и для использования в системе лечения генетических заболеваний в клинической практике.

Редактор *AGBE* сконструирован на платформах *CGBE* и *ABE*. Для максимальной эффективности и компактности были подобраны оптимальные структуры *CGBE* и *ABE* в составе итоговой версии полиредактора *miniAGBE-4* [247]:

- В составе *CGBE* была произведена замена цитидиндезаминазы *rAPOBEC1* (R33A) на мутантную версию *hAPOBEC3A – APOBEC3Ai*. Исходная *hAPOBEC3A* оказалась токсична для бактерий и не подходящей для формирования векторов *hAPOBEC3A-nCas9* из *E. coli*. А новая *APOBEC3Ai* содержит искусственный интрон в кодирующей последовательности для предотвращения экспрессии функционального белка *APOBEC3A* из-за отсутствия эндогенного механизма сплайсинга мРНК в прокариотических клетках. В итоге, используя *APOBEC3Ai*, можно сформировать функциональные мРНК дезаминазы *hAPOBEC3A*, поскольку эукариотические клетки обладают эндогенным механизмом сплайсинга мРНК.
- Как и в случае редактора *miniCGBE1*, из *AGBE* удалена *eUNG*, что существенно не влияет на эффективность редактирования, т.к. количество эндогенного *UNG* является достаточным для удаления урацила. И конечно, преобразование *AGBE* в *miniAGBE-4* значительно уменьшает размеры редактора и, следовательно, облегчает проникновение соответствующей генетической конструкции в клетку.
- Функциональная компонента *miniAGBE-4*, осуществляющая переход  $A \rightarrow G$ , представлена *ABE8e(V106W)*, заменив *ABEmax* в первоначальных конструктах *AGBE*. *ABE8e(V106W)* содержит высокоэффективную мономерную аденозиндезаминазу *ecTadA8e(V106W)*, которая также снижает и нецелевую активность редактора, по сравнению с *ecTadA-TadA\*7.10* в составе *ABEmax*.

Дополнительным применением Редакторов оснований стала возможность введения преждевременного стоп кодона в середину гена-мишени для дестабилизации его экспрессии. Два независимых подхода, обозначенные *CRISPR-STOP* и *iSTOP*, демонстрируют, что *BE3* может создавать стоп-кодоны путем преобразования кодонов *CAA*, *CAG*, *CGA* и/или *TGG* в стоп-кодоны *TAA*, *TAG* и *TGA* в целевых генах [248; 249]. Редактор *ABEmax* также может быть

задействован в данном направлении, создавая мутации стартового кодона ATG. Эта стратегия обозначена i-Silence и включает преобразование ATG в GTG / ACG, тем самым подавляя экспрессию целевого гена. В отличие от CRISPR-STOP и iSTOP, дестабилизация генов с помощью i-Silence не приводит к образованию укороченных вариантов белка, поскольку начало трансляции блокируется [250]. Посредством преобразования A→G или T→C, другая система, CRISPR-pass, преобразует преждевременный стоп кодон в кодоны глутамина (CAA или CAG) или аргинина (CGA), обеспечивая продолжение трансляции [251]. Ещё одним применением для Редакторов оснований стала способность программированного пропуска экзонов, путем мутации оснований ДНК-мишени в акцепторных сайтах сплайсинга. Система CRISPR-SKIP в акцепторных сайтах сплайсинга осуществляет трансформацию G, на который заканчивается большинство интронов, в A через редактирование C в комплементарной цепи целевого сайта. В результате соответствующие экзоны не включаются в зрелые транскрипты, в то время как другие экзоны экспрессируются нормально [252].

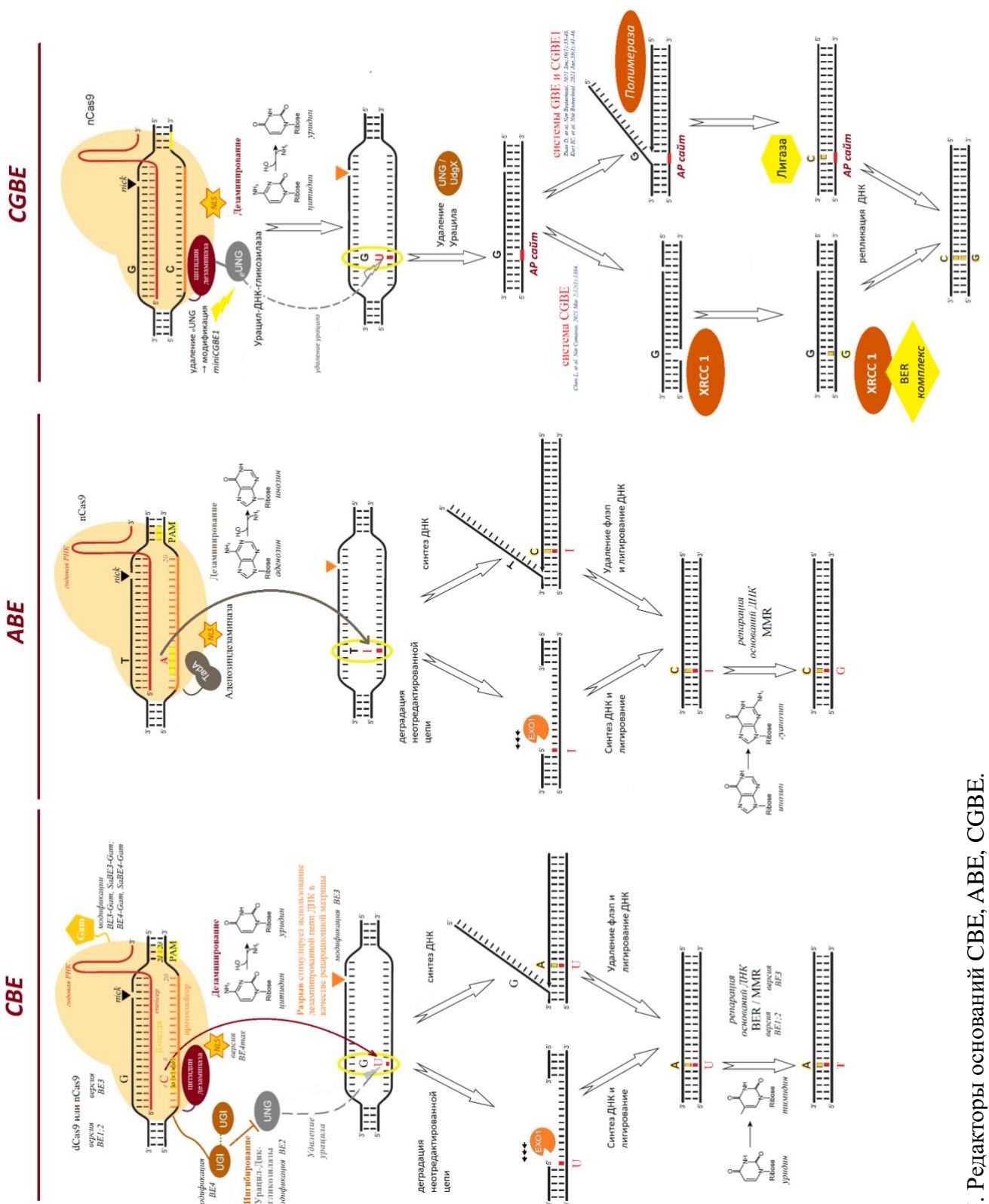


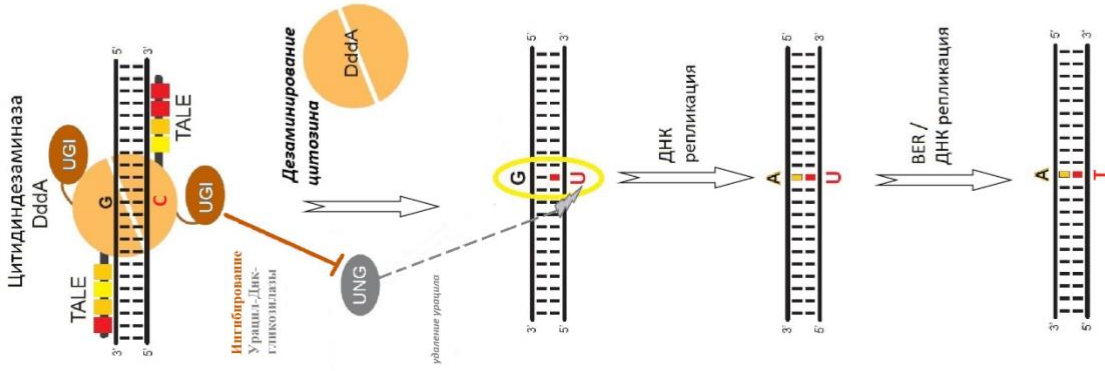
Рисунок 7. Редакторы оснований CBE, ABE, CGBE.



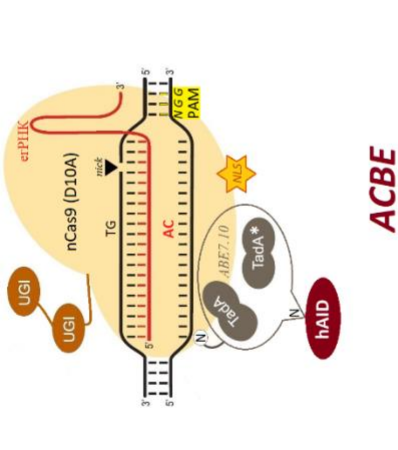
Таблица 3. Основные варианты редакторов СВЕ и АВЕ.

Обозначение Редактора оснований	Структура редактора оснований	Окно активности	Предпочтительная последовательность
BE3	гАРОВЕС1-XTEN-nCas9-UGI	C4-C8	TC
Target-AID	nCas9-linker-PmCDA1-UGI	C2-C5	нет
CDA1-BE3	PmCDA1-XTEN-nCas9-UGI	C1-C7	нет
CDA1Δ-BE3	PmCDA1Δ-nCas9-UGI	C3-C4	нет
YE1-BE3	гАРОВЕС1 (W90Y/R126E)-XTEN-nCas9-UGI	C5-C7	TC
YE2-BE3	гАРОВЕС1 (W90Y/R132E)-XTEN-nCas9-UGI	C5-C6	TC
YE3-BE3	гАРОВЕС1 (W90Y/R126E/R132E)-XTEN-nCas9-UGI	C5-C6	TC
SECURE-BE3	гАРОВЕС1 (R33A or R33A/K34A)-XTEN-nCas9-UGI	C5-C7	TC
SaBE3	гАРОВЕС1-XTEN-Sa nCas9-UGI	C3-C12	TC
dCpf1-BE	гАРОВЕС1-XTEN-dCpf1-UGI	C8-C13	TC
A3A-BE3	hA3A-XTEN-nCas9-UGI	C4-C8	нет
eA3A-BE3	hA3A(N57G)-XTEN-nCas9-UGI	C4-C8	TC
A3AΔ-BE3	hA3AΔ-nCas9-UGI	C5-C6	нет
BE-PLUS	GCN4(10x)-nCas9 scFv-rAPOBEC1-UGI	C4-C14	TC
AID-BE3	hAID-XTEN-nCas9-UGI	C3-C8	нет
TAM	dCas9-linker-hAID(P182X)	C4-C8	нет
CRISPR-X	dCas9/MS2-linker-hAIDΔ	C-50-C50	нет
A3G-BE3	hA3G-XTEN-nCas9-UGI	C4-C8	CC
eA3G-BE	hA3G-CTD-XTEN-nCas9-2*UGI	C4-C8	CC
ABE7.10	TadA-linker-evoTadA-linker-nCas9	A4-A7	нет
ABE7.10 <sup>F148A</sup>	TadA <sup>F148A</sup> -evoTadA <sup>F148A</sup> -linker-nCas9	A5	нет
dCasMINI-ABE	TadA-linker-evoTadA-linker- dCasMINI	A3-A4	нет
CP-ABEs	TadA-linker-evoTadA-linker-CP-nCas9s	A4-A12	нет

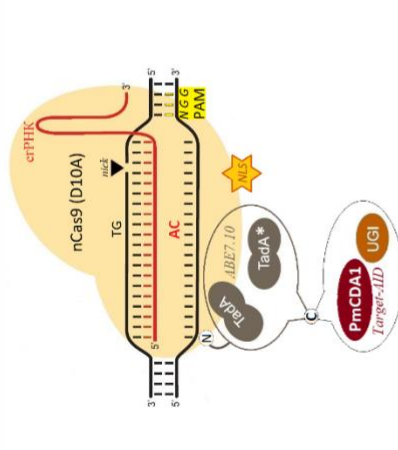
**дц ДНК**



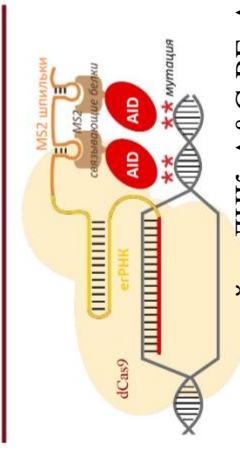
**A&C-BE**



**ACBE**



**dCas & eRNK-MS2-AID CRISPR-X**



**AGBE**

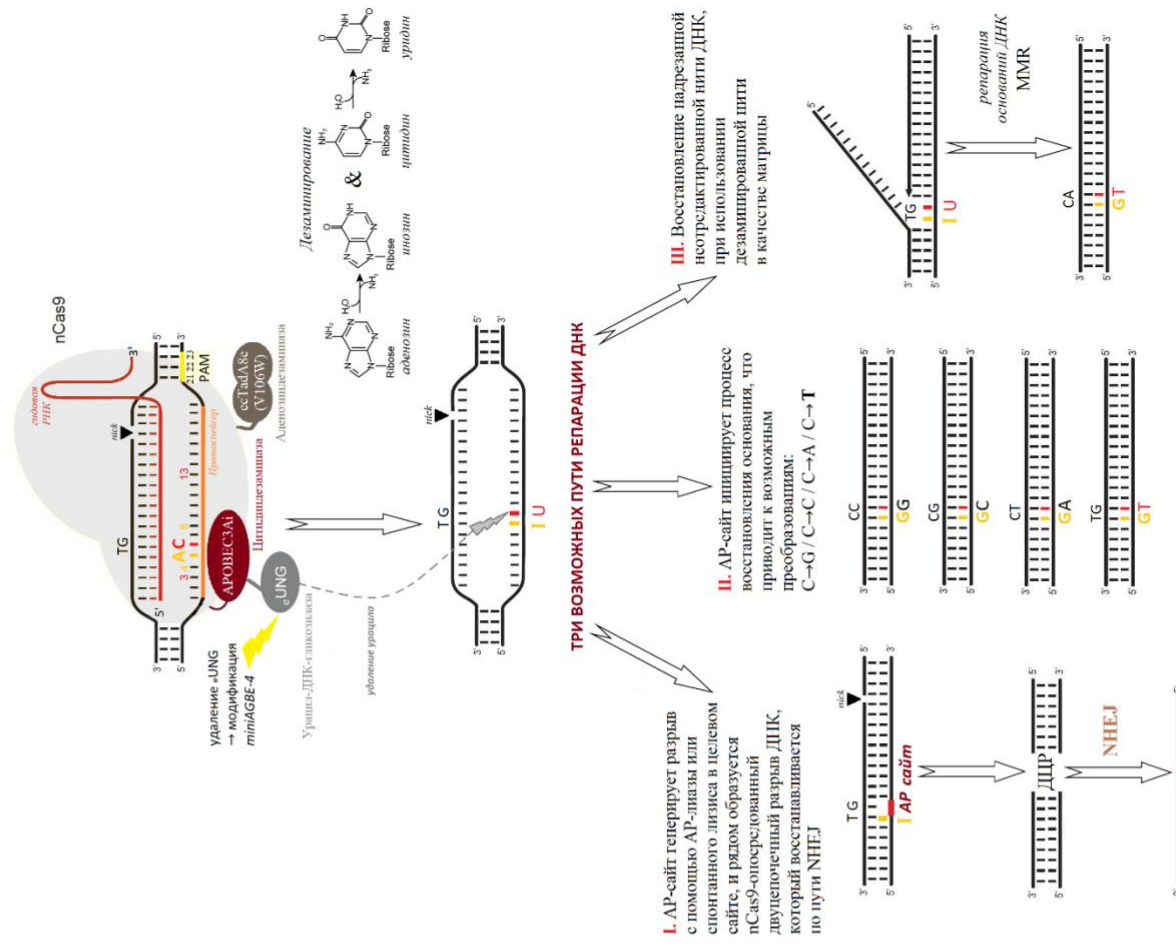


Рисунок 8. Редакторы оснований дцДНК, A&C-BE, ACBE, **CRISPR-X**, AGBE.

## Праймированное редактирование

На основе технологии редактирования оснований и CRISPR/Cas9 была разработана технология Праймированного Редактирования (PE) способная выполнять все 12 возможных преобразований, вставок и делеций от основания к основанию. В отличие от HDR, PE не зависит от образования двуцепочечных разрывов ДНК или синтетических экзогенных донорных молекул ДНК для замены целевых геномных последовательностей, более того, расширяет возможности редактирования генома, позволяя, чисто теоретически, исправить до 89% мутаций для более чем 75000 генетических заболеваний человека, о которых сообщается в ClinVar [253; 254]. PE более универсален, чем HDR, т.к. способен вводить точечные мутации на большие (> 30 п.н.) расстояния от места разрыва, а не только в пределах 10 п.н. [255] Более высокая специфичность PE по сравнению с классическим CRISPR/Cas9 может быть обусловлена тремя последовательными гибридизациями: между ДНК-мишенью и спейсером в молекуле регРНК, между ДНК-мишенью и PBS в молекуле регРНК и между ДНК-мишенью и редактируемым флэпом ДНК [256]. Хотя эффективность редактирования PE еще не сравнима с эффективностью BE, но данная система непрерывно модернизируется и её эффективность редактирования, при определенных условиях, может достигать более 50% [255; 257]. Технология PE применима в фундаментальных и медицинских исследованиях не только на клеточных культурах [253] и мелких лабораторных грызунах [258], но и на моделях органоидных культур [259], лабораторных рыб *Danio rerio* [260], плодовых мушек *Drosophila melanogaster* [261], кроликах [262], а также используется в сельском хозяйстве [263; 264; 257].

PE сконструированы путем сочетания обратной транскриптазы вируса мышиноного лейкоза Молони с С-концом nCas9. В данной системе задействована специфическая 3'-удлиненная еРНК, содержащая PBS и RT-матрицу (регРНК). Общий принцип работы PE заключается в том, что система, направляемая регРНК, связывается с ДНК-мишенью, nCas9 создает разрыв в цепи ДНК, содержащей РАМ, обнажает ее 3'-концевую гидроксильную группу. Созданный таким образом одноцепочечный участок ДНК со свободным 3'-концом связывается с PBS на регРНК. Далее RT связывается с 3'-концом экспонированной цепи ДНК-мишени и выполняет обратную транскрипцию участка регРНК, после чего нередатируемый выступающий 5'-флэп на цепи, содержащей РАМ, разрушается клеточными эндонуклеазами. Наконец, происходит лигирование и репарация ДНК с образованием желаемой последовательности ДНК (Рисунок 9.) [253].

Разработаны три основные версии такого рода редакторов. PE1 был получен путем слияния С-конца nCas9 (H840A) с M-MLV RT и вместе с регРНК продемонстрировал

эффективность от 0,7% до 5,5% при использовании точечных трансверсий [253]. Во второй версии PE были внесены три мутации (D200N, L603W и T330P) в M-MLV RT для увеличения активности RT при более высоких температурах, две дополнительные мутации (T306K и W313F) для усиления связывания RT с комплексом *reg*РНК. В итоге PE2 эффективнее PE1 в 1,6–5,1 раза [256]. PE3 был разработан со стратегией устранения неопределенности в редактировании 5'-флэпа, который спаривается с немодифицированной цепью ДНК. Для этого PE использует дополнительную *eg*РНК, которая приводит к образованию разрыва в неотредактируемой цепи с помощью *pCas9*, используя эндогенный путь восстановления несоответствия для сохранения информации об отредактированной цепи. Благодаря этому подходу все 12 комбинаций оснований могут быть получены с эффективностью 33%, что аналогично уровню эффективности существующих цитозин-адениновых редакторов оснований, а количество нецелевых эффектов и нежелательных мутаций стало ниже по сравнению с использованием CRISPR/Cas9 (*Рисунок 9.*) [182]. Развитие PE следующих поколений было основано на подавлении MMR [265]. Были предложены более эффективные системы, где редактирование осуществляется на фоне временной экспрессии белка-репрессора MMR (MLH1dn). Редактор с подавленной активностью MMR, сконструированный на базе PE2 был обозначен, как PE4, а основанный на PE3, соответственной, назвали PE5. Кроме того, редакторы со второго по пятое поколение были модернизированы до версии PE<sub>max</sub> за счет использования кодон-оптимизированной RT человека, линкера из 34 аминокислот, двухкомпонентной последовательности NLS SV40, который увеличивает соотношение ядерной и цитоплазматической концентраций белка, дополнительной С-концевой последовательностью (*c-Myc* NLS), которая включает остатки Pro320-Asp328, что позволяет осуществлять транспорт в ядро, а так же за счет включения в *SpCas9* мутаций R221K и N394K, улучшающих активность нуклеазы. Эта новая система в клетках с MMR превзошла по эффективности редактирования классический PE2 в 2,8 раза и в 1,2 раза в клетках с дефицитом MMR [266; 265].

Несмотря на все преимущества и стремление усовершенствовать технологию PE, непосредственные прикладные исследования демонстрируют некоторые расхождения в оценке её эффективности [267; 268; 269; 265; 270]. В настоящее время основными ограничениями PE являются его крупный размер, зависимость от целевых сайтов и типов клеток, более сложный дизайн гидовой РНК. В стремлении усовершенствовать систему, были разработаны различные модификации PE в которых в той или иной степени были устранены многие из барьеров (*Таблица 4.*). Например, повысить эффективность PE оказалось возможно за счет добавления к N-концу PE2 пептидов IGF<sub>1</sub> и NFATC2IP<sub>1</sub>, связанных с репарацией ДНК (модификация IN-PE2) [271] или при добавлении к PE2 ДНК-связывающего домена Rad51 (модификация huPE2) [272].

Расширение диапазона редактирования систем PE зависит в основном от белка Cas, который распознает последовательность PAM. Системы PE первых трех поколений сконструированы на основе SpCas9, распознающего NGG последовательности PAM, которые встречаются в среднем один раз в каждых 16 случайно выбранных геномных локусах, что сильно ограничивает диапазон мишеней для редактирования генов [253]. Задействование таких вариантов SpCas9, как NG, SpG, SpRY, VQR, VRQR и VRER, после введения мутации H840A, в систему PE второго поколения, привело к следующим результатам [273]:

- модификации PE2-NG, PE2-SpG и PE2-SpRY позволяют редактировать сайты рядом с PAM NGN;
- оба варианта PE2-VQR и PE2-VRQR активны в 5 из 7 сайтов NGA PAM;
- PE2-VRER предпочитает NGCG другим последовательностям PAM;
- PE2-SpG демонстрирует самую высокую активность в сайтах NGA/C/T;
- PE2-SpRY функционирует независимо от вариаций последовательности PAM (активен в 43 из 58 сайтов), хотя и со сниженной активностью.

Модификация regPНК и её компонентов тоже способствует повышению эффективности PE. Так, было показано, что увеличение длины PBS позволяет повысить активность regPНК с 3,29% для 9-нуклеотидного PBS до 16,6% для 13-нуклеотидного PBS [273]. А добавление в RT-матрицу синонимичных мутаций, т.е. мутаций, при которых изменение последовательности оснований гена не приводит к изменению аминокислотной последовательности белка, формирует версию spregPНК, за счет которой эффективность PE увеличивается в разы [274]. Для классической regPНК свойственно закичивание во время отжига в связи с тем, что PBS на 3'-конце regPНК комплементарен части спейсера на 5'-конце, а это препятствует работе PE. Предотвратить этот феномен можно, защитив 3'-конец формированием шпильки за счет присоединения к нему сайта узнавания Csy4 из 20 нуклеотидов. Гибридизация Csy4-T2A (рибонуклеаза Csy) с pCas9 и комплексом RT на базе PE третьего поколения, привела к созданию более эффективной версии ePE [275]. Также 3'-конец нуждается в «защите» в связи с тем, что 3'-концевая часть regPНК подвержена экзонуклеолитической деградации, что угрожает потерей PBS, и как следствие снижает эффективность редактирования PE. Для решения этой проблемы предлагается добавить к 3'-концу псевдоузел, представляющий собой модифицированный аптамер evoreQ1. Этот аптамер длиной 42 нуклеотида минимальный по размеру класс природных структурных последовательностей РНК с четко определенной третичной структурой. regPНК с добавлением «псевдоузла» на 3'-конце была обозначена, как ePregPНК и дополнительно усовершенствована 8-нуклеотидным линкером между 3'-концом PBS и evoreQ1 для уменьшения возможности вмешательства аптамера в функцию regPНК [270]. Защитить от деградации 3'-концевую часть regPНК можно и с помощью добавления к 3'-концу

РНК-мотива, устойчивого к вирусной экзорибонуклеазе с образованием версии хгРНК [276]. Аналогичную цель преследует и технология добавления на 3'-конец G-квадруплекса hTR (теломеразная РНК человека) [277]. Другим подходом добиться стабилизации regРНК с целью повышения эффективности PE стало включение С•G или замены других пар оснований на С•G в шпильке гидовой РНК. Такой вариант направляющей РНК обозначается как aregРНК [274]. Расширить возможности PE осуществимо за счет использования сразу двух regРНК. В сочетании с сайт-специфичной рекомбиназой, система PE с задействованными двумя regРНК (twinPE) способна реализовать целевую интеграцию ДНК-плазмид размером более 5000 п.н. и инверсию последовательностей в 40 т.п.н. в клетках человека [278].

Исследования по модернизации технологий PE и BE ведутся параллельно. Стратегия DAP «Drive-And-Process» была реализована для мультиплексного редактирования оснований до 31 локуса и мультиплексного праймированного редактирования до 3 локусов. DAP существенно снизило Cas9-зависимое нецелевое редактирование ДНК, кроме того, системы мультиплексного редактирования оснований и праймированного редактирования были приспособлены для использования с AAV и ЛВ доставкой для одновременного редактирования нескольких локусов [279].

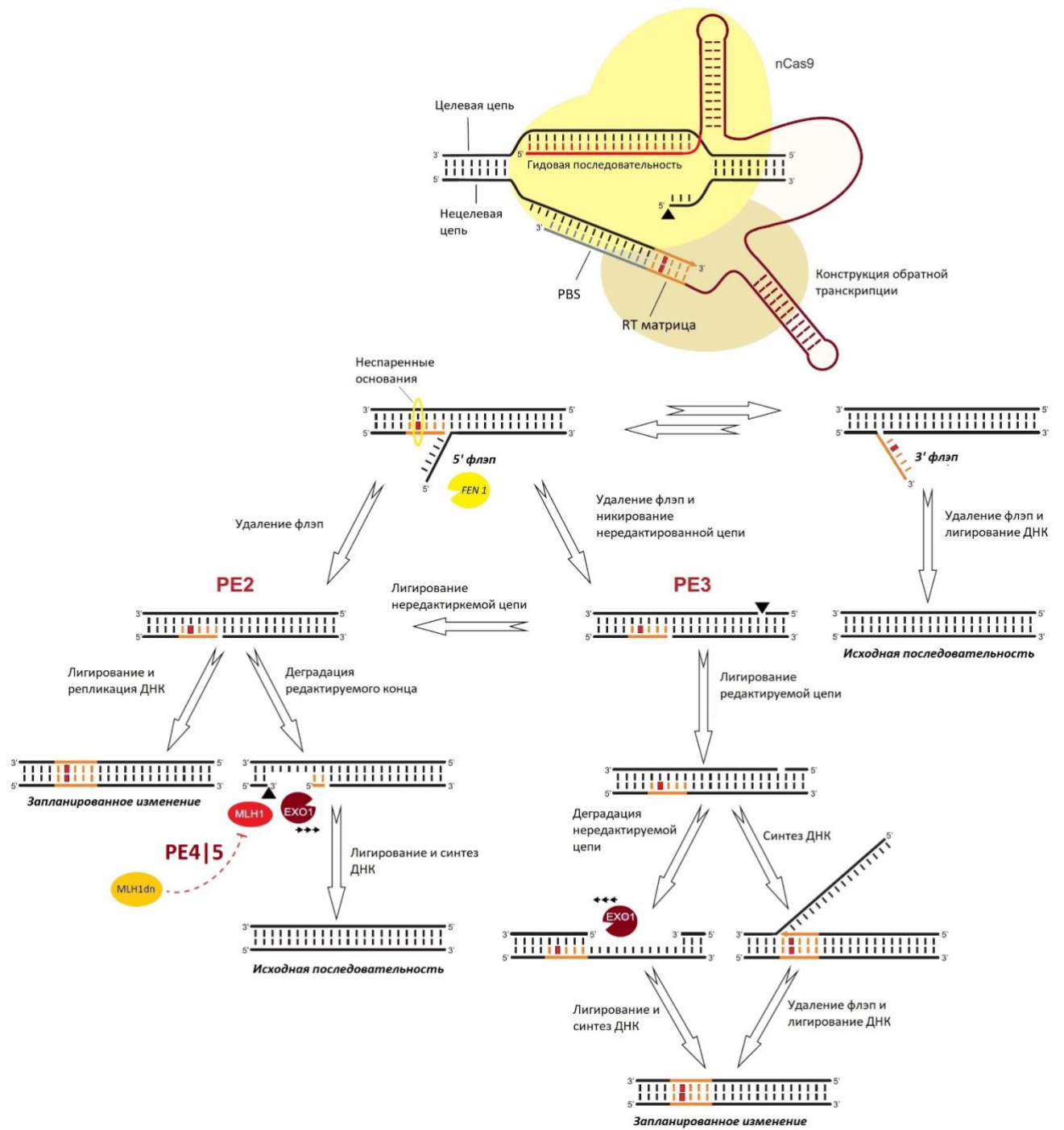



Рисунок 9. Схема Праймированного редактирования.

Таблица 4. Основные варианты Праймированных редакторов.

Обозначение варианта Праймированного Редактора (PE)	Компоненты PE		
	nCas9	Обратная транскриптаза	Праймированного редактирования гидовая РНК (регРНК)
PE1	nCas9 мутации Н840А	M-MLV RT	классическая регРНК
PE2		M-MLV RT (D200N/L603W/T330P/T306K/W31S)	
PE3			регРНК с дополнительной егРНК для создания разрыва (nick) в неотредактированной цепи.
ePE			Гибридизированный Csy-T2A
безымянный	nCas9 мутации Н840А		eregРНК – регРНК с добавлением «псевдоузла» evorptеQ1 на 3'конце.
aPE	nCas9 мутации Н840А	M-MLV RT (D200N/L603W/T330P/T306K/W31S)	aregРНК – регРНК с усиленной парами С•G шпилькой.
sPE			sрегРНК – регРНК с добавлением в RT-матрицу односмысловых мутаций.
xrPE			xrРНК – регРНК с добавлением к 3'концу РНК-мотива, устойчивого к вирусной экзорибонуклеазе.
G-PE			регРНК с модификацией G-квадруплекса hTR на 3'конце.
PE4/PE5	аналогичен PE2, но временно экспрессирующий MLH1d	M-MLV RT (D200N/L603W/T330P/T306K/W31S)	eregРНК
PE4max/PE5max	на основе PE4/PE5, с использованием человеческой кодон-оптимизированной RT / с добавлением линкера		
безымянный	на основе PPE (аналог PE2)	M-MLV RT (D200N/L603W/T330P/T306K/W31S)	PBS с температурой плавления 30 °C & парная регРНК
ePPE	на основе PPE, но с удалением RT РНКазы Н домена и включением вирусного нуклеокапсидного белка		классическая регРНК



## Пути эффективной доставки конструкций для редактирования генома

Несмотря на все достижения в разработках генетических конструкций, универсальности и гибкости систем CRISPR/Cas, их адресная доставка и пространственно-временной контроль активности внутри клеток являются критичными этапами успешного редактирования генома. На пути эффективной доставки систем редактирования генома могут встать такие преграды как размер самой упаковки, безопасность и эффективность носителей, внеклеточные и внутриклеточные барьеры, поглощение комплексов клетками, выход из эндосом, внутриклеточная сортировка, ядерная транслокация, распаковка и трансляция белков.

Система CRISPR/Cas может быть доставлена в клетки тремя основными векторами. Первым и самым простым является плаزمид – пДНК, которая кодирует белок Cas, гРНК и матрицы для репарации с помощью гомологичной рекомбинации, что позволяет избежать множественной трансфекции различных компонентов. Плазмиды являются привлекательным подходом благодаря своей простоте и низкой стоимости, обладают более высокой стабильностью, чем рибонуклеопротеины или матричная РНК. Однако векторы ДНК требуют как транскрипции, так и трансляции, прежде чем может произойти редактирование генов. Также большой размер пДНК (7–10 т.п.н., 6400 кДа) значительно усложняет доставку плазмидной системы в клетки. Доставка в виде пДНК выгодна если необходима устойчивая экспрессия Cas для обеспечения долговременной экспрессии, но длительная экспрессия Cas увеличивает вероятность нецелевых эффектов. Второй вариант заключается в доставке мРНК (~4 т.п.н., 1400 кДа), кодирующей белок Cas и гРНК, которые образуют рибонуклеопротеин в клетке. Доставка мРНК подразумевает более быстрое начало редактирования, чем пДНК, поскольку для нее не требуется транскрипция. Однако мРНК менее стабильна, чем пДНК, и подвержена деградации из-за эндогенных РНКаз. Ввиду того, что мРНК обеспечивает временный синтез белка Cas, продолжительность редактирования генов и нецелевые эффекты могут быть снижены, хотя более короткое время жизни мРНК способно уменьшить эффективность редактирования. Таким образом, химическая модификация мРНК Cas и гРНК необходима для повышения стабильности и максимизации эффективности. Третьим способом стала непосредственная комбинация белка Cas (160 кДа) с гРНК (34 кДа) для формирования комплекса рибонуклеопротеина перед введением его в клетку. Комплекс РНП доставляется в ядро с помощью сигнала ядерной локализации и сразу готов к действию, не требуя ни транскрипции, ни трансляции, что позволяет максимально быстро редактировать геном, а также значительно снижает побочные эффекты и токсичность. Однако из-за немалой молекулярной массы комплекса затрудняется эффективность его доставки в клетки. Кроме того, получение

большого количества высокоактивного белка Cas высокочувствительно и может осложняться возможным совыделением бактериальных эндотоксинов [280; 281].

Системы векторов можно доставлять *in vivo* на всех этапах внутриутробного развития от зигот до постимплантационных стадий, а также в первичные половые клетки и сперматогониальные стволовые клетки, главное выбрать подходящую технологию трансфекции: физическую, биологическую или химическую [282].

Выбор подходящей технологии трансфекции также напрямую завязан на настройке и контроле пространственной специфичности, временной точности и обратимости механизма CRISPR/Cas. В противном случае экспрессия может быть недостаточной для достижения желаемой результативности редактирования генома или избыточной, что приведет к нецелевому мутагенезу. Рассматривают несколько способов воздействия на процесс редактирования генов с помощью света, температуры, ультразвука, магнитных или электрических полей; оценки и контроля pH, окислительно-восстановительного потенциала; использования биологических соединений (аптамеры, рапамицин, аденозинтрифосфат, A385358,177). Подробно с различными подходами пространственно-временного контроля активности CRISPR/Cas внутри клеток можно ознакомиться в обзоре «Умные стратегии для точной доставки CRISPR/Cas9 при редактировании генома» [283].

Вирусная трансдукция (Рисунок 10.) считается наиболее эффективной системой доставки системы CRISPR/Cas, поскольку вирусы эволюционировали в природе как раз для заражения различных типов клеток и тканей животных. Кроме того, структура вириона защищает компоненты CRISPR/Cas от разрушения ферментами организма-мишени. Данная трансфекция достаточно безопасна, т.к. из вирусов удаляют вирулентные, болезнетворные гены, а также гены репликации вируса, чтобы предотвратить её в клетках-мишенях. Вкратце рассмотрим самые распространенные из них:

- Лентивирусы – это оболочечные вирусы диаметром 80–120нм, содержащие две копии оцРНК размером 9 т.п.н., подвергающиеся обратной транскрипции в дцДНК для интеграции в геном. Основное преимущество ЛВ заключается в их большой генетической емкости, эффективности доставки и высокой способности к клонированию. Кроме того, ЛВ менее иммуногены, чем ААВ или АдВ, поскольку покрыты липидным бислоем, а не вирусным капсидом. Однако, случайная интеграция вирусной генетической информации и продолжительный характер экспрессии делает ЛВ неблагоприятным для доставки CRISPR/Cas. ЛВ потенциально могут обладать канцерогенностью, приводить к инсерционному мутагенезу и сверхфизиологическими уровнями РНК и белка [284; 280; 281].

- Аденовирус представляет собой безоболочечный вирус с капсидом икосаэдрической формы диаметром 90–100нм и дцДНК 26–45т.п.н., который существует в свободной форме и не интегрируется в исследуемый геном. Преимуществом АдВ является высокоэффективная и быстрая трансдукция, легкость получения высокого титра, низкая патогенность, большая вместимость ~38т.п.н., а также относительно непродолжительная экспрессия, минимизирующая риск нецелевого мутагенеза. Однако, остается проблема с иммуногенностью [284; 280; 281].
- Аденоассоциированный вирус представляет собой небольшой (20–25нм) безоболочечный вирус с оцДНК 4,7т.п.н., произведенный из непатогенного вируса, обладающий высокой скоростью трансдукции. ААВ способен оставаться стабильным в широком диапазоне изменений температуры и рН и инфицировать широкий спектр делящихся и покоящихся клеток в зависимости от их серотипа. Использование ААВ позволяет избежать большей части токсичности, связанной со случайной интеграцией, и обладает средней иммуногенностью на фоне высокой эффективности редактирования генома. К недостаткам относят интеграцию векторной последовательности и длительную экспрессию, приводящую к возможным нецелевым мутациям [284; 280; 281].

Для трансдукции клеточных культур чаще всего используют ЛВ из-за их способности проникать через ядерную оболочку без деления клеток. Если же применять ЛВ к эмбрионам, то необходимо удалять вителлиновый слой у преимплантационных эмбрионов, этот же нюанс касается и АдВ. Доминирующим для доставки *in vivo* считается ААВ, которые могут инфицировать эмбрионы с интактным вителлиновым слоем, не встраиваясь в геном мишени, хотя инфекционная способность зависит от серотипа [282]. Вышеописанные вирусы даже используются при трансдукции *in utero* для инфицирования 9–15 дневных эмбрионов с целью генетической коррекции плодов с летальными мутациями [285].

Несмотря на успешное применение вирусов для внедрения в клетки CRISPR/Cas, всё же остаются опасения, связанные с присутствием вирусных компонентов. В связи с чем на основе ЛВ была разработана система вирусоподобных частиц (*Рисунок 10.*). ВПЧ продуцируются путем самосборки вирусных структурных белков, имеют большинство нормальных компонентов вирусных носителей, но не содержат вирусной геномной нуклеиновой кислоты, следовательно, не реплицируются в клетке. ВПЧ сравнительно легко производить, доставка в клетки на их базе даже более эффективна, чем электропорация. С помощью системы ВПЧ можно доставлять мРНК, белки, РНП, но данная система не эффективна для егРНК [286].

Химическая трансфекция менее эффективна, чем доставка на основе вирусов, но обладает преимуществом слабой иммуногенности и низкой стоимости массового производства. Химический носитель инкапсулирует вектор для генетического редактирования и вводит в клетку посредством эндоцитоза. Химическая трансфекция для доставки векторов использует липидные везикулы, химические вещества на основе полимеров и неорганические структуры, которые рассмотрим ниже.

Катионные полимеры заряжены положительно и могут образовывать комплексы с отрицательно заряженными пДНК и мРНК посредством электростатического взаимодействия, чтобы защитить их от деградации нуклеазами. Полимеры обладают такими преимуществами, как высокая полезная нагрузка, небольшой и однородный размер, высокая эффективность редактирования, контролируемое высвобождение векторов, низкая иммуногенность и простота производства, хранения, транспортировки. Однако, остаются проблемы с биосовместимостью и токсичностью, которые можно обойти, используя нанокапсулы, мицеллы и наногель для доставки системы CRISPR/Cas. Короткие пептиды (<30 а.к.), проникающие через клеточные мембраны (КПП) (Рисунок 10.), стали еще одним потенциальным средством, позволяющим доставлять РНП непосредственно в клетки, при этом комплекс КПП-РНП очень стабилен во время циклов замораживания-оттаивания и сушки без потери эффективности. КПП как правило могут быть ковалентно модифицированы и электростатически адсорбированы с образованием катионных наночастиц с белками Cas и гРНК, что позволяет эффективно редактировать геном. К преимуществам использования КПП относят безопасность и эффективную адресную доставку систем CRISPR/Cas, но экзогенные КПП могут вызывать иммунные реакции, а небольшой размер требует дальнейшей химической модификации. Кроме того, КПП разрушаются после действия протеазы, что приводит к снижению активности. А также положительный заряд КПП, при слиянии с белком Cas, будет формировать области с высоким положительным зарядом, что может мешать связыванию Cas с гРНК. Липосомы и липидные наночастицы (Рисунок 10) стали одной из самых сложных систем доставки, представляющей собой природные фосфолипиды или их производные. Ключевой технологией ЛНЧ является рН-зависимый катионизируемый липид, который является нейтральным на стадии доставки, но становится катионным при проникновении в эндосомы. Такое изменение заряда индуцирует диссоциацию частиц и разрушение эндосомальной мембраны для усиления выхода из эндосом, что снижает системную токсичность липидов. Добавление липидов, модифицированных полиэтиленгликолем обеспечивает стабильность частиц, защиту от иммунного распознавания и повышение стабильности. Вспомогательные фосфолипиды и холестерин стабилизируют структуру ЛНЧ и опосредуют слияние с клеточной мембраной. ЛНЧ отличается от липосом отсутствием сплошного липидного бислоя и меньшей вместимостью, но обе системы, посредством

электростатических взаимодействий, способны вмещать в себя как РНП, мРНК, так и пДНК. Наночастицы золота (*Рисунок 10.*) представляют собой 15 нм чувствительные к гипоксии золотые наностержни, преобразованные азобензол-4,4'-дикарбоновой кислотой (p-AZO), конъюгированные с тиол-модифицированными олигонуклеотидами, которые гибридизованы с оцОНК и образуют комплекс с Cas РНП. AuНЧ могут легко сшиваться с белками и нуклеотидами модифицированными сульфгидрильными группами (-SH) через связи Au-S, изменяя их поверхностный заряд и гидрофильность, тем самым обеспечивая доставку векторов внутрь клеток. Покрытие эндосомальным дезорганизирующим полимером PAsp (DET) обеспечивает поглощение AuНЧ клетками посредством эндоцитоза, после которого данный полимер запускает разрушение эндосомы и высвобождение вектора. Преимуществом AuНЧ стала высокая эффективность доставки при хорошей биосовместимости, а недостатком то, что они могут вызывать неспецифические воспалительные и иммунные реакции *in vivo*. Более естественным носителем стали экзосомы и как следствие их преимуществом является хорошая биосовместимость и низкая иммуногенность. Экзосомы способны инкапсулировать все типы векторов, что является значительным плюсом, однако скорость инкапсуляции считается низкой. Также к их недостаткам относят нецелевые эффекты и сложные процессы приготовления. Среди других химических трансфекторов рассматривают наночастицы ДНК, амплифицированные в наноклубки, а также цеолитоподобные имидазольные каркасные структуры (ZIF), наночастицы диоксида кремния, оксид графена (GO), нанолисты черного фосфора (BP) и металлоорганические каркасы (MOF) [280; 281].

Для повышения эффективности доставки векторов подходы химической трансфекции совмещают и с технологиями физической доставки векторов.

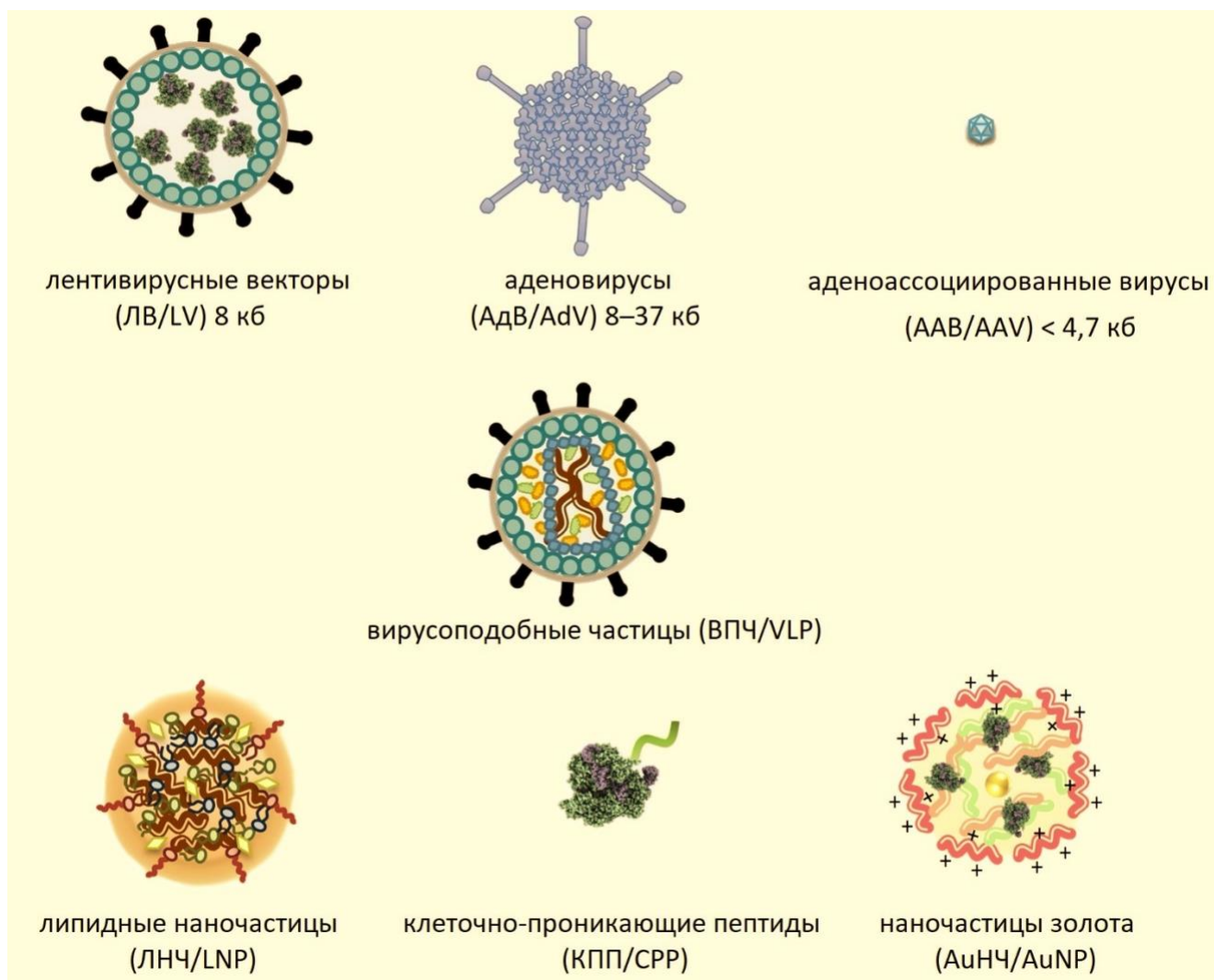


Рисунок 10. Биологические и Химические методы трансфекции.

Физическая трансфекция (Рисунок 11.) не зависит от типа вектора, как в случае биологической, можно задействовать и плазмидную ДНК, мРНК и рибонуклеопротеидный комплекс, а в отличие от химических носителей, скорость трансфекции не зависит от клеточного эндоцитоза. Самым критичным моментом физической трансфекции, конечно, является частичное разрушение клеточной мембраны для проникновения вектора в клетку.

Наиболее распространенным физическим методом является технология микроинъекции – прямое введение пДНК в ядро или мРНК в цитоплазму зигот без ограничений по размеру векторов, обеспечивающее быструю экспрессию генов. Микроинъекция остается лидером среди инструментов для создания генетически модифицированных животных, несмотря на мнение большинства пользователей, не лишённое оснований, что данный подход крайне трудоемкий, а эффективность сильно зависит от оператора [287; 284; 280; 281].

Следующей по частоте использования при работе с мышами, но с большим отрывом от микроинъекции, следует технология электропорации, основанная на импульсах электрического поля для облегчения проникновения пДНК, мРНК, РНП через временно образованные поры на клеточной мембране [288]. Этот метод применяется у мышей как *in vitro*, так и *in vivo*, хотя внутриутробная электропорация, например при использовании системы GONAD – редактирование генома с помощью доставки нуклеиновых кислот в яйцевод на стадии 2-клеточного эмбриона и её улучшенная версия i-GONAD, разработанная для зигот [289; 290], все еще находится на стадии исследований. Миниатюризация и включение в систему наноструктур, таких как наноканалы или наносоломинки, усиливает локальное электрическое поле, тем самым снижая рабочее напряжение [291]. Однако, высокий процент возможного повреждения клеток и апоптоза из-за воздействия напряжения всё же остается [281].

Другой подход включает гидродинамическую инъекцию раствора (8–10% массы мыши), содержащего пДНК, в хвостовую вену мыши на средней стадии беременности (HTVI), также называемый трансплацентарной доставкой генов для приобретения генетически модифицированных плодов (TPGD-GEF). Вектор, вводимый в кровоток, переносится через плацентарный интерфейс к развивающимся плодам, где происходит экспрессия экзогенного гена [292]. Эта технология позволяет производить мутации уже у сформировавшихся эмбрионов, например, редактируя клетки сердца, минуя стадию эмбриональной летальности, связанной с исследуемым генетическим изменением. Однако, метод пока развивается и имеет серьезные ограничения, например, существует серьезная угроза печени мышей из-за однократного введения большого объема реагента с вектором.

Механическая трансфекция или механотрансфекция использует механические силы, такие как физический контакт с твердой структурой или силу сдвига окружающей жидкости, для создания пор в клеточной мембране. Поры позволяют пДНК или РНП диффундировать непосредственно в цитозоль, однако нанося клеткам более чем в 50% катастрофический урон [293; 294; 295; 296].

Существуют ещё несколько технологий, основанных на формировании мембранных микропор, через которые в клетку проникает вектор. Например, лазерная оптопорация, где размер пор будет зависеть от размера лазерного пятна, мощности лазера и длительности импульса, или вариант с облучением лазером наночастиц золота (или иных металлов), что вызывает плазмонные эффекты, которые могут создавать поры в клеточной мембране. Так же индуцированная внешним магнитным полем внутриклеточная доставка может осуществляться с задействованием магнитных наночастиц или без, но совместное использование технологий усиливает эффект. При использовании сонопорации, под воздействием ультразвуковых волн, введенные микропузырьки разрываются, вызывая кратковременную пермеабиллизацию

клеточной мембраны, а в отсутствие микропузырьков акустические волны создают поры, вызывая сильное течение во внеклеточной среде [284].

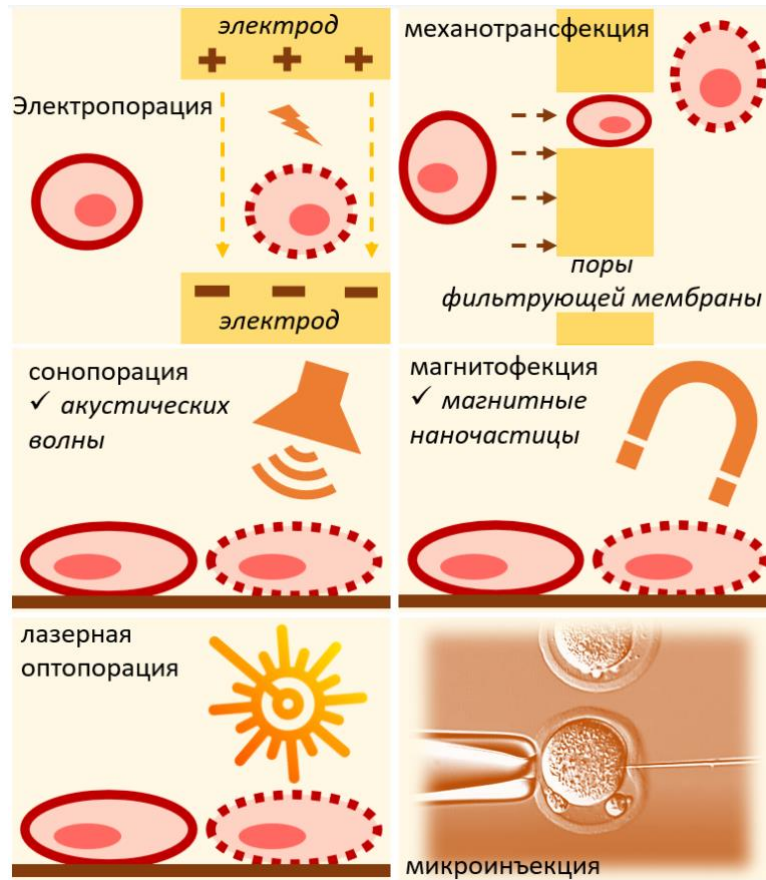


Рисунок 11. Физические методы трансфекции.

В итоге, для успешного редактирования генома исследуемого объекта, CRISPR/Cas можно «упаковать» в три варианта векторов: плазмиду, мРНК или рибонуклеопротеин, и доставить в клетку или эмбрион, используя технологии физической, биологической или химической трансфекции. Любой успешный метод трансфекции всё равно создает определенные проблемы и ограничения, поэтому гибридные подходы улучшают общую эффективность трансфекции, а также минимизируют ограничения каждой технологии.



**Заключение по §1 главы 1.**

Эволюция развития технологии CRISPR/Cas на сегодняшний день представила гибкую, простую в использовании молекулярную платформу для редактирования генома различных организмов. За последние годы разработаны разнообразные стратегии CRISPR-опосредованного редактирования генома, как зависящие, так и не зависящие от гомологической рекомбинации, нокаута, вставки и замены генов, редактирования азотистых оснований и РНК, регуляции транскрипции. Технология CRISPR/Cas позволила добиться значительных достижений в фундаментальных и биомедицинских исследованиях и расширила понимание биологии живых организмов, болезней человека, заложив многообещающую основу клинического применения.

## §2. Митохондриальные микропептиды

Белки являются важными биомолекулами, которые выполняют почти все функции в клетке. В начале нового тысячелетия в рамках проекта «Human Genome Project» было подсчитано, что 20–25 тысяч генов кодируют функциональные белки [297], на сегодняшний день из них проверено более 18 тысяч [298]. С развитием биоинформатики, появлением и растущим использованием высокопроизводительных технологий, таких как масс-спектрометрия, рибосомное профилирование (Ribo-Seq) и секвенирование синтезируемых рибосомой пептидов (RNC-Seq), было продемонстрировано, что теоретически, могут существовать множество микропептидов, и десятки тысяч потенциальных микропротеиновых мРНК. Теперь показано, что некоторые некодирующие РНК (ncРНК), в особенности длинные некодирующие РНК (lncРНК), которые первоначально рассматривались как транскрипционный шум [299], содержат короткие открытые рамки считывания (sORF), кодирующие микропептиды (SEP) [300; 301; 302; 303].

### Длинные некодирующие РНК

Оценки количества генов lncРНК у млекопитающих широко варьируют: от менее 20 000 до более 100 000 [304; 305]. Функционально lncРНК можно разделить на те, которые действуют *in cis* и те, которые действуют *in trans* [305]. В *cis*-положении локус lncРНК может регулировать хроматин или экспрессию близлежащих генов, в *trans*-положении lncРНК влияют на состояние хроматина и экспрессию генов в отдаленных генетических областях, принимают участие в структуре и организации ядра, взаимодействуют с белками и/или другими РНК молекулами, модулируя их экспрессию и функцию. lncРНК в основном транскрибируются РНК-полимеразой II (Pol II) и имеют структуру, аналогичную мРНК, включая N7-метилированный гуанозин трифосфат (m7G-cap) на 5'-конце и poly(A)-хвост на 3'-конце [306; 307], что предполагает трансляционную функцию, сравнимую с функцией мРНК. Однако, в отличие от мРНК, lncРНК имеют различные процессы транскрипции, процессинга и модификации [308]. Большинство lncРНК, экспрессируемых в клетках человека, мышей, рыб *Danio rerio*, дрозофилл, арабидопсиса (лаб.растение) и дрожжей, связаны с рибосомами, паттерн консервации которых согласуется с трансляцией микропептидов и lncРНК демонстрируют потенциал кодирования и ограничения последовательности, сходные с теми, что возникают в последовательностях, кодирующих белок [309]. В клетках человека lncРНК с кодирующей способностью составляют 40% от общего пула экспрессируемых lncРНК [310]. Стабильность транслируемых lncРНК может регулироваться нонсенс-опосредованной деградацией [311], механизмом контроля качества мРНК [312], и белками, например eIF4E [313], которые также участвуют в трансляции

мРНК [314]. На биологическую активность lncРНК большое влияние оказывает их локализация в клетке [315; 316]. Транслируемые lncРНК локализуются в цитоплазме, тогда как нетранслируемые lncРНК преимущественно обнаруживаются в ядре [310], но есть и исключения. В целом lncРНК обнаруживают в различных клеточных компартментах, включая митохондрии. К настоящему времени описано более двадцати lncРНК, прямо или косвенно влияющих на митохондриальную биологию. Некоторые действуют в цитозоле, регулируя ассоциированные с митохондриями гены, часто во взаимодействии с miРНК, таким образом создавая сложную сеть регуляции мРНК-ncРНК. Описаны ntmlncРНК (nuclear-transported mitochondria-associated lncРНК) локализованные непосредственно в митохондриях и кодируемые ядром, и митохондриально-кодируемым mtlncРНК (mitochondria-encoded lncРНК) [317]. Так, было обнаружено значительное представительство транслируемых lncРНК, продукты которых имеют митохондриальную локализацию [318].

### **Короткие открытые рамки считывания**

Открытая рамка считывания определяется как последовательность, начинающаяся со старт-кодона и заканчивающаяся стоп-кодоном. ORF встречаются случайным образом и в большом количестве по всему геному. Из них только часть попадает в транскрипты, и только некоторые из них в итоге транслируются. Эукариотические матричные РНК преимущественно имеют единственную основную ORF, которая составляет белок-кодирующую последовательность, которая обычно является самой длинной ORF в мРНК, но многие другие более короткие ORF также часто присутствуют в транскрипте, некоторые из которых могут быть транслированы. Обычно короткие открытые рамки считывания sORF характеризуют как открытые рамки считывания менее чем из 100 аминокислот, которые могут быть расположены в кодирующих транскриптах или в lncРНК, кольцевых и митохондриальных РНК [319]. В то время как некоторые sORF начинаются с канонического стартового кодона (AUG), значительное число также иницируется с альтернативных старт-кодонов, отличающихся на один нуклеотид от AUG [320]. Из них CUG, GUG, UUG и ACG, по-видимому, являются наиболее частыми неканоническими сайтами инициации трансляции у эукариот [321; 320; 322]. Сайты терминации трансляции обычно используют обычные стоп-кодона (UAA, UGA и UAG), но исследования показали, что sORF иногда могут использовать нетрадиционную терминацию [323]. Хотя охарактеризовать sORF и определить их потенциальную функциональную роль сложно, в настоящее время несколько исследований продемонстрировали важность sORF в различных клеточных механизмах [324; 325; 326; 327] и в регуляции трансляции белок-кодирующей последовательности [318; 328].

Вкратце, в зависимости от их характеристик, sORF можно разделить на три категории [329]:

- нетранслируемые sORF или те, у которых нет признаков трансляции, просто определяемые по геномной последовательности.
- sORF, которые транслируются, что, приводит к формированию микропептидов (SEP, short encoded peptide).
- sORF и/или SEP с известной функцией.

Функция многих sORF не связана с продуктом их трансляции, а основана на самом процессе взаимодействия с рибосомой и ее продвижения по мРНК, однако некоторые sORF могут также кодировать функциональные микропептиды – SEP [330]. Было определено 88 потенциальных sORF, которые имеют тенденцию генерировать микропептиды, расположенных в митохондриях [331].

## **Микропептиды**

Микропептиды SEP, обычно определяют как полипептиды, содержащие менее 100 аминокислот, широко распространены в тканях, представлены как в эукариотических, так и в прокариотических клетках, а некоторые из них демонстрируют высокую степень консервативности среди видов. Большинство микропептидов локализируются в мембране органелл или плазматической мембране. Такое расположение может повысить стабильность пептидов и защитить их от быстрой деградации из-за их малых размеров. В 30% случаев эти локализованные в мембране микропептиды для увеличения стабильности содержат трансмембранный домен STMD (predicted single transmembrane domain), с гидрофильными N- и C-концевыми доменами, которые фланкируют гидрофобную  $\alpha$ -спираль, пересекающую мембрану [332]. С биологической точки зрения SEP представляют собой богатый источник генов с неизученными функциями. В то время как высокопроизводительные методы, такие как масс-спектрометрия, анализ консервативности аминокислотных последовательностей и рибосомное профилирование позволили открыть множество генов SEP, подробное изучение их функции остается задачей отдельных фундаментальных исследований. Многие микропептиды выполняют свою роль, взаимодействуя с более крупными белками и модулируя их активность, локализацию или стабильность, регулируя таким образом сложные физиологические процессы [333; 2; 334; 335]. До сих пор четко охарактеризовано лишь ограниченное число SEP, которые участвуют в широком спектре клеточных функций, включая пролиферацию, передачу сигналов, физиологию и органогенез. Описан регуляторный механизм пептидных переключателей,

которые, взаимодействуя с малыми молекулами в ходе трансляции, ингибируют считывание кодирующей последовательности, расположенной в мРНК ближе к 3'-концу [336].

Микропептиды задействованы в биологических процессах, включая оплодотворение ооцитов [337], эмбриогенез [338; 339], формирование врожденного иммунитета [340] развитие сердечно-сосудистой [341] и нервной систем [342], скелетных мышц [343; 344; 345; 346; 347; 4; 348; 9], стрессовом ответе [349; 350], процессах иммунной системы [351; 352], метаболизме и старении [353; 354; 355].

Ограниченный размер микропептидов делает их подходящими для точной настройки сложных биологических процессов, что в итоге расширяет горизонты для лечения различных патологий, SEP служат терапевтическими кандидатами как в форме самого микропротеина, так и в виде гена-sORF [336]. Например, недавние исследования показали, что микропептиды обладают антибактериальной активностью [356], играют важные роли в канцерогенезе. Рассматривается перспектива их использования в разработке противоопухолевых препаратов и биомаркеров [357; 358; 359]. В частности, микропептиды связанные с митохондриями, реагируют на изменения метаболизма ткане- и стресс-специфическим образом, защищая от метаболической дисфункции, связанной со старением и энергетическим дисбалансом [354]. Митомикропептиды обеспечивают цитопротекцию при глазных заболеваниях, включая возрастную макулярную дистрофию и являются потенциальным терапевтическим средством [360]. Некоторые из них, гуманин и гуманиноподобный пептид 2, демонстрируют нейропротекторное действие при болезни Альцгеймера и Паркинсона, соответственно, за счет снижения уровня окислительного стресса, нейровоспаления и увеличения сохранности митохондрий [361]. Обсуждаются взаимосвязи между митохондриальными микропептидами и основными факторами риска возрастных сердечно-сосудистых заболеваний, таких, как атеросклероз, резистентность к инсулину, гиперлипидемия [362], их терапевтическое применение и потенциал в качестве новых биомаркеров при кардиометаболической дисфункции [363]. Считается, что митомикропептиды способны улучшить метаболизм глюкозы, чувствительность к инсулину, уменьшить повреждения, вызванные активными формами кислорода, регулировать метаболизм глюкозы и липидов, способствуя контролю над диабетом [364]. Недавнее исследование демонстрирует, что микропептид митохондриального происхождения MOTS, активируя передачу сигналов NRG1-ErbB4, оказывает кардиопротекторное воздействие на крысиной модели диабета, сопоставимое с физическими нагрузками [365]. В целом, показано, что митохондриальные микропептиды активно тестируются в клинических исследованиях побочных эффектов ожирения, в частности сердечной дисфункции [366]. Некоторые из них, особенно MOTS, могут быть миокинами (myokines), чувствительными к физической нагрузке, которые формируют аспект

митохондриального ретроградного сигнального пути, важного для модулирования меж- и внутритканевых адаптивных реакций на физическую нагрузку [367]. Описанные антиоксидантные, противовоспалительные, антиапоптотические свойства митомикропептида гуманин нашли свое терапевтическое применение и при таких патологических процессах, как бесплодие, повреждение тканей [368], поздний гипогонадизм [369].

Интересно, как сильно митохондрии обогащены микропептидами, их доля значительно выше, чем в цитозоле, а внутренняя мембрана митохондрий обладает самой высокой долей микропептидов [331]. Из-за небольшого размера митохондриального генома кодирующая способность мтДНК очень ограничена [370] и митохондрии сильно зависят от импорта белков, кодируемых ядром, чтобы адаптироваться к активным и разнообразным функциям митохондрий [371]. Так различают два пересекающихся пула митохондриальных микропептидов – MLP & MDP – *mitochondria located / derived peptides*, первая группа пептидов локализованных в митохондриях в основном транслируются с ядерного генома, а вторая группа пептидов митохондриально происхождения и может транслироваться и с мтДНК [372]. Участие митохондрий в поддержании клеточного гомеостаза выходит за рамки производства энергии и включает регулируемую роль в ряде процессов, включая иммунные/воспалительные реакции, протеостаз, адаптивные реакции на стресс и апоптоз. Чтобы достичь этого, митохондрии развили обширные ретроградные сигнальные сети для связи с ядерным геномом, другими внутриклеточными органеллами и потенциально соседними клетками или органами, в которых пептиды митохондриального происхождения, по-видимому, принимают важное участие [373] В целом, микропептиды функционируют как важнейшие компоненты протеома наравне с обычными крупными белками и могут объяснить много загадок молекулярной биологии и физиологии.

### **Микропептиды митохондриального происхождения**

Митохондриальные микропептиды представляют собой новый класс биоактивных микропротеинов, которые влияют на клеточный метаболизм. В отличие от крупных белков, эти пептиды небольшого размера и могут быстрее синтезироваться и легче разрушаться для оперативной, гибкой адаптации митохондрий к внешним факторам. Некоторые из них действуют внутриклеточно, в то время как другие обнаруживаются в системном кровотоке и нацелены на различные ткани, такие как почки, скелетные мышцы, толстая кишка, сосудистая стенка и сердце [354]. Считается, что импорт небольших пептидов менее затратен, что актуально для снижения собственных энергозатрат митохондрий при повышенном спросе на АТФ, позволяя достичь клеточного гомеостаза в более короткие сроки [318]. В транспортировке

микрорептидов через мембраны митохондрий могут быть задействованы и крупные импортирующие белки-помощники, такие как Mia40 и Erv1 [374; 375].

Первым митохондриальным микрорептидом был обнаруженный в 2001 году у пациентов с болезнью Альцгеймера гуманин (Humanin). Он был описан как нейропротекторный пептид, защищающий нейрональные клетки от токсического воздействия  $\beta$ -амилоида [376; 377]. Этот микрорептид из 24 аминокислот, кодируемый областью митохондриальной 16S рРНК, имеет как цитоплазматическую, так и митохондриальную локализацию. Параллельно с нейропротекторной функцией, гуманин был описан как цитопротекторный пептид, который связывает проапоптотические молекулы IGFBP3 и Вах [378; 379]. Сейчас гуманин рассматривается как цитопротекторный фактор в сердечно-сосудистых, метаболических и неврологических контекстах. Эти эффекты были частично опосредованы взаимодействием гуманина с тройным рецепторным комплексом, включающим gp130, WSX1 и рецептор CNTF, а также с формилпептидным рецептором-2 [380], а последующие эффекты гуманинового каскада включают активацию путей АКТ/ERK1/2 и STAT3 [381].

Впоследствии были идентифицированы еще шесть дополнительных митомикрорептидов, названные малыми гуманин-подобными пептидами SHLP1–6, которые кодируются митохондриальной 16S рРНК, имеют некоторые общие биологические черты с гуманином, и играют важную роль в метаболизме, выживании клеток и дыхании [382].

Другой активно исследуемый микрорептид, это митохондриальная ORF 12S рРНК-с (MOTS-с, кодируется митохондриальной 12S рРНК). Он состоит из 16 аминокислот, где первые 11 аминокислотных остатков высококонсервативны у разных видов [383]. MOTS-с не является полностью локализованным в митохондриях микрорептидом, играя как внутриклеточную, так и эндокринную роль, действует как ретроградная сигнальная молекула, перемещаясь из митохондрий в ядро и связываясь с факторами транскрипции, регулирующими метаболизм (например, NRF1) [384] MOTS-с может транслироваться только в цитозоле, потому что его sORF имеет тандемные стартовый и стоп-кодоны, специфичные для митохондриального генетического кода. Следовательно, транскрипт MOTS-с должен экспортироваться из митохондрий в цитозоль [355]. Первоначально MOTS-с был идентифицирован как митохондриальный регулятор метаболического гомеостаза в клетках, в связи с чем, как описано выше, MOTS-с связывают с долголетием, диабетом, ожирением, чувствительностью к инсулину. Однако, помимо регуляции метаболизма, MOTS-с способствует дифференцировке остеобластов из костных мезенхимных стволовых клеток (BMSCs), усиливает синтез коллагена, уменьшает потерю костной массы за счет ингибирования остеопороза АМПК-зависимым образом, оказывает значительное противовоспалительное действие и т. д. [385].

Анализ митохондриального генома, а также изыскания, основанные на критериях митохондриальной локализации и небольшого размера белков, выявили сотни предполагаемых микропептидов, некоторые из которых после проверки показали себя как жизненно важные регуляторы клеточных функций. С характеристиками и функциями большинства из них, а также с только предполагаемыми функциональными митомикропептидами, можно ознакомиться в подробном, современном обзоре «Митохондриальные пептиды и их разнообразные физиологические функции» [372].

мтДНК содержит сотни sORF, кодирующие предполагаемые микропротеины, которые можно разделить на четыре классификационные категории на основе происхождения цепи – тяжелая / легкая, и генетического кода – стандартного генетического кода, использующего кодоны AGA и AGG для аргинина, а кодон UGA для терминации или митохондриально-специфического, использующего кодоны AGA и AGG для терминации, а UGA для триптофана и два альтернативных кодона инициации (ATA и ATT) в дополнение к стандартному ATG. Основные восемь митомикропептидов кодируются стандартным генетическим кодом, из них гуманин, MOTS-c и SHLP-6 кодируются классом тяжелых цепей, а SHLP со 2 по 5 кодируются классом легких цепей [355].

Однако, из-за небольшого размера митохондриального генома сама митохондрия неспособна полностью обеспечить необходимое количество белков, и поэтому большинство белков происходят из ядерного генома, чтобы адаптироваться к активным и разнообразным функциям митохондрий [371].

### **Митохондриальные микропептиды, кодируемые ядерным геномом**

Кодируемые ядром микропептиды sORF, действующие на митохондрии, обычно демонстрируют высокую консервативность среди видов, что предполагает их функциональную важность. В качестве примеров представителей ядерно-кодируемых митохондриальных функциональных микропептидов можно привести:

- **PIGBOS.** Состоит из 54 аминокислот, локализуется во внешней митохондриальной мембране, в местах контакта эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Взаимодействует с белком эндоплазматического ретикулума - CLCC1 (Chloride Channel CLIC Like 1), регулирует реакцию разворачивания белков, и, таким образом, может быть вовлечен в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний [386].
- Микропептид митохондриального фактора элонгации 1 – MIEF1-MP. Состоит из 70 аминокислот, локализуется в митохондриальном матриксе, консервативен у всех



позвоночных. Взаимодействует с миторибосомами и регулирует скорость трансляции митохондриальных белков, способствует делению митохондрий [387].

Недавно открытые микропептиды:

- **Brawnin – BR.** Состоит из 71 аминокислоты, консервативен и широко распространен, кодируется геном *C12orf73*. Согласно структурному анализу, его С-конец обращен к межмембранному пространству, а N-конец находится во внутренней мембране митохондрии, функционирует как сигнальный пептид. В клетках человека участвует в транспорте электронов и OXPHOS под контролем AMPK пути. BR напрямую взаимодействует с Комплексом III дыхательной цепи. Его делеция вызывает нарушение стабильности и сборки данного комплекса [331].
- **NAD<sup>+</sup> связывающий митохондриальный микропептид SGHRT,** присутствующий как в мономерной, так и в димерной формах, связывается непосредственно с NAD<sup>+</sup>, но не с NADH. Локализованный на внутренней митохондриальной мембране и в митохондриальном матриксе, SGHRT взаимодействует с митохондриальными ферментами сукцинат-СоА лигазой и сукцинат дегидрогеназой. SGHRT необходим для стабильной морфологии и работы митохондрий, функционирования цикла Кребса, цепи переноса электронов, процессов OXPHOS и метаболизма [388].

Одним из ярких представителей ядерно-кодируемых митомикропептидов является Миторегулин. Его независимо друг от друга открыли и описали три исследовательские группы. В нашей лаборатории исследования функций Миторегулина ведутся более пяти лет как на клеточных культурах, так и на трансгенных мышах.

## **Миторегулин**

Миторегулин (Mtlн), также известный как микропептидный регулятор β-окисления (МОХИ), микропептид в митохондриях (МРМ) или микропептид, кодируемый lncРНК (LEMP). Закодирован человеческим геном *LINC00116*, а у мышей геном *150001k16Rik*, состоит из 56 аминокислот и локализован в межмембранном пространстве митохондрий, где он ассоциирован с внутренней митохондриальной мембраной [7; 4; 8].

Изначально мРНК, кодирующая микропептид Mtlн, была ошибочно классифицирована как lncРНК. Её транслирующая функция была предсказана с помощью анализа результатов рибосомного профилирования при обработке в браузерах Trips-Viz и GWIPS-Viz. А также было показано, что функционально значима короткая форма мРНК Mtlн [389].

Хотя существует общее мнение об участии Mtlн в контроле дыхания и метаболизме липидов/жирных кислот, понимание его функциональной роли несколько противоречиво. На

культурах клеток мышинных фибробластов NIH3T3 и клеток мышинной миеломы NS0 было показано, что активность работы комплекса I дыхательной цепи зависит от микропептида Mtlп. При этом способность окислять NADH комплексом I, выделенным иммуноаффинным методом из митохондрий клеток, нокаутных по гену 1500011k16Rik и клеток дикого типа, была одинаковой. Таким образом, работа первого дыхательного комплекса зависит от микропептида Mtlп опосредовано. На культурах клеток мышинных фибробластов NIH3T3 и клеток мышинной миеломы NS0 было показано, что Mtlп взаимодействует с цитохром b5-редуктазой 3 (Cyb5r3). Посредством такого взаимодействия микропептид он может влиять на синтез жирных кислот или образование двойных связей. При липидном анализе клеточных культур дикого типа и нокаутных по гену 1500011k16Rik выяснилось, что у последних количество триацилглицеридов было повышено, в то время как концентрация фосфолипидов, в особенности видов фосфатидилхолина с длинными углеводородными цепочками и несколькими ненасыщенными связями молекул жирных кислот, была снижена [4].

По другим данным, показана связь Mtlп с компонентами трехфункционального белкового комплекса NADH & NADH, посредством чего он влияет именно на процесс окисления жирных кислот [7]. Было показано, что митохондрии волокна четырехглавой мышцы бедра и сердца нокаутных по гену 1500011k16Rik мышей хуже окисляют жирные кислоты и предпочитают окислять углеводные субстраты, при этом способность окислять пируват у митохондрий волокон четырехглавой мышцы бедра и сердца нокаутных по гену 1500011k16Rik мышей и мышей дикого типа не различается, что доказывает роль микропептида Mtlп исключительно в дыхательной функции митохондрий, связанной с окислением жирных кислот [7; 6]. Кроме того, несколько научных групп доказали среди возможных ролей, которые Mtlп играет в физиологии митохондрий, посредничество во взаимодействии респираторных комплексов [8], и взаимодействие с компонентом АТФ-синтазы АТФ5В [6]. Также, микропептид Mtlп может связываться с ключевыми белками цикла Кребса, например, дигидролипоамид дегидрогеназой — компонентом  $\alpha$ -кетоглутарат дегидрогеназы и пируват дегидрогеназы, которые восстанавливают NADH, содержание которого в митохондрии понижено у нокаутов [8], что свидетельствует о возможной роли Mtlп в регуляции цикла Кребса посредством стабилизации его ферментных комплексов. Кроме того, митохондриальные лизаты кардиомиоцитов нокаутных по гену 1500011k16Rik у мышей, лишены полос на электрофореграмме, соответствующим белкам VLCAD и ACAD, которые являются ферментами  $\beta$ -окисления жирных кислот, и которым необходима димеризация и тетрамеризация для ассоциации с внутренней митохондриальной мембраной и дальнейшего функционирования. Уменьшенное связывание с мембраной послужило причиной отсутствия данных белков при выделении фракции неочищенных митохондрий из сердечной ткани. Следовательно, возможно,

что микропептид *Mtln* необходим для ассоциации ферментов цикла Кребса и  $\beta$ -окисления жирных кислот с мембраной [8].

Микропептид *Mtln* широко представлен в поперечнополосатых мышцах [7; 8; 9; 5]. При этом уровни РНК и экспрессия гена *1500011k16Rik* сильно возрастают в процессе миогенной дифференцировки, а именно превращения мышечных миобластов C2C12 в миотубы [9; 5]. Миогенная дифференцировка — процесс, для реализации которого важна энергия АТФ, поставляемая митохондриями. Возможно, что стимуляция миогенной дифференцировки осуществляется благодаря увеличению эффективности митохондриального дыхания посредством *Mtln*, так как было показано снижение в потреблении кислорода и продукции АТФ митохондриями нокаутов. Оверэкспрессия гена, кодирующего микропептид *Mtln*, наоборот, привела к увеличению одновременно потребления кислорода и продукции АТФ. Более того, эктопическая экспрессия гена, кодирующего коактиватор транскрипции PGC-1 $\alpha$ , являющегося центральным индуктором митохондриального биогенеза [390] и активатором митохондриального дыхания, способствовала снятию ингибиторного действия сайленсинга гена, кодирующего *Mtln*, на миогенную дифференцировку [5].

Инактивация гена *1500011k16Rik* ведет к уменьшению мышечной дифференцировки, выражающейся в уменьшенном слиянии миобластов в миотубы и пониженном уровне тяжелых цепей миозина [9; 5]. Кроме того, нокаутные мышцы развивали большие дефекты в образовании миотуб по сравнению с диким типом [9]. Это привело к тому, что мышечные волокна в *Gastrocnemius* имели меньшие размеры, нокаутные мышцы имели меньшую максимальную силу, время бега на вращающемся стержне, и время плавания [5]. Ванг с соавторами показали, что нокаутные мышцы имели меньшие размер и вес, по сравнению с диким типом, имели дефекты в формировании мышц. Передняя большеберцовая (*tibialis anterior*, ТА) мышца нокаутного животного оказалась меньше по размеру и весу, чем у особи дикого типа. Нокаутные мышцы демонстрировали уменьшенную способность к бегу на выносливость, меньшую тетаническую силу и увеличенную продолжительность расслабления ТА [9].

Важное участие микропептида *Mtln* в липидном обмене может быть подтверждено высокой экспрессией гена, кодирующего *Mtln*, в жировой ткани [6]. Было показано, что *Mtln* осуществляет контроль над запасанием липидов в дифференцирующихся мышечных преадипоцитах [391]. Для того, чтобы доказать экспрессию гена *1500011k16Rik* на модели человеческих адипоцитов, человеческие мезенхимные прогениторные клетки дифференцировали до белых адипоцитов. Экспрессия мРНК *Mtln* постоянно увеличивалась в течение 30 дней адипогенеза [6].

Кондиционные нокаутные мышцы с экспрессией *1500011k16Rik* только в печени, бурой жировой ткани и белой жировой ткани, гонадах были созданы для исследования

физиологической роли микропептида в условиях высокожировой диеты [6]. Было показано, что у мышей обоих полов снижены концентрации циркулирующих триглицеридов, свободных жирных кислот и холестерина в крови, при этом разница в весовой динамике нокаутов отсутствовала. При нормальной диете различий в данных показателях не наблюдалось. Мышиные преадипоциты изолировали из нокаутных мышей и животных дикого типа, оказалось, что утрата Mtlн вела к небольшому снижению эффективности дифференцировки преадипоцитов, что определяли по снижению концентрации транскрипционного фактора PPAR $\gamma$ 2. Отсутствие Mtlн приводило к запасанию триглицеридов в адипоцитах, так как у нокаутов была увеличена внутриклеточная концентрация липидов, а у мышей с гиперэкспрессией гена, кодирующего Mtlн, наоборот, она была снижена. Так, Mtlн регулирует накопление триглицеридов и их метаболизм в мышечных и человеческих адипоцитах. Также Mtlн действовал на липолиз, вызванный форсколином в мышечных адипоцитах, и его уровень был ниже у нокаутов. Уровень базального липолиза был ниже в нокаутных клетках и выше у клеток с гиперэкспрессией. В адипоцитах нокаутных клеток, дифференцирующихся из человеческих плюрипотентных стволовых клеток, был понижен уровень митохондриального дыхания, сопряженного с окислением жирных кислот, повышен уровень гликолиза и уровень дыхания, не связанного с окислением жирных кислот. Таким образом, благодаря микропептиду Mtlн в адипоцитах интенсивнее происходит  $\beta$ -окисление жирных кислот, так как известно, что жирные кислоты по механизму отрицательной обратной связи ингибируют липолиз [392].

На сегодняшний день известно, что lncРНК становятся ключевыми игроками в патогенезе рака и играют непосредственную роль в пролиферации опухолевых клеток, прогрессии опухоли и/или метастазировании [393; 394], а микропептиды, такие как CASIMO1, LYRM2, HOXB-AS3, PINT87aa, могут регулировать пролиферацию опухолевых клеток [395; 396]. Однако, ни роль lncРНК LINC00116, ни микропептида Mtlн в опухолевом процессе пока широко не изучена.

Некоторые исследования предполагают, что LINC00116 участвует в прогрессии рака шейки матки. Биоптаты опухолей показывают более высокие уровни экспрессии LINC00116, а исследования на клеточных культурах демонстрируют, что LINC00116 оказывает решающее влияние на онкогенез клеток шейки матки через ось miR-10ba/c-Jun, напрямую регулируя miR-10ba и уровень экспрессии c-Jun. LINC00116 и miR-10ba модулируют PD-L1 через c-Jun. Предполагается, что PD-L1 является критическим эффектором для LINC00116- и miR-10ba-индуцированных опухолевых фенотипов [397].

Уровень экспрессии LINC00116 у пациентов с раком легких был оценен с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и микрочипового анализа в клиническом исследовании. Результаты продемонстрировали повышение экспрессии LINC00116 при бронхогенной карциноме. Кроме того обнаружили, что экспрессия LINC00116

коррелировала с факторами pT и pN, стадией pTNM, историей курения пациентов, дифференцировкой и индексом мечения Ki-67. Анализ выживаемости по Каплану-Мейеру показал, что высокие уровни экспрессии LINC00116 у пациентов с раком легких были связаны с более низкой общей выживаемостью, выживаемостью без признаков прогрессирования заболевания и первичным прогрессированием. Авторы исследования постулируют, что LINC00116 активируется в тканях бронхогенной карциномы, что может служить предиктором низкой выживаемости [398].

В исследовании гепатоцеллюлярной карциномы человека было показано, что уровень *Mtln* значительно снижен в опухолевых тканях, что связывают с повышенным потенциалом метастазирования и рецидивом рассматриваемой карциномы. Эксперименты по изменению уровня экспрессии *Mtln* показали, что микропептид ингибирует миграцию *in vitro* и способность к инвазии различных клеточных линий гепатомы, а также подавляет метастазирование ксенотрансплантатов гепатомы в печени и легких *in vivo*. Эти результаты указывают на фундаментальную роль *Mtln* в регуляции метастазирования рака [399].

Известно, что митохондриальная дисфункция играет важную роль в прогрессии и метастазировании гепатоцеллюлярной карциномы человека [400], а клетки гепатомы содержат дефектные митохондрии [401]. Поиск непосредственного механизма противометастазных свойств *Mtln* показал, что *Mtln* взаимодействует с субъединицей комплекса I дыхательной цепи, которая переносит электроны от NADH к убихинону (NDUFA7). Предполагается, что антиметастазный эффект *Mtln* может быть достигнут за счет снижения соотношения  $NAD^+/NADH$ . В продолжении изысканий было показано, что miR-17-5p связывается с мРНК *Mtln* и ингибирует ее, что приводит к подавлению экспрессии гена *1500011k16Rik* в тканях гепатоцеллюлярной карциномы. Эти результаты демонстрируют, что снижение экспрессии miR-17-5p может способствовать метастазированию гепатомы за счет увеличения активности митохондриального комплекса I и соотношения  $NAD^+/NADH$  [399].

В итоге постулируется, что противометастазный эффект достигается за счет обусловленного *Mtln* снижения активности комплекса I и ингибирования митохондриального дыхания именно в клетках гепатомы [399]. Тем не менее, другими исследователями было также показано, что *Mtln* усиливал дыхательную активность митохондрий в миобластах мышей C2C12 [5], и в изолированных митохондриях клеточных линий мышинных фибробластов NIH3T3 [4], а первичные гепатоциты мышей с нокаутом по гену *1500011k16Rik* демонстрировали нарушение митохондриального дыхания по сравнению с таковыми дикого типа [399]. Скорее всего, разнополярность этих результатов предполагает контекстно-зависимую регулируемую роль *Mtln* в митохондриях, и это интересное направление для будущих исследований.

## **Заключение по §2 главы 1.**

Последние открытия и анализ биологически активных микропептидов, гены которых были ошибочно отнесены к генам длинных некодирующих РНК, указывают на гораздо большую сложность протеома, чем мы могли предположить ранее. Были разработаны и оптимизированы сложные стратегии скрининга и вычислительные подходы для обнаружения новых микропептидов, кодируемых sORF. По-прежнему остается огромное множество микропептидов с неизвестными функциями, которые могут иметь как фундаментальную ценность, так и практическую значимость для медицины. Эти пептиды также могут быть новыми биомаркерами и средствами диагностики заболеваний.

Все больше микропептидов обнаруживается в митохондриях, и выдвигаются гипотезы, что митохондрии являются эволюционной площадкой для подмножества недавно появившихся микропептидов. Действительно, в качестве «энергетической машины» митохондрии демонстрируют высокий уровень динамических изменений, соответствующих разным физиологическим активностям, а также им необходимо экономить энергию собственного потребления для быстрого и стабильного поддержания гомеостаза. В этой ситуации микропептиды эффективнее крупных белков, т.к. на их производство и импорт тратится меньше энергии, и они способны быстрее синтезироваться и распадаться для оперативной адаптации к нуждам митохондрий, а также быстрее диффундировать между сайтами продукции и мишенями, что и дает толчок к активному эволюционному развитию микропептидов.

### **§3. Митохондриальные заболеваний, вызванные мутациями в ядерных генах, к которым разработаны соответствующие животные модели**

#### **Митохондриальные расстройства**

Митохондриальные расстройства представляют собой гетерогенную группу наследственных заболеваний, вызванных мутациями митохондриальной (мтДНК) или ядерной ДНК (ядДНК), характеризующихся сбоями энергетического обмена, связанного с нарушениями в окислительном фосфорилировании (ОХРНОС), цикле Кребса и фолатном цикле, биосинтезе ферментов, регуляции внутриклеточных потоков ионов кальция, окислении жирных кислот, удалении токсичных веществ и др. Митохондриальные расстройства считаются одними из наиболее распространенных генетических заболеваний и могут передаваться по аутосомно-рецессивному, аутосомно-доминантному или Х-сцепленному типу наследования. Генетические причины митохондриальных расстройств разнообразны, а клиническая картина вариабельна, поэтому рассматривают целый спектр отдельных митохондриальных заболеваний. Хотя каждое конкретное заболевание довольно редко встречается в популяции, при суммировании, частота встречаемости может достигать до 1:4300 у взрослых и 1:6700 у детей. Митохондриальные расстройства могут возникать при рождении или развиваться в течение жизни. Это прогрессирующие заболевания с различной степенью выраженности симптомов. Они могут быть мультисистемными или ограничиваться одной тканью. Первыми поражаются энергоемкие ткани и органы, в частности, центральная нервная система, сердце, скелетные мышцы, печень, почки, железы внутренней секреции, органы слуха и зрения. Гетерогенность клинических проявлений митохондриальных расстройств обуславливает сложность как в постановке правильного диагноза, так и в подходах к лечению. Одной из важных проблем является то, что механизмы проявления фенотипа для многих генетических дефектов остаются полностью или частично неизвестными. При описании фенотипа той или иной мутации исследователи сталкиваются с проблемой, что последствия мутации являются собой целый спектр разнообразных клинических проявлений у разных людей. Проблемы возникают и с тем, что многие симптомы митохондриальных заболеваний имеют общие черты с другими наследственными болезнями и общими спорадическими расстройствами, такими как сахарный диабет, инсульт или кардиомиопатия, которые также являются стандартными признаками митохондриальных расстройств. Для диагностики именно генетических заболеваний, связанных с патологиями митохондрий, используют ряд биомаркеров, однако и даже самые заметные из них, например уровень лактата, могут проявляться не у всех пациентов и/или сигнализировать о

совсем другой патологии. Также митохондриальную дисфункцию можно идентифицировать по повышению концентрации аланина и гипогликемии, наличию факторов роста фибробластов сыворотки. После получения первичных подозрений, что патология связана с митохондриальной дисфункцией, более детальные исследования могут лучше раскрыть диагноз. Так, электронно-микроскопический анализ биопсии мышц выявляет изменения ультраструктуры митохондрий, а биохимический и гистохимический анализ позволяет оценить ферментативную активность компонентов дыхательной цепи. Однако, только ДНК-диагностика может дать окончательное подтверждение диагноза. Даже в случае, когда синдром распознается, остается проблема в том, что митохондриальные нарушения характеризуются высокой вариабельностью и перекрывающимися спектрами клинических признаков [402; 403].

### **Дефицит митохондриального комплекса I, вызванного мутациями ядерной ДНК**

Митохондриальные заболевания, вызванные мутациями в генах, кодируемых яДНК, представляют собой очень разнородную группу и затрагивают все митохондриальные процессы. Ядром кодируется не только большинство из примерно 80 структурных белков системы ОХРНOS, но и все белки, необходимые для их импорта из цитоплазмы и сборки в митохондриях. Дефекты любого из этих белков могут привести к функциональному нарушению работы дыхательной цепи и, следовательно, к митохондриальным нарушениям. Кроме того, дефекты любого белка, влияющие на стабильность и/или целостность мтДНК, могут привести к такому же негативному эффекту. Некоторые нарушения, явно вызванные дисфункцией белков, функционирующих в других органеллах, например, WFS1 в эндоплазматическом ретикулуме или EIF2S3 в цитоплазме, также приводят к митохондриальной дисфункции [404; 405]. Мутации в ядерной ДНК, вызывающие митохондриальные расстройства, наследуются как по аутосомно-доминантному или рецессивному пути, а также могут находиться в X-хромосоме, и обнаружены они более чем в 300 генах, это составляет 78,5% от общего количества генов, мутации в которых приводят к развитию митопатологий [406].

Единичные или изолированные дефициты компонентов системы ОХРНOS вызывают первичные митохондриальные нарушения, гетерогенную группу врожденных нарушений метаболизма. Производство энергии посредством митохондриального окислительного фосфорилирования является основным источником энергии в большинстве тканей млекопитающих. ОХРНOS использует пять мультисубъединичных белковых комплексов, содержащих более 80 белков, кодируемых ядерной ДНК, а также 13 субъединиц, кодируемых мтДНК. Митохондриальный Комплекс I (NADH: убихинооксидоредуктаза) является крупнейшим ферментом системы окислительного фосфорилирования с предполагаемым



размером 1 МДа. Это L-образный многобелковый комплекс, состоящий из 45 различных субъединиц, организованных в шесть модулей (N, Q, ND1, ND2, ND4, ND5), распределенных на два плеча:

- Гидрофобное плечо встроено во внутреннюю мембрану митохондрий, осуществляет транспорт протонов, включает модули N, Q и содержит единственные семь субъединиц комплекса I, которые кодируются мтДНК (MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6), в то время как остальные субъединицы кодируются яДНК.
- Гидрофильное (периферийное) плечо выступает в митохондриальный матрикс, отвечает за перенос электронов от NADH к CoQ через флавиномононуклеотид и несколько Fe-S кластеров, включает модули ND1, ND2, ND4, ND5, а его субъединицы кодируются яДНК.

Нарушения в функционировании митохондриального комплекса I являются наиболее частой причиной дефектов митохондрий. С митохондриальными расстройствами, основанными на дефиците первого комплекса, связывают мутации 39 различных ядерных генов. Большинство мутаций ядерных генов, приводящих к митохондриопатиям, поражают субъединицы, расположенные NADH-дегидрогеназе и Q-модуле гидрофильного периферического плеча. Мутации поражают как основные субъединицы, связанные с катализом (NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8), так и отвечающие за сборку и стабильность комплекса I (NDUFS4, NDUFS6, NDUFA2, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA1, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUF. B3, NDUFB8, NDUFB9, NDUFB10, NDUFB11, NDUFC2), что в целом вызывает дефицит активности фермента НАДН:убихиноноксидоредуктазы. Однако, дестабилизация комплекса I также приводит и к нескольким дополнительным дефектам на клеточном уровне, включая изменение морфологии митохондриальной сети, мембранного потенциала, внутриклеточного гомеостаза кальция и гиперпродукцию активных форм кислорода. Для 14 генов пока не обнаружено и/или не опубликовано мутаций, приводящих к митопатологии: *Ndufa5*, *Ndufab1*, *Ndufs5*, *Ndufb4*, *Ndufv3*, *Ndufc1*, *Ndufb1*, *Ndufb2*, *Ndufb5*, *Ndufb6*, *Ndufaf7*, *Ecsit Ndufa3*. Однако, благодаря всё более часто применяемой стратегии секвенирования экзона или всего генома при молекулярно-генетическом анализе пациентов, в ближайшее время можно ожидать появления данных о новых патологических мутациях [407; 403; 408; 409; 406].

Первое описание мутации в кодируемой яДНК субъединице комплекса I было опубликовано в 1998 г. и в данной работе был представлен пациент с синдромом Лея (Лейга/Ли/Leigh) у которого был обнаружен дефицит фермента комплекса I в мышечной ткани и в культуре фибробластов кожи [410]. Синдром Лея диагностируют почти у 80% детей с дефицитом комплекса I и проявляется он двусторонним симметричным поражением базальных ганглиев, ствола мозга, таламуса и/или мозжечка, высоким уровнем лактата, что приводит к

развитию энцефалопатии, гипотонии, задержки развития, психомоторным дисфункциям, дистонии, судорогам, дисфагии, дыхательной недостаточности и ранней смертности. Мутации, вызывающие синдром Лея, обнаружены почти во всех генах комплекса I, не только в ядерных, но и в генах мтДНК. Только около 30% случаев синдрома Лея имеют происхождение от мтДНК, а остальные связаны с мутациями ядерного генома. Однако это не специфический симптом дефицита комплекса I, так как он также может быть вызван дефектами других ферментов, в том числе комплексов II, III, IV и V, нарушением репликации мтДНК, транскрипции и трансляции, биосинтеза кофермента Q, метаболизма пирувата, окисления жирных кислот, дефицитом пируватдегидрогеназы и белков, опосредованно влияющих на функционирование системы окислительного фосфорилирования [411; 412].

Среди других клинических фенотипов дефицита первого комплекса рассматривают энцефалопатию, макроцефалию с прогрессирующей лейкодистрофией, гипертрофическую кардиомиопатию, ацидоз, тубулопатию, заболевание печени и почек, оптическую невропатию, миопатию, некоторые формы болезни Паркинсона [413; 414]. Отдельно выделяют синдром X-сцепленной микрофтальмии с линейным кожным дефектом (синдром MLS), вызванный мутацией в гене *NDUFB11* [415]. Симптомы дефицита комплекса I чаще всего проявляются в детском возрасте и примерно 75% пациентов умирают в возрасте до десяти лет, из которых почти 50% — в возрасте до двух лет [416].

Проблемы гетерогенности, фенотипирования, диагностирования, объяснения механизма развития митохондриальных заболеваний могут быть решены при помощи моделирования митопатологий на живых организмах. Мутантные животные модели могут пролить свет на функцию генов, отвечающих за митохондриальные белки. Ввиду высокой консервативности митохондриальных белков между разными видами имеется широкий выбор модельных объектов для исследования последствий мутаций у человека.

### **Животные модели митохондриальных расстройств**

Выбор животной модели митопатологии всегда остается предметом многочисленных дискуссий. Ни одна модель по своей сути не является «хорошей» или «плохой», о ценности отдельной модели можно судить только в контексте конкретного проекта. Выбор вида, пола, генетических свойств модельного объекта должен отталкиваться от направления исследования для наиболее подробного раскрытия поставленных целей и/или достижения максимально адекватного переноса полученных результатов с животного на человека. Однако, также необходимо проанализировать вопрос возможности использования организмов, стоящих на более низкой ступени эволюции без ущерба получения репрезентативных результатов. Не

малую роль в выборе экспериментального организма должны играть факторы доступности объекта, удобства манипуляций, стоимости проведения исследований и простота обслуживания. При планировании исследования митохондриальных расстройств человека, в выборе экспериментального объекта, необходимо основываться на генетической и физиологической гомологии. Генетическая дивергенция между человеком и другими млекопитающими составляет порядка 90 миллионов лет. Например, между человеком и такими модельными объектами как карликовые свиньи (*Porcula salvania*) и овцы (*Ovis aries*), она достигает 94 млн лет, а с кроликами (*Oryctolagus cuniculus*) и крысами (*Rattus norvegicus*) - 87 млн лет [417]. Поэтому геномы всех млекопитающих считаются сравнительно схожими. Однако, в течение многих лет именно лабораторная мышь (*Mus musculus*) остается квинтэссенцией модельных объектов для исследования генетических митопатологий человека. В целом, мыши и люди имеют практически одинаковый набор генов. В среднем, области генома мыши и человека, кодирующие белок, идентичны на 85 процентов. Почти каждый ген, найденный у одного вида, был обнаружен в близкородственной форме у другого, некоторые гены идентичны на 99 процентов, а другие — только на 60 процентов [418; 419; 420].

Первые генетические исследования на мышах оттачивались не от изменения генотипа, моделирующего патологию, а от схожих с исследуемой патологией фенотипов, возникающих вследствие случайных, естественных мутаций или вызванных воздействием мутагенных факторов. С появлением методов редактирования генома мышей упразднилась необходимость подбора соответствующего фенотипа, и стало возможным создавать специфические мутации в геноме мыши для изучения их последствий. Таким образом, мышинные модели чрезвычайно важны для выяснения функции генов и исследования патологических процессов, связанных с их мутациями [18].

Более чем для 50% митопатологий, вызванных мутациями ядерных генов, разработаны соответствующие мышинные модели с изменённым геномом. Однако, в половине случаев полная инактивация исследуемого гена приводит к эмбриональной летальности, хотя у людей с подобной патологической мутацией может наблюдаться только детская смертность [402; 408; 409; 406; 421; 422]. Для преодоления этого препятствия в моделировании заболеваний проводят оценку гетерозиготных мутантов по интересующему гену. Хотя многие гетерозиготные мутанты не проявляют патологического фенотипа, другие становятся модельным объектом, так, например гетерозиготные мыши *Risp<sup>+P224S</sup>* проявляют ожидаемое снижение активности митохондриального комплекса III [423] или мыши *Tfam<sup>+/-</sup>* демонстрируют синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК, характерный для людей с мутацией данного гена [424]. Другим подходом исследования «летального гена» стало создание условных тканеспецифичных нокаутов по исследуемому гену. Почти для всех летальных мутаций ядерных генов

митопатологий разработаны такие нокауты для тканей и органов, которые более всех должны быть подвержены поражению для каждой конкретной мутации [402; 408; 409; 406; 421; 422]. Так же в случае эмбриональной летальности идеальным объектом исследования становятся икринки рыб *Danio rerio* и амфибий *Xenopus*, их мальки и головастики соответственно [425; 426; 427]. Эти животные модели хорошо зарекомендовали себя в исследованиях с редактированием генома [428]. На ранних стадиях развития *Danio rerio* и *Xenopus* полупрозрачные, что позволяет непрерывно в реальном времени оценивать и контролировать развитие основных внутренних органов. *Danio rerio* и *Xenopus* развиваются независимо от родительского организма и доступны для непосредственного воздействия препаратами на разных стадиях эмбриогенеза [429]. Кроме того, разработана батарея поведенческих тестов для анализа нейродегенеративных расстройств на этих животных моделях [430; 431; 432; 433].

В ниже представленной таблице можно ознакомиться с клиническими проявлениями ряда митохондриальных расстройств человека и разработанными моделями мышей, мутантных по соответствующему гену (Таблица 5.).

К сожалению, возникают ситуации, когда манипуляции с мышинным геномом, которые должны приводить к развитию митохондриального расстройства, не отражают клиническую картину гомологичной патологической мутации у человека [434]. Эти противоречивые результаты, с одной стороны, связывают с более высокой устойчивостью мышей к митохондриальным расстройствам [435], с другой стороны некоторые мутации у человека могут проявляться в сочетании с более сложными факторами, такими как образ жизни пациента и сопутствующие заболевания [436]. Выходом из подобных обстоятельств может стать использование иной животной модели. Например, в случае мутации гена, кодирующего митохондриальный белок, участвующий в сборке цитохром-С-оксидазы, у человека диагностируют синдром Лея (Лейга/Ли/Leigh), однако рекомбинантный, конститутивный мышинный нокаут *SURF1*<sup>-/-</sup> не воспроизводит тяжесть клинического фенотипа человека. В итоге, в данном случае подходящими модельными объектами стали мутантные свиньи *SURF1*<sup>-/-</sup> с характерной общей задержкой развития, мышечной слабостью, младенческой задержкой развития центральной нервной системы и резко сниженной продолжительностью жизни [437].

Следует отметить вклад альтернативных объектов исследования для моделирования основных митохондриальных процессов и некоторых аспектов патологий человека:

- Лабораторные рыбы *Danio rerio* (Зелбрафиши) считаются оптимальным альтернативным мышам позвоночным объектом исследования. На лабораторных рыбах есть возможность смоделировать синдром Лея, в частности с дисфункцией печени, митопатологии, затрагивающие нервную, иммунную и сердечно-сосудистую системы. Кроме того, как упоминалось выше, разработаны поведенческие тесты для оценки нарушений двигательной

активности и сенсорных реакций, характерных для клинических проявлений митохондриальных расстройств, в частности синдрома Лея [438; 439].

- Несмотря на сильные расхождения в генетической дивергенции относительно человека – 686 млн лет [417], нематоды *Caenorhabditis elegans* и мушки *Drosophila melanogaster* стали мощными генетическими моделями митохондриальных патологий и имеют большой потенциал в ранних высокопроизводительных скринингах терапевтических агентов [440; 441].
- Микроорганизмы также используются для изучения митохондриальных расстройств. Так, функции митохондрий у человека и *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи) в высокой степени схожи, и в этом микроорганизме можно воспроизвести патогенные мутации, которые приводят к дисфункции митохондрий у людей. Дрожжи показали себя хорошей альтернативной моделью для изучения митохондриальных заболеваний [442] и скрининга терапевтических соединений [443].

#### **Сводная таблица животных моделей митохондриальных заболеваний человека, вызванных мутациями в ядерных генах**

В результате анализа литературных источников, посвященных описанию различных митохондриальных болезней [402; 408; 409], а также информации с регулярно-обновляемых ресурсов Genomics England PanelApp [406] и Online Mendelian Inheritance in Man [421; 422] в процессе написания данной работы была создана Таблица, в которой суммированы и сопоставлены самые современные данные о клинических проявлениях митохондриальных заболеваний, вызванных мутациями в ядерных генах, с описанием животных моделей, соответствующих данным митопатологиям. Представленная Таблица может быть полезна как для планирования и анализа поисковых и клинических исследований, так и для написания научных трудов и публикаций.

Таблица 5. Животные модели митохондриальных заболеваний человека, вызванные мутациями в ядерных генах

Ген	Клиническая картина	Тип наследования
<b>Дефицит митохондриального комплекса I</b>		
<p><i>ACAD9</i> acyl-CoA dehydrogenase family, member 9</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• снижение толерантности к физической нагрузке,</li> <li>• легкий дефицит бета-окисления</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с нокаутом <i>Acad9</i> [31]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• полная инактивация <i>Acad9</i> приводит к эмбриональной летальности;</li> <li>• при кардиоспецифичном нокауте <i>Acad9</i> в сердечной ткани не экспрессируются гены <i>Acadv1</i> (кодирует длиноцепочечную ацил-CoA-дегидрогеназу) и <i>Ecsit</i> (кодирует белок, участвующий в сборке комплекса I), снижена экспрессия <i>Acadm</i>, кодирующего среднецепочечную ацил-CoA-дегидрогеназу, показана дисфункция комплекса I; диагностируется развитие кардиомиопатии с утолщением предсердий и желудочков к 14-му дню жизни;</li> <li>• при тканеспецифичном для мышц нокауте <i>Acad9</i> снижена толерантность к физической нагрузке и лактоацидоз</li> </ul>		
<p><i>NDUFS1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея</li> <li>• кавитирующая лейкоэнцефалопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufs1</i> мыши летален [32]		
<p><i>NDUFS4</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 4</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• комбинированный дефицит комплексов I и III,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с полным нокаутом гена <i>Ndufs4</i> [33–35]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лея-подобный синдром,</li> <li>• атаксия, неврологические нарушения,</li> <li>• задержка развития,</li> <li>• развитие слепоты к 21 дню жизни,</li> <li>• ранняя смертность.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Ndufs4</i>, направленный на нейроны и глию [36]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• летальная прогрессирующая энцефалопатия,</li> <li>• реактивный фенотип глиальных клеток, потеря нейронов, атаксия;</li> <li>• нарушение дыхания.</li> </ul> <p>Кардиоспецифичный нокаут <i>Ndufs4</i> [37, 38]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия.</li> </ul> <p>Точечная мутация в гене <i>Ndufs4</i> [39]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбриональная летальность гомозиготных мышечей <i>Ndufs4<sup>-/-</sup></i>,</li> <li>• снижение активности комплекса I у гетерозиготных мышечей на фоне стабильной работы комплекса II</li> </ul>		
<p><i>NDUFS6</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лактоацидоз с летальным исходом в</li> </ul>	Аутосомно-

NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 6	неонатальном периоде, <ul style="list-style-type: none"> <li>• митохондриальная энцефаломиопатия,</li> <li>• синдром Лея</li> </ul>	рецессивный
Мыши с нокаутом гена <i>Ndufs6</i> [40, 41]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• кардиомиопатия, систолическая дисфункция;</li> <li>• заболевание почек с изменением ультраструктуры</li> </ul>		
<i>NDUFV1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• митохондриальная энцефаломиопатия,</li> <li>• церебральная атаксия,</li> <li>• синдром Лея</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Трансгенная линия <i>Caenorhabditis elegans</i> (почвенная нематода) по гену <i>Nio-1</i> , гомологу <i>Ndufv1</i> [42]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• лактоацидоз</li> <li>• снижение NADH-зависимого митохондриального дыхания,</li> <li>• гиперчувствительность к экзогенному окислительному стрессу</li> </ul>		
<i>NUBPL</i> nucleotide-binding protein-like protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• лейкоэнцефалопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Nubpl</i> мыши летален [32]		
<i>NDUFAF7</i> NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• патологическая миопия</li> </ul>	
Летальность мышей с гомозиготным нокаутом гена <i>Ndufaf7</i> [15]. Морфолинопосредованный нокаунт <i>Ndufaf7</i> у <i>D. rerio</i> [15]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• задержка вылупления мальков,</li> <li>• морфологические аномалии,</li> <li>• снижение активности комплекса I</li> </ul>		
<i>NDUFS7</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase Fe-S protein 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufs7</i> мыши летален [32]		
<i>NDUFA1</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit a1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея</li> </ul>	X-сцепленный рецессивный
Мутантные мыши с направленным разрушением мРНК субъединицы комплекса I, <i>Ndufa1</i> [43]: <ul style="list-style-type: none"> <li>• дефицит комплекса I, увеличение уровня активных форм кислорода;</li> <li>• поражение зрительного нерва и сетчатки</li> </ul>		
<i>NDUFA13</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit a13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия на фоне сенсорной недостаточности,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• рак щитовидной железы</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный

или <i>GRIM19</i> gene associated with retinoid- & interferon- induced mortality 19		
Мутантные мыши с дефицитом Grim19 [44]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбрионы Grim19<sup>-/-</sup> погибают к 9.5 дню эмбрионального развития,</li> <li>• замедление и аномалии развития бластоцист Grim19<sup>-/-</sup> на фоне нарушений в структуре митохондрий и дефектного комплекса I (в норме Grim19 располагается в комплексе I и отвечает за его сборку);</li> <li>• гетерозиготные мыши Grim19<sup>+/-</sup> не имеют физиологических и фенотипических аномалий</li> </ul>		
<i>NDUFA8</i> NADH- ubiquinone oxidoreductase subunit a8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• задержка развития,</li> <li>• микроцефалия,</li> <li>• эпилепсия,</li> <li>• потеря веса и отставание в физическом развитии,</li> <li>• дефекты в развитии речи</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный
Гомозиготный нокаут гена <i>Ndufa8</i> мыши летален [32]		
<i>NDUFB11</i> NADH- ubiquinone oxidoreductase 1 beta subcomplex, 11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• множественные врожденные пороки развития,</li> <li>• микрофтальмия с линейными кожными дефектами (MLS синдром),</li> <li>• эмбриональная мужская летальность,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• гистиоцитоидная кардиомиопатия,</li> <li>• офтальмомикрия,</li> <li>• дефекты кожи</li> </ul>	X-сцепленный
Нокаун гена <i>Ndufb11</i> у <i>Drosophila</i> [45]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• сокращение продолжительности жизни,</li> <li>• снижение скорости метаболизма,</li> <li>• дефекты сборки комплекса I,</li> <li>• увеличение уровня лактата и пирувата</li> </ul>		
<b>Дефекты электрон-транспортной цепи митохондрий; нарушение OXPHOS</b>		
<i>UCP2</i> uncoupling protein 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ожирение</li> </ul>	не показано
Мыши с нокаутом гена <i>Ucp2</i> [46, 47]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• отсутствие ожирения, нормальная реакция на воздействие холода или диету с высоким содержанием жиров,</li> <li>• устойчивы к инфекции <i>Toxoplasma gondii</i> (образует кисты в головном мозге) за счет увеличения уровня активных форм кислорода в макрофагах,</li> <li>• повышенная секреция инсулина, стимулированная глюкозой, что специфично для сахарного диабета II типа.</li> </ul>		
Мутантные мыши с повышенной экспрессией <i>Ucp2</i> в гипокретиновых (орексин) нейронах [48]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• мышцей у «Hcrt-Ucp2» повышена температура гипоталамуса, что приводит к общему снижению тела на 0.3–0.5°C,</li> </ul>		



- обладают повышенной энергетической эффективностью и большей средней продолжительностью жизни.

Мыши с нокаутом гена *Ucp1* [49]:

- чувствительны к холоду, что указывает на нарушение терморегуляции,
- накапливают избыточный жир в буро-жировой ткани, но не становятся тучными,
- потерю *Ucp1* компенсирует *Ucp2*, экспрессирующийся в буром эпидидимальном жире.

Мыши с нокаутом гена *Ucp3* [50]:

- инактивация *Ucp3* связана с повышенной регуляцией *Ucp1* и *Ucp2* в буро-жировой ткани,
- в скелетных мышцах увеличивается соотношение дыхания состояний 3 и 4, как следствие утечки протонов,
- в скелетных мышцах повышение производства активных форм кислорода и снижение митохондриальной аконитазы

<p><i>PDHA1</i> pyruvate dehydrogenase, alpha-1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нарушение связи между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот,</li> <li>• синдром Лея,</li> <li>• дефицит пируватдегидрогеназы E1-альфа,</li> <li>• неврологическая дисфункция,</li> <li>• лактоацидоз,</li> <li>• задержка роста,</li> <li>• ранняя смертность</li> </ul>	<p>X-сцепленный доминантный</p>
<p>Инактивация гена <i>Pdha1</i> пируватдегидрогеназы мышца эмбрионально летальна [51]. Мутантные <i>D. rerio</i> с дефектами зрительной функции «ноа» (no optokinetic response a) имеют дефицит дигидролипоамид-S-ацетилтрансферазы (Dlat), субъединицы PDH E2 [16]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• фенотип, сходный с синдромом дефекта комплекса пируватдегидрогеназы у человека (неврологическая дисфункция, лактоацидоз, задержка роста, ранняя смерть).</li> </ul>		
<p><i>PDSS2</i> genyl diphosphate synthase, subunit 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дефект синтеза убихинона, CoQ10;</li> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• тубулопатия,</li> <li>• атаксия</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Эмбриональная летальность мышцей с нокаутом гена <i>Pdss2</i> [52]. Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на подоциты почечных клубочков [52]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• нефротический синдром без изменений уровня кофермента Q в гомогенатах почек.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на гепатоциты [52]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• истощение кофермента Q в гомогенатах печени,</li> <li>• дисфункция митохондриальной дыхательной цепи,</li> <li>• нарушение основных метаболических процессов.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный нокаут <i>Pdss2</i>, нацеленный на почки (<i>Pdss2<sup>kd/kd</sup></i>) [53]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• аномалии ультраструктуры почечных митохондрий, почечная недостаточность CoQ, снижение активности дыхательной цепи, повышенный окислительный стресс,</li> <li>• развитие нефропатии с протеинурией вплоть до летальной почечной недостаточности,</li> <li>• аномалии мозжечка.</li> </ul>		
<p><i>COQ9</i> coenzyme Q9</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Дефицит коэнзима Q10 (убихинона)</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
<p>Мыши с укороченной мутацией R239X в гене <i>Coq9</i> [54]:</p>		

<ul style="list-style-type: none"> <li>• нарушение дыхания митохондрий с потерей АТФ и активности комплекса I,</li> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• гибель нейронов, демиелинизация, вакуолизация, губчатая дегенерация и астроглиоз,</li> <li>• фиброз сердца,</li> <li>• нарушение двигательной функции и прогрессирующий паралич,</li> <li>• ранняя смертность.</li> </ul>		
<i>CYCS</i> cytochrome C somatic isoform	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Тромбоцитопения</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
<p>Дефицит Cyt C у мышей вызывает эмбриональную гибель и ослабляет стресс-индуцированный апоптоз [55].</p> <p>Мыши, экспрессирующие мутантный Cyt C (аллель KA), с сохранением функции переноса электронов, но с дисфункцией активации Araf-1 [56]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• экзенцефалия и гидроцефалия,</li> <li>• кахексия,</li> <li>• лимфопения.</li> </ul>		
<i>COQ2</i> coenzyme Q2, polyprenyltransferase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефаломиопатия,</li> <li>• тубулопатия,</li> <li>• атаксия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• склонность к множественной системной атрофии</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный / доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Coq2</i> у мыши летален [32]		
<b>Дефицит митохондриального комплекса II</b>		
<i>SDHD</i> succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• параганглиома и стромальная саркома желудка,</li> <li>• феохромоцитома</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный / доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Sdhd</i> у мыши летален. [57, 58]		
<i>SDHA</i> succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• кардиомиопатия,</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• нейродегенерация с атаксией,</li> <li>• атрофия зрительного нерва,</li> <li>• параганглиома.</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
Гомозиготный нокаут гена <i>Sdha</i> у мыши летален [32]		
<b>Дефицит митохондриального комплекса III</b>		
<i>BCS1L</i> BCS1 homolog, ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия,</li> <li>• тубулопатия,</li> <li>• печеночная дисфункция,</li> <li>• синдром Бьёрнстада,</li> <li>• GRACILE-синдром.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мыши с гомозиготной мутацией <i>Bcs1l</i> [59]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• мышечная модель синдрома GRACILE – неонатального МБ с поражением печени и почек,</li> <li>• задержка роста и короткая продолжительность жизни,</li> </ul>		

- истощение печеночного гликогена, стеатоз, фиброз, цирроз, тубулопатия,
- лактоацидоз,
- дефицит комплекса III в печени, сердце и почках.

*UQCRCF1*  
ubiquinol-  
cytochrome c  
reductase,  
rieske iron-sulfur  
или  
*RISP*  
Rieske iron-sulfur  
protein

- гипертрофическая кардиомиопатия,
- тромбоцитопения,
- гипотония,
- повышенный уровень лактата и аланина в сыворотке,
- незначительные нарушения двигательных навыков со снижением мышечной силы.

Аутосомно-  
рецессивный

Гомозиготная мутация *Risp* у мышей летальна [13].

У гетерозиготных мутантов *Risp*<sup>+P224S</sup> мыши [13]:

- снижена активность комплекса III на фоне падения уровня железо-серного белка «RISP»,
- снижен общий метаболизм и продолжительность жизни у самцов, но не у самок.

Условный нокаут по гену *Risp* в нейронах мыши (сКО) с использованием системы Cre-loxP [60]:

- короткая продолжительность жизни,
- внезапная смерть с минимальными поведенческими изменениями,
- потеря веса,
- циклическая гиперактивность,
- сниженная работоспособность,
- обширный окислительный стресс,
- нейродегенеративные заболевания, гибель нейронов, поражение пириформной и соматосенсорной коры головного мозга, связанное с дефектом СIII области головного мозга.

Мутантные мыши с инактивацией *Risp* в регуляторных Т (Treg) клетках [61]:

- Treg-специфический дефицит комплекса III,
- развитие раннего, летального воспалительного заболевания;
- потеря способности подавлять Т-клетки без изменения пролиферации и выживания клеток Treg,
- увеличение метилирования ДНК.

#### Дефицит митохондриального комплекса IV

*COX4I2* или  
*COX4-2*  
cytochrome C  
oxidase, subunit  
4i2 / IV, isoform  
2

- экзокринная панкреатическая недостаточность,
- дизэритропоэтическая анемия,
- гиперостоз свода черепа,
- специфическая для легких изоформа субъединицы Cox4 CIV.

Аутосомно-  
рецессивный

Мутантные мыши с инактивацией гена *Cox4I2* [62]:

- патология легких с воспалением и формированием кристаллов Шарко–Лейдена (в мокроте при бронхиальной астме)

*COX6A2*  
cytochrome C  
oxidase, subunit  
6a2

- ранняя гипотония,
- слабость лицевых мышц и конечностей,
- высокий свод неба,
- дыхательная недостаточность,
- кардиомиопатия,

Аутосомно-  
рецессивный

- нарушение умственного развития.

Мутантные *Coxba2*<sup>-/-</sup> мыши [63]:

- стабильный аномально низкий вес даже на фоне высокожировой диеты, связанный с неэффективным энергетическим обменом, повышенным расходом энергии и адаптивным термогенезом,
- высокие уровни экспрессии *Ucp 1* и *2* в сердце и жировой ткани,
- волокна скелетных мышц функционируют в более медленном окислительном режиме,
- увеличение размера митохондрий мышц,
- повышенная толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину, что связано с повышенным фосфорилированием и конститутивной активацией *Ampk*

*COX10*

cytochrome C  
oxidase assembly  
factor

- дефицит митохондриального комплекса IV,
- атаксия,
- ацидоз,
- гипогликемия,
- гипотония,
- митохондриальная энцефалопатия,
- мышечная слабость,
- опущение верхнего века,
- пирамидный синдром,
- проксимальная тубулопатия,
- эпилептическое состояние,
- кардиомиопатия,
- гипотрофия,
- лактоацидоз,
- синдром Лея

Аутосомно-  
рецессивный

Мыши с тканеспецифичной для мышц инактивацией гена *Cox10* [64]:

- регрессивная миопатия и слабость,
- ранняя смертность,
- прогрессирующее снижение активности COX и повышение активности SDH в мышцах,
- нервно-мышечная патология, гистологически выявленные признаки разорванных красных волокон,
- аномальные митохондрии.

Мыши с тканеспецифичной для нейронов инактивацией гена *Cox10* [65]:

- снижение активности COX в коре головного мозга и гиппокампе,
- ранняя смертность,
- уменьшение размера и снижение плотности клеток переднего мозга,
- дефекты поведения.

Мыши с тканеспецифичной для печени инактивацией гена *Cox10* [66]:

- ранняя смертность,
- митохондриальная гепатопатия,
- снижение массы тела и общей активности,
- тяжелая дисфункция печени,
- сниженная активность COX и повышенная активность SDH,
- увеличение пролиферации митохондрий и снижение уровня АТФ,
- накопление липидов и истощение гликогена.

Условный нокаут гена *Cox10* характеризуется дисфункцией олигодендроцитов и

шванновских клеток формировать COX [67]:

- тяжелая невропатия с демиелинизацией, аномальные пучки Ремака в периферической нервной системе,
- мышечная атрофия, паралич,
- нарушение митохондриального дыхания.

<i>SURF1</i> surfeit 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
---------------------------	--	-----------------------

Мыши с инактивацией гена *Surf1*, кодирующего фактор сборки комплекса IV (COX).

Мутанты *Surf1Neo<sup>-/-</sup>* (замена 5–7 экзонов на кассету неомицрезистентности) [68]:

- 90% эмбриональная летальность (предположительно вызвана не инактивацией *Surf1*, а присутствием кассеты нео или удалением регуляторных элементов),
- сокращение продолжительности жизни,
- снижение двигательной активности, координации, мышечной силы и выносливости без явных аномалий морфологии головного мозга или неврологических симптомов,
- подавление фертильности у обоих полов,
- гистохимический анализ скелетных мышц и печени показал снижение активности COX и повышение SDH,
- падение активности COX до 23–40% от нормы в разных тканях.

Мутанты *Surf1loxP<sup>-/-</sup>* (введение последовательности loxP в экзон 7, генерирующий стоп-кодон в положении 225, с устранением 81 С-концевой аминокислоты) [69]:

- отсутствие эмбриональной летальности,
- увеличение продолжительности жизни,
- гистохимический анализ скелетных мышц показал снижение активности COX и повышение SDH,
- снижение активности COX на 50–70% в различных тканях,
- неврологические дефекты не развиваются, а проявляется устойчивость к опосредованному Ca<sup>2+</sup> поражению изолированных нейронов и головного мозга в целом,
- митохондрии сохраняют нормальную морфологию и мембранный потенциал.

Мутантные свиньи *SURF1<sup>-/-</sup>* [70]:

- общая задержка развития,
- младенческая задержка развития центральной нервной системы,
- мышечная слабость,
- короткая продолжительность жизни,
- дефицит цитохром-с-оксидазы в ворсинках тощей кишки (гистохимический анализ)

<i>SCO2</i> SCO cytochrome C oxidase assembly protein 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• невропатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• миопия</li> </ul>	Аутосомно-доминантный

- Мышиная модель с нокаутом *Sco2<sup>-/-</sup>* эмбрионально летальна [71].
- Гомозиготные мыши со вставкой в гене *Sco2* или с мутацией в компаунд-гетерозиготном состоянии жизнеспособны и демонстрируют недостаточность дыхательной цепи, дефекты сборки IV комплекса, снижение содержания меди в митохондриях и общую мышечную слабость [71].

<i>COX15</i> cytochrome C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Лея,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
------------------------------	---	-----------------------

oxidase assembly factor		
-------------------------	--	--

- Мыши с гомозиготным нокаутом *Cox15*<sup>-/-</sup> эмбрионально летальны [72].
- Мыши с тканеспецифичной для скелетной мышцы мутацией имеют тяжелую миопатию [72]

### Дефицит митохондриального комплекса V (АТФ-синтазы)

Дефекты АТФ-синтазы чаще всего связаны с мутациями мтДНК. Что касается мутаций в ядерных генах, то выделено пять генов, связанных с МБ человека. Три из них, *ATP5A1*, *ATP5D* и *ATP5E*, кодируют структурные  $\alpha$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -субъединицы фермента, соответственно, а два других, *ATPAF2* и *TMEM70*, кодируют специфические вспомогательные факторы, облегчающие биогенез АТФ-синтазы.

Все эти дефекты имеют сходный фенотип с выраженным генерализованным снижением содержания АТФ-синтазного комплекса:

- неонатальная гипотония,
- лактоацидоз,
- гипераммониемия,
- гипертрофическая кардиомиопатия,
- 3-метилглутаконовая ацидурия.

Мутации в генах *ATP5A1*, *ATP5D*, *ATP5E* и *ATPAF2* встречаются очень редко, а животные модели с этими мутациями в большинстве случаев летальны. Напротив, мутации в гене *TMEM70* представляют собой наиболее частую причину дефицита АТФ-синтазы

<i>TMEM70</i> transmembrane protein 70	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия,</li> <li>• лицевой дисморфизм,</li> <li>• гипертрофическая кардиомиопатия,</li> <li>• лактоацидоз.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
---	---	-----------------------

Мыши с гомозиготным нокаутом *Tmem70*<sup>-/-</sup> [73]:

- эмбриональная летальность,
- у эмбрионов задержка развития сердечно-сосудистой системы, нарушение ультраструктуры митохондрий сердца с кристами неправильной структуры.

Мыши с гетерозиготным нокаутом *Tmem70*<sup>+/-</sup> [73]:

- жизнеспособны,
- нормальный постнатальный рост и развитие митохондриальной системы OXPHOS,
- легкое ухудшение функции сердца.

Крысы с нокаутом гена *Tmem70*, созданным на генетическом бэкграунде линии SHR и под контролем универсального промотора EF-1 $\alpha$  [74]:

- жизнеспособная модель,
- генетическая комплементация восстановила экспрессию *Tmem70* в различных тканях,
- для полного восстановления физиологических функций митохондрий биохимической комплементации биогенеза АТФ-синтазы в печени достаточно 20% белка TMEM70 и одноаллельной экспрессии *Tmem70*, а в сердце не менее 40% TMEM70 и оба трансгенных аллеля

### Истощение (снижение содержания) мтДНК

<i>TYMP</i> thymidine phosphorylase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения мтДНК,</li> <li>• митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
--	---	-----------------------

Мыши с двойным нокаутом *Upp1/Tupr* [75, 76]:

- критический дефицит *Tupr*, повышенный уровень тимидина и дезоксиуридина в тканях, высокий уровень митохондриального дезокситимидинтрифосфата;
- частичное истощение мтДНК, недостаточность комплексов дыхательной цепи и энцефалопатия;
- интенсивные поражения головного мозга из-за повышения уровня пиримидина в плазме и последующего отека аксонов

<i>ANT1</i> adenine nucleotide translocator 1	• синдром истощения мтДНК	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	• гипертрофическая кардиомиопатия, • гипотония,	Аутосомно-рецессивный
	• прогрессивная внешняя офтальмоплегия.	Аутосомно-доминантный

Инактивация гена *Ant1* у мышей [77, 78]:

- митохондриальная миопатия, гипертрофическая кардиомиопатия, метаболический ацидоз,
- митохондриальная пролиферация в скелетных мышцах и в сердце,
- нарушение работы комплексов I, III и IV дыхательной цепи митохондрий, развитие окислительного стресса в тканях мышц и сердца,
- накопление множественных делеций мтДНК, дестабилизация мтДНК.

Инактивация гена *Ant4* у мышей [79]:

- дефект сперматогенеза, бесплодие самцов.

Одновременная инактивация генов *Ant1* и *Ant2* в печени мыши [80]:

- активность комплекса IV и уровни белка COI, цитохрома-С повышается для компенсации дефицита АТР ОXPHOS,
- для активации mtPTP требуется больше  $Ca^{2+}$ , чем обычно, а поры не могут регулироваться *Ant*-лигандами, включая адениновые нуклеотиды,
- гепатоциты способны реагировать на индукцию клеточной гибели,
- митохондрии печени демонстрируют увеличение частоты дыхания, отсутствие реакции на добавление ADP, увеличение мембранного потенциала

<i>TWINK</i> twinkle mtDNA helicase	• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК, • синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия, • синдром Перро (тип женского гипогонадизма), • младенческая форма спинно-мозжечковая атаксии,	Аутосомно-рецессивный
	• прогрессивная внешняя офтальмоплегия.	Аутосомно-доминантный

Мутантные мыши со сверхэкспрессией Twinkle [81]:

- аномальное увеличение количества копий мтДНК в мышцах и сердце.

Мыши с РЕО-ассоциированной мутацией, несущие замену треонина на аланин в положении 360 белка Twinkle мыши – Twinkle<sup>AT</sup> [82]:

- мягкий фенотип миопатии.

Мыши «Deletor» с РЕО-ассоциированной мутацией, несущие внутрирамочную дупликацию аминокислот 353–365 – Twinkle<sup>dup</sup> [82, 83]:

- митохондриальная миопатия; миофибриллярная структура заменяется увеличенными митохондриями с концентрическими кристами и пролиферацией,
- митохондриальная пролиферация в клетках Пуркинье мозжечка, пирамидных нейронах гиппокампа, нейронах серого покрова (слой серого вещества, закрывающий верхнюю поверхность мозолистого тела),
- сниженный уровень мтДНК в мозге (но не в мышцах и сердце),
- нарушения липидного обмена,
- профили экспрессии генов скелетных мышц с митохондриальной миопатией показали индукцию нескольких транскриптов, участвующих в ответе на аминокислотное и липидное голодание, активацию передачи сигналов Akt и связанного с голоданием гормона, фактора роста фибробластов-21.

<i>POLG</i> polymerase, DNA, gamma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• прогрессивная внешняя офтальмоплегия,</li> <li>• синдром SANDO – системное заболевание, характеризующееся нарушением координации движений, равновесия, поражением нервов – сенситивная атаксия, невропатия, дизартрия и офтальмопарез,</li> <li>• паркинсонизм.</li> </ul>	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия,</li> <li>• митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный

Мыши D257A (proofreading-deficient PolgA) [84–89]:

- увеличение уровней точечных мутаций и соматических мутаций мтДНК, индукция маркеров апоптоза,
- сокращение продолжительности жизни, уменьшение содержания подкожного жира, алоpecia, кифоз, остеопороз, анемия, снижение фертильности, увеличение сердца, анемия, потеря клеток кишечных крипт, веса и слуха, саркопения,
- дефицит PolgA у эмбрионов мыши вызывает раннюю остановку развития.

<i>TK2</i> thymidine kinase, mitochondrial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• миопатия,</li> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• прогрессивная внешняя офтальмоплегия.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
--	---	-----------------------

Мыши *Tk2*<sup>-/-</sup> с мутацией his126-to-asn (H126N) в гене *Tk2* [90, 91]:

- задержка роста, снижение активности, генерализованный грубый тремор и нарушение походки,
- смертность в 2-недельном возрасте,
- истощение мтДНК, наиболее заметное в головном мозге,
- снижение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий, уровня АТФ и соотношения АТФ/АДФ в головном мозге,
- дегенерация и дисфункция отдельных типов нейронов,
- аномальные вакуолярные изменения в нейронах спинного мозга,
- наличие активированных глиальных клеток в белом веществе спинного мозга и коре головного мозга,
- стремительно прогрессирующая энцефаломиелопатия.



<i>DGUOK</i> deoxyguanosine kinase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия,</li> <li>• нецирротическая портальная гипертензия / синдром Банти,</li> <li>• прогрессирующая внешняя офтальмоплегия.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мутантные мышцы <i>Dguok</i><sup>-/-</sup> [92]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• потеря веса, уменьшение жировой ткани,</li> <li>• дефицит мтДНК в печени, головном мозге, сердце, скелетных мышцах,</li> <li>• накопление липофусцина в тканях печени с усилением окислительного стресса,</li> <li>• усиление катаболического метаболизма липидов,</li> <li>• увеличение относительного веса печени, почек, сердца,</li> <li>• нарушение (осветление) пигментации шерсти.</li> </ul>		
<i>MPV17</i> mitochondrial inner membrane protein	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК,</li> <li>• синдром Альперса / прогрессирующая детская полиодистрофия,</li> <li>• перонеальная амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Мутантные мышцы <i>Mpv17</i><sup>-/-</sup> [93]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• истощение мтДНК в печени на фоне увеличенной скорости транскрипции,</li> <li>• истощение мтДНК в скелетных мышцах,</li> <li>• умеренное снижение ферментативной активности дыхательной цепи митохондрий и легкие изменения цитоархитектоники в печени,</li> <li>• нарушение (осветление) пигментации шерсти,</li> <li>• дегенерации кохлеарного сенсорного эпителия,</li> <li>• фокально-сегментарный гломерулосклероз с массивной протеинурией,</li> <li>• сокращенная продолжительность жизни.</li> </ul>		
TFAM mitochondrial transcription factor A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения (резкое снижение содержания) мтДНК.</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
<p>Гомозиготные <i>Tfam</i><sup>-/-</sup> мышцы [14]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• эмбрионально летальное истощение мтДНК.</li> </ul> <p>Гетерозиготные <i>Tfam</i><sup>+/-</sup> мышцы [14]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• уменьшение числа копий мтДНК и активности дыхательной цепи митохондрий в сердце.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для сердца и мышц нокаут гена <i>Tfam</i> [94]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ранняя смертность на фоне мозаичной кардиоспецифической прогрессирующей недостаточности дыхательной цепи, дилатационной кардиомиопатии и атриовентрикулярной блокады сердечной проводимости,</li> <li>• истощение мтДНК и белка <i>Tfam</i>, дефицит комплексов I и IV в сердце и мышцах.</li> </ul> <p>Тканеспецифичный для скелетных мышц нокаут гена <i>Tfam</i> [95, 96]:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• прогрессирующая миопатия, уменьшение мышечной силы, связанное с повышенным уровнем митохондриального Ca<sup>2+</sup>, снижением высвобождения Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматического ретикулума,</li> <li>• увеличенные митохондрии с деформированными кристами,</li> </ul>		

- снижение количества мтДНК, митохондриального транскрипта, функции дыхательной цепи и выработки АТФ.

Тканеспецифичный для дофаминергических нейронов среднего мозга мыши нокаут гена *Tfam* (MitoPark) [97]:

- развитие фенотипа подобного паркинсонизму, включая особенности поведения, потерю дофаминергических нейронов, наличие телец Леви,
- снижение экспрессии мтДНК и дефицит дыхательной цепи в дофаминергических нейронах среднего мозга.

Специфичный для Т-клеток нокаут гена *Tfam* мыши [98]:

- преждевременные признаки старения включая метаболические, когнитивные, физические и сердечно-сосудистые изменения,
- развитие цитокинового шторма стало индуктором старения,
- ранняя смертность.

Тканеспецифичный для  $\beta$ -клеток поджелудочной железы нокаут гена *Tfam* мыши [99]:

- развитие митохондриального диабета,
- повышенный уровень глюкозы, прогрессирующее снижение  $\beta$ -клеточной массы и соотношения эндо/экзокринной ткани поджелудочной железы,
- в мутантных  $\beta$ -клетках снижена активность СОХ при нормальной активности SDH, митохондрии аномально большого размера.

Тканеспецифичный для клеток неокортекса нокаут гена *Tfam* мыши [100]:

- мышечная модель митохондриальной нейродегенерации (MILON) с поздним началом (в районе 4–6 месяцев),
- в нейронах снижена активность дыхательной цепи, уровень мтДНК и мтРНК,
- повышенная уязвимость к эксайтотоксичному воздействию,
- короткая продолжительность жизни в финале с прогрессирующей нейродегенерацией и массивной гибелью клеток в гиппокампе и неокортексе.

Мутантные мыши с искусственной хромосомой P1 (PAC), экспрессирующие TFAM человека на фоне стабильной экспрессии TFAM мыши [101]:

- суммарная сверхэкспрессия TFAM,
- увеличение числа копий мтДНК при нормальной емкости дыхательной цепи и общей массы митохондрий,
- комбинация мутантов с сверхэкспрессией TFAM и нокаутом TFAM показала, что количество копий мтДНК прямо пропорционально зависит от общего уровня белка TFAM

### Нарушение метаболизма железа

<p><i>ABCB7</i> ATP-binding cassette, subfamily b, member 7</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• сидеробластная анемия с атаксией</li> </ul>	<p>X-сцепленный рецессивный</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• летальность полного нокаута гена <i>Abcb7</i> связывают с дефектом внеэмбриональной висцеральной энтодермы, которая преимущественно содержит X-хромосому в качестве активного аллеля [102],</li> <li>• X-инактивации и тканеспецифичные делеции показали, что <i>Abcb7</i> необходим для полноценного развития всех тканей, кроме гепатоцитов и эндотелиальных клеток [102],</li> <li>• в печени потеря <i>Abcb7</i> вызывала легкое повреждение митохондрий, нарушение сборки</li> </ul>		

цитозольного кластера Fe-S и изменение восприятия железа, но не приводила к летальному исходу [102].

<p><i>FXN</i> frataxin или <i>FRDA</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• атаксия Фридрейха.</li> </ul>	<p>Аутосомно-рецессивный</p>
--	--	------------------------------

Мутантные мыши с делецией экзона 4 гена *Frda* [103]:

- гомозиготная модель *Frda*<sup>-/-</sup> эмбрионально летальна,
- эмбриональная смертность не связана с аномальным накоплением железа.

Жизнеспособная линия мышей с тканеспецифичным дефицитом фратаксина создана при скрещивании гомозигот по условному аллелю *Frda* с гетерозиготами по делеции экзона 4 *Frda*, дополненной системой эксцизии *Cre/Lox* под контролем промотора мышечной креатинкиназы (далее линия мутантных мышей «МСК») или нейрон-специфической енолазы (далее линия мутантных мышей «NSE») [104, 105]:

- мутанты NSE не имеют явных признаков патологии, а посмертные исследования показали отсутствие отложений железа,
- в сердцах мутантных мышей «МСК» зафиксирован ранний дефицит комплексов I–III и активности аконитазы (7 день жизни),
- постепенная митохондриальная дегенерация развивается у мутантных мышей «МСК» с 4-х недельного возраста,
- с 7 недель в сердцах мутантных мышей «МСК» падает уровень окисления липидов и белков,
- внутримитохондриальное накопление железа у мутантных мышей «МСК» происходит на терминальной стадии (10–12 неделя жизни) после инактивации Fe/S-ферментов (4 неделя жизни) и развития дилатации сердца с гипертрофией левого желудочка (5 неделя жизни).

Тканеспецифичный нокаут *Frda* в гепатоцитах мыши [106]:

- высокий уровень окислительного стресса в печени,
- нарушение дыхания митохондрий, падение уровня АТФ и активности Fe/S-ферментов,
- сниженное ОХРНOS,
- развитие множественных опухолей печени,
- сокращение продолжительности жизни.

Двойные гетерозиготные мутанты, созданные путем скрещивания мышей со вставкой повторов GAA в гене *Frda* (у человека интронная экспансия триплетов GAA в гене *FXN* вызывает дефицит фратаксина и, как следствие, атаксию Фридрейха) с мышами с нокаутом гена фратаксина [107–109]:

- длина повтора GAA определяет возраст начала соматической нестабильности, а также скорость и величину мутации;
- мыши *Frda*<sup>- /230GAA</sup> жизнеспособны и не имеют ярко выраженного патологического фенотипа:
- на данной модели показано, что в основе повышенного липогенеза в скелетных мышцах и изменений состава волокон в сердце, согласующихся с резистентностью к инсулину и кардиомиопатией, лежит нарушение регуляции пути гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\gamma$ ).

*Drosophila* с инактивацией гена *Dfh*, гомолога фратаксина [110, 111]:

- пролонгация личиночной стадии и сокращение жизни взрослых особей,

- увеличение размера личинок,
- нарушение экспрессии ферритина только у взрослых особей,
- $H_2O_2$  является важным патологическим субстратом, лежащим в основе фенотипов, возникающих при дефиците фратаксина у *Drosophila*.

### Мутации в ядерных генах антиоксидантной защиты

<i>SOD1</i> superoxide dismutase 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• боковой амиотрофический склероз,</li> <li>• спастическая тетраплегия,</li> <li>• аксиальная гипотония</li> </ul>	Аутосомно- рецессивный /доминантный
--	---	---

Мутантные мышцы с сверхэкспрессией *Sod1* – основная модель бокового амиотрофического склероза. Создано несколько линий трансгенных мышечей с различными формами мутаций *Sod1*, сверхэкспрессированных на разных уровнях. Наиболее часто используемой моделью бокового амиотрофического склероза стали мышцы с мутацией *SOD1*<sup>G93A</sup> [112–114].

Мыши с дефицитом Cu/ZnSOD, нокаутом гена *Sod1* [115, 116]:

- увеличение количества митохондрий и гранул липофусцина в гепатоцитах,
- повсеместное окислительное повреждение,
- гепатоканцерогенез,
- дисфункция сетчатки,
- короткая продолжительность жизни.

<i>SOD2</i> superoxide dismutase 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• микроангиопатия при сахарном диабете.</li> </ul>	Не установлено
--	---	-------------------

Мыши с дефицитом MnSOD, нокаут гена *Sod2*, созданные на генетическом бэкграунде инбредной линии C57BL6/J2 [117]:

- тяжелая анемия, дегенерация нейронов в базальных ганглиях и стволе мозга,
- прогрессирующие двигательные нарушения, характеризующиеся слабостью, утомляемостью и вращательным поведением,
- обширные митохондриальные повреждения в дегенерирующих нейронах и сердечных миоцитах,
- повышенная восприимчивость к окислительному повреждению митохондрий.

Мыши с дефицитом MnSOD, нокаут гена *Sod2*, созданные на генетическом бэкграунде аутбредной линии CD1 [118, 119]:

- короткая продолжительность жизни,
- дилатационная кардиомиопатия,
- накопление липидов в печени и скелетных мышцах,
- метаболический ацидоз,
- дефицит железо-серного центра, аконитазы, цитратсинтазы, комплексов II и I в сердце и мозге,
- накопление окислительных повреждений ДНК,
- развитие органической ацидурии.

Гетерозиготные *Sod2*<sup>+/-</sup> мыши [120]:

- модель «свободнорадикальной теории старения» – хронического окислительного повреждения тканей и клеток,
- у мышечей среднего возраста хроническое окислительное повреждение липидов во внутренней митомембране приводит к увеличению выхода протонов,
- мышцы среднего и пожилого возраста имеют высокочувствительный mtPTP, что

связано с трехкратным увеличением апоптотических гепатоцитов,		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• снижение митохондриальной функции, сопровождается повышением активности ферментов дыхательной цепи.</li> </ul>		
<i>GPX1</i> glutathione peroxidase 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• гемолитическая анемия из-за дефицита глутатионпероксидазы</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
Инактивация гена <i>GPx1</i> у мышей показала [121–123]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• GPx1 сильно экспрессируется в печени, головном мозге и почечной коре, но очень слабо в сердце и скелетных мышцах,</li> <li>• Gpx1 играет критическую роль в защите от окислительного стресса, в механизмах антиоксидантной защиты,</li> <li>• <i>GPx1</i><sup>-/-</sup> мыши жизнеспособны, но у них снижена масса тела и отмечена хроническая задержка роста,</li> <li>• митохондрии <i>GPx1</i><sup>-/-</sup> выделяют в 4 раза больше H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в печени, но не в сердце, что, предположительно, связано с наличием каталазы в митохондриях сердца.</li> </ul>		
Сверхэкспрессия <i>GPx1</i> в сердце мышей на фоне моделирования инфаркта миокарда (перевязка левой коронарной артерии) привела к лучшим показателям и выживаемости по сравнению с мышами дикого типа [124].		
<b>Мутации в ядерных генах митохондриальной динамики</b>		
<i>MFN2</i> mitofusin 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• аксональная амиотрофия Шарко–Мари–Тута</li> </ul>	Аутосомно-доминантный / рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• наследственная моторная сенсорная нейропатия</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
Тканеспецифичная для мозжечка инактивация гена <i>Mfn2</i> у мышей [125, 126]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• модель нейродегенерации, вызванная потерей слияния митохондрий,</li> <li>• 50% смертность в помете; для эмбрионов показано разрушение гигантоклеточного слоя плацентарного трофобласта; фрагментированные митохондрии в эмбриональных фибробластах,</li> <li>• клетки Пуркинье <i>Mfn2</i><sup>-/-</sup> имеют аномальную морфологию, короткие, тонкие и менее разветвленные дендритные деревья со сниженным количеством шипов; изменения морфологии, ультраструктуры и распределения митохондрий со снижением активности комплексов I и IV и увеличением активности комплекса II,</li> <li>• у выживших мышей атрофия мозжечка на 75% за счет снижения количества и качества клеток Пуркинье; нарушение координации движений.</li> </ul>		
Тканеспецифичная инактивация гена <i>Mfn2</i> в периферических двигательных нейронах [127]:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• у гомозиготных особей отсутствие способности сгибать задние лапы с атрофией передних икроножных мышц; укороченные, деформированные хвосты с изгибами и утолщениями;</li> <li>• в двигательных аксонах <i>Mfn2</i><sup>-/-</sup>, при общем снижении их количества, фиксируют аномалии в распределении митохондрий с образованием плотных кластеров.</li> </ul>		
<i>OPA1</i> OPA1 mitochondrial dynamin-like GTPase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• атрофия зрительного нерва,</li> </ul>	Аутосомно-доминантный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром Бера,</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• синдром истощения мтДНК,</li> </ul>	не установлено
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• склонность к развитию глаукомы.</li> </ul>	не установлено

Мыши с мутаций в гене *Opal*, кодирующей ядерную динамин-родственную GTP-азу, которая локализуется в митохондриях [128, 129]:

- снижение уровня белка *Opal* на 50%,
- гомозиготная мутация эмбрионально летальна,
- у гетерозиготных особей обнаруживают возрастную дегенерацию ганглионарных клеток сетчатки и снижение зрительной функции,
- в зрительных нервах *Opal<sup>+/-</sup>* снижено количество аксонов, а у оставшихся аномальная форма, нерегулярная миелинизация, уменьшение количества нейрофибрилл и морфологически аномальные митохондрии с дезорганизованными кристами,
- изменение морфологии фибробластов *Opal<sup>+/-</sup>* с увеличением митохондриального деления и фрагментации/

#### Дефект деления митохондрий и пероксисом

<i>DNM1L</i> dynamamin 1-like	<ul style="list-style-type: none"> <li>• энцефалопатия,</li> <li>• микроцефалия,</li> <li>• атрофия зрительного нерва,</li> <li>• лактоацидоз.</li> </ul>	Аутосомно-доминантный / рецессивный
----------------------------------	---	-------------------------------------

Гомозиготный нокаут гена *Drp1* у мышей летален [130].

- у эмбрионов *Drp1<sup>-/-</sup>* нарушение развития сердца и печени, истощение клеточного слоя нервной трубки, увеличенные митохондрии,
- цитокинез в фибробластах *Drp1<sup>-/-</sup>* протекает асимметрично,
- нейрональные клетки высокочувствительны к  $Ca^{2+}$ -зависимому апоптозу.

Мыши со специфичной для нервных клеток делецией *Drp1* (*NS-Drp1<sup>-/-</sup>*) [130]:

- младенческая смертность в результате гипоплазии и апоптоза головного мозга,
- анализ первичной культуры переднего мозга *NS-Drp1<sup>-/-</sup>* показал, что агрегированные митохондрии не могут должным образом распределяться в отростках нервных клеток,
- нейрональные клетки высокочувствительны к  $Ca^{2+}$ -зависимому апоптозу.

Гетерозиготный нокадаун *Dnm1l* у мышей приводит к удлинению митохондриальной сети ганглиозных клеток сетчатки, но не к дегенерации аксонов в зрительном нерве [131].

#### Дефицит кофакторов митохондриальных ферментов

<i>SLC19A2</i> solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Тиамин (витамин B1) чувствительная мегалобластная анемия (TRMA)</li> </ul>	Аутосомно-рецессивный
---	---	-----------------------

Мутантные мыши с инактивацией гена *Slc19a2*, кодирующего высокоаффинный переносчик тиамина *Thtr-1* [132, 133]:

- отсутствие высокоаффинного компонента транспорта тиамина,
- сахарный диабет со сниженной секрецией инсулина и усиленным ответом на инсулин,
- нейросенсорная глухота, потеря внутренних волосковых клеток в улитке,
- аномальный костный мозг с мегалобластозом

**Заключение по §3 главы 1.**

Митохондриальные расстройства крайне гетерогенная группа наследственных заболеваний. Многие патогенные мутации, вызванные как мтДНК, так и яДНК, проявляются в специфических фенотипах. Поэтому перед исследователями остро стоит задача описать фенотипы митохондриальных мутаций и выявить механизм, по которому та или иная мутация в генах, кодирующих митохондриальные белки, проявляется на уровне целого организма. Эта проблема может быть решена при помощи моделирования митохондриальных заболеваний на живых организмах. Манипуляции с геномом экспериментальных объектов, в особенности мышей, зачастую способны точно смоделировать клиническую картину человеческих митохондриальных заболеваний, дав возможность исследовать патологические механизмы и проводить тестирования новых методов лечения. Даже модели, которые лишь частично воспроизводят фенотип мутаций человека, могут дать важную информацию о механизмах заболевания.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ

Исследование было проведено на живых животных в соответствии с требованиями регламентирующей документации FELASA Working Group, 2007.

Все манипуляции проводились в соответствии с протоколами исследований №79 от июля 2015г. и №133 от 23 апреля 2018г., утвержденными локальной комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (Москва, Россия, <http://www.vec-msu.ru/>), а также согласно протоколу №76 от 10 мая 2018г., утвержденному комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

### Источник получения инбредных линий

Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия)

### Содержание животных

Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках (система IVC, TECNIPLAST S.p.A., Италия) при свободном доступе к гранулированному комбикорму и воде, очищенной обратным осмосом; в среде, свободной от специфических патогенов, при световом режиме 12/12 (включение света в 09:00), в помещениях с кратностью воздухообмена не менее 15 об/ч, с температурой воздуха 20–24°C, влажностью 30–70%. В качестве подстила использована деревянная щепка с минимальным образованием пыли. В качестве обогащения среды использованы укрытия и строительные материалы для гнезд из естественных материалов. Все материалы, поступающие к животным, стерилизованы путем автоклавирования.

### Конструирование генетических редакторов PE2 и трансфекторов Cas9

Для редактирования генома был амплифицирован фрагмент плазмиды pX458 (Addgene #48138) [547], кодирующий константную часть egРНК, дополнив ее промотором T7 и направляющими последовательностями (табл. Последовательностей праймеров). Матрицы оцДНК длиной 200п.н. были синтезированы IDT Inc. (Leuven, Бельгия). Матрицы дцДНК и с 5'-выступающими и 3'-выступающими концами получали из синтезированных 200 нуклеотидных олигонуклеотидов в конечной концентрации 100нг/мкл путем денатурации в течение 5 минут при 96°C и последующего медленного охлаждения до комнатной температуры с целью гибридизации. Во всех растворах для микроинъекций использовали буфер 10 mM TrisCl pH 8, 0,1 mM ЭДТА. Для синтеза регРНК [253] использовали ПЦР-продукт амплификации плазмиды pX458 с праймерами, содержащими промоторную и направляющую последовательности T7, а



также часть матрицы обратной транскрипции (рис.Схема eгРНК или регРНК). Ампликон использовали для транскрипции *in vitro* с помощью набора MEGAscript (Thermo Fisher Scientific, США). eгРНК, очищенную с помощью набора QIAGEN (Venlo, Нидерланды) RNeasy MinElute CleanUp, смешивали с мРНК, кодирующей *S.pyogenes Cas9* (Thermo Fisher Scientific, США), до конечной концентрации 10 нг/мкл eгРНК, 25 нг/мкл Cas9 мРНК и 20 нг/мкл ДНК-матрицы, используемые для микроинъекции мышинных зигот.

Для получения мРНК, кодирующих PE2 и Cas9·mSA, в качестве матриц использовали плазмиды pCMV-PE2 (Addgene #132775) [253] и PCS2+Cas9·mSA (Addgene #103882) [548] для амплификации участков, соответствующих мРНК, с добавлением последовательности промотора T7 к 5'-концу и последовательности A50 к 3'-концу. Набор mMESSAGING mMACHINE (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для получения мРНК путем транскрипции *in vitro*. Белок Cas9 (Thermo Fisher Scientific, США) инъецировали в конечной концентрации 50нг/мкл, а мРНК, кодирующие PE2 и Cas9·mSA в концентрациях 25нг/мкл, аналогично с мРНК Cas9.

После микроинъекций (в цитоплазму для PE2-редактирования; в пронуклеус для HR) зиготы инкубировали в среде Sequential Fert (CooperSurgical Inc., США, №83010010) с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 2,5 дней. эмбрионы, состоящие из четырех-восьми клеток, переносили в среду для дальнейшего развития до бластоцист (CooperSurgical, Inc., США, №83050010). После инкубации в течение 1–2 дней отбирали эмбрионы, успешно развившихся до стадии бластоцисты и растворяли в 5мкл раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, США) в соответствии с рекомендациями производителя и использовали для амплификации с соответствующими наборами праймеров (табл.Последовательностей праймеров):

- в серии экспериментов сравнения эффективности технологии праймированного редактирования с гомологичной рекомбинацией использовали баркодированные праймеры: POS1 HR (1\_CHK\_F1, 1\_CHK\_R), POS1 PE2 (1\_CHK\_F2, 1\_CHK\_R), POS2 HR (2\_CHK\_F1, 2\_CHK\_R), POS2 PE2 (2\_CHK\_F2, 2\_CHK\_R), POS3 HR (3\_CHK\_F, 3\_CHK\_R1), POS3 PE2 (3\_CHK\_F, 3\_CHK\_R2), POS4 HR (4\_CHK\_F1, 4\_CHK\_R), POS4 PE2 (4\_CHK\_F2, 4\_CHK\_R), POS5 HR (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R2), POS5 PE2 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R 1).
- для анализа эффективности редактирования в положении 5 с различными HR-матрицами использовали баркодированные праймеры: POS5 PE2 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R1), POS5 ssDNA (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R2), POS5 dsDNA (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R3), POS5 5'-выступ (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R4); 3'-выступ POS5 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R5), оцДНК POS5 и белок Cas9 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R6), bio-оцДНК POS5 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R7), POS5 PE2 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R5), оцДНК POS5 (5\_CHK\_Ф, 5\_ЧК\_R2), дцДНК POS5 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R1), 5'-выступ POS5 (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R4); POS5 3'-выступ (5\_CHK\_F, 5\_CHK\_R3).

Ампликоны объединяли и подвергали NGS. Вкратце, 100нг смешанных продуктов ПЦР использовали в качестве матрицы ДНК для создания библиотеки с NEBNext.<sup>®</sup> Ultra™ II DNA Library Prep Kit для Illumina<sup>®</sup> (NEB, США) в соответствии с инструкцией. Библиотека была секвенирована с не менее чем 200 тысячами односторонних прочтений для каждого продукта ПЦР.

Результаты сравнивали с последовательностью ампликона и классифицировали как дикий тип (WT), целевой мутант, запрограммированный матрицей (MUT), и различные вставки и делеции (InDel). Предполагалась одинаковая эффективность амплификации для всех аллельных вариантов и, таким образом, рассчитывали относительную эффективность редактирования как долю соответствующих мутаций, содержащих считанные последовательности, среди общего числа считываемых фрагментов. Предполагалось, что считывания, содержащие замены оснований, отличные от запрограммированных, но не вставки, являются результатом ошибок ПЦР или секвенирования. Потенциальные ошибки обратной транскриптазы PE2 были неотличимы от ошибок ПЦР и ошибок секвенирования и, таким образом, не рассматривались отдельно. Крупные перестройки ДНК и умножение матрицы не могли быть обнаружены с помощью NGS ампликонов и, следовательно, не могли быть оценены.

### Создание и идентификация $\Delta Mtlm$ мышей

Эксперименты по анализу фенотипа мутантных мышей были проведены на линии  $\Delta Mtlm$ , несущих делецию из 82 нуклеотидов, охватывающую промоторную область гена *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок Mtlm.

- мыши  $\Delta Mtlm$ : ген *1500011k16Rik* отмечен желтым цветом, серым цветом показаны делеции нуклеотидов, жирным шрифтом с подчеркиванием – старт-кодон, красным цветом – стоп-кодон:

```

CCTTTCCTCGCGCAGACTCAGAGCGGGCCTCAAGCGAGCGCTGTGGCATCTGATCCTTGCG
SSAATCCGTAGCTCACTCTACTTTGTGCTGAGTGGTTGCAATGGCGGACGTGTCTGAGAGG
ACGCTGCAGGTGTCCGTGCTAGTGGCTTTCGCCTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGCAAGCG
AATCGGCTGCGGAGGCGTTACCTAGACTGGAGGAAGCGGAGGCTGCAGGACAAGCTGGC
AACGACTCAGAAAAAGCTGGACCTGGCCTGAAGCACGCG

```

В качестве контроля были задействованы мыши дикого типа (WT). Основатели WT линии мышей были получены при скрещивании гетерозиготных носителей инактивирующих аллелей ( $Mtlm^{+/-}$ ).

- мышь WT: ген *1500011k16Rik* отмечен желтым цветом, жирным шрифтом с подчеркиванием — старт-кодон, красным цветом — стоп-кодон:

GGTTGCA**ATG**GCGGACGTGTCTGAGAGGACGCTGCAGGTGTCCGTGCTAGTGGCTTTTCGC  
 CTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGCAAGCGAATCGGCTGCGGAGGCGTTACCTAGACTGGAG  
 GAAGCGGAGGCTGCAGGACAAGCTGGCAACGACTCAGAAAAAGCTGGACCTGGCC**TGAG**  
 CACGCGC

Инактивацию гена *1500011k16Rik* осуществлялась с применением технологии CRISPR/Cas9. Гидовые РНК разработаны с использованием сервера Feng Zhang lab's (<http://crispr.mit.edu/>). Соответствующие еРНК были получены путем транскрипции T7 *in vitro* (MEGAscript™ T7 Transcription Kit, Thermofisher) из ПЦР-амплифицированных матриц, полученных путем ПЦР-амплификации плазмиды рХ458 [547] с прямым праймером TGTAATACGACTCACTATAGG**GTGCTGAGTGGTTGCAATGG**GTTTTAGAGCTAGAAATAG CAAG (комплементарная к мишени часть выделена и подчеркнута) и обратным праймером AAAAGCACCGACTCGGTGCC. Полученные таким образом еРНК смешивали с GeneArt™ CRISPR Nuclease мРНК (Thermofisher) и разводили в отфильтрованном буфере для микроинъекций (10мМ Tris, 0,1мМ EDTA, pH 8) до конечных концентраций 25нг/мкл еРНК и 50нг/мкл мРНК Cas9.

Для получения оплодотворенных яйцеклеток для микроинъекций генетической конструкцией у самок мышей F1 C57Bl/6хСВА вызывали суперовуляцию путем внутривагинального введения гормонов: 40 мкл антисыворотки ингибина с гонадотропином сыворотки жеребых кобыл (препарат CARD HyperOva®, Cosmobio LTD, Япония, патент № 5927588) с последующей инъекцией 200 мкл (8ЕМ) хорионического гонадотропина человека через 48ч (ХГЧ, препарат Хорулон®, MSD Animal Health, корпорация Merck, Нидерланды). После введения ХГЧ самок мышей ссаживали с самцами соответствующей линии [287]. Успешность оплодотворения определяли на следующее утро по наличию вагинальных пробок [549]. Перед извлечением яичника и яйцевода самок эвтаназируют путем цервикальной эвтаназии. Извлечение яичника и яйцевода с последующим выделением зигот производили согласно протоколу Cho от 2009 года [550].

Микроинъекцию генетической конструкции в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки осуществляли в среде для промывки ооцитов, с феноловым красным, pH=7,4, без гепарина (CooperSurgical, Inc., США), окруженной вазелиновым маслом (АО "Татхимфармпрепараты", г.Казань, Россия), на инвертированном микроскопе (ECLIPSE Ti, Nikon, Япония), с помощью двух микроманипуляторов (TransferMan 4R, Eppendorf, Германия), согласно протоколу Cho от 2009 года [550].

Зиготы после микроинъекции инкубировали с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в среде Сиквеншиал Ферт с феноловым красным (CooperSurgical, Inc., США).

Для успешной имплантации эмбрионов у самок-реципиентов перед операцией вызывали состояние псевдобеременности – самок ссаживали с вазэктомированными самцами и в день операции проверяли наличие вагинальной пробки, что является показателем псевдобеременности [549]. Операцию по подсадке эмбрионов в воронку яйцевода проводили под общим наркозом, согласно протоколу Cho от 2009 года [550].

После рождения и завершения периода лактации, мышей F<sub>0</sub>, распределив по половой принадлежности, отсаживали от суррогатных матерей. Параллельно проводили нанесение идентификационных меток путем перфорации ушных раковин и отбор биологического материала, путем отсечения кончика хвоста, для генетической идентификации, согласно руководству FELASA по генотипированию трансгенных грызунов [551]. Образцы растворяли в 5мкл раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen, Миддлтон, Висконсин, США) в соответствии с рекомендациями производителя и использовали для амплификации с соответствующими набор праймеров, содержащих штрих-коды. Генотипирование осуществляли путем амплификации геномной ДНК с использованием праймеров GAGTCAGGGAACCTCTGCTTCCTTT и CTCAGGCCAGGTCCAGCTTTTTC с последующим секвенированием по Сэнгеру (Центр коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии им. Энгельгарда, Москва, Россия). Иммунодетекцию пептида Mtl<sub>n</sub> проводили с использованием изготовленных на заказ антител к пептиду CRRLQDKLATTTQKKLDLE производства Eurogentec S.A.

Полученных Mtl<sub>n</sub>+/- мышей, во избежание потенциального влияния маловероятных вторичных мутаций, скрещивали с инбредными мышами линии C57BL/6J. Далее из пометов были отобраны разнополые гомозиготные особи, а также дикого типа, в качестве пар основателей мышинных линий ΔMtl<sub>n</sub> и WT соответственно.

### **Мониторинг набора веса**

Мыши обеих экспериментальных групп (ΔMtl<sub>n</sub> и WT) были разделены на группы в зависимости от диеты:

- стандартная – комбикорм с содержанием жира 3,3% (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Германия).
- высокожировая – комбикорм с содержанием жира 30%(Ssniff Spezialdiäten GmbH, Германия).

Мыши вне зависимости от типа диеты и генотипа получали питание без ограничений. Потребление воды и пищи, а также массу тела измеряли один раз в неделю в одно и то же время в течение 19 недель.

## Оценка скорости клубочковой фильтрации

Прижизненное исследование функциональной активности почек проводили с помощью миниатюрного флуоресцентного детектора (MediBeacon, Мангейм, Германия), прикрепляемого непосредственно к очищенной от шерсти коже на спине животного. Датчик фиксировал относительную интенсивность флуоресценции синистрина, конъюгированного с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC). В отличие от стандартного протокола [552], в данном исследовании животные в эксперименте находились под общим инъекционным наркозом (комбинация золетила и ксилазина). Инъекцию 40мг/мл FITC-синистрина (в PBS) в дозе 0,15 мг/г проводили в ретроорбитальный синус. Полученные данные были считаны с трансдермального датчика в программе MB Lab ver.2.26 (MediBeacon, Германия). Согласно стандартному протоколу, сравнивали время полувыведения FITC-синистрина по относительной интенсивности флуоресценции.

## Тест силомер

Тест предназначен для оценки максимальной произвольной силы (силы захвата) и является распространенным методом определения силы конечностей у мышей и определения неврологического дефицита [553]. Эксперимент проводили после 24-часовой пищевой депривации. Мышь осторожно тянули за хвост назад от головы, обеспечивая захват за перекладину передними лапами, туловище при этом оставалось в горизонтальном положении. Фиксировали максимальное значение силы захвата мышцы, отображаемое на экране детектора. Эту процедуру повторяли с интервалом 20 секунд до получения 10 результатов. После выбора пяти максимальных полученных значений рассчитывалось нормированное по весу среднее значение.

## Магнитно-резонансная томография (МРТ)

Оценка жировых отложений у мышей осуществлялась *in vivo* на МРТ-сканере 7 T Bruker (BioSpec 70/30, США). В качестве приемопередатчика использовалась Bruker birdcage (T10334) с внутренним диаметром 72 мм. Радиочастотное поле B1, создаваемое катушкой, однородно во всех направлениях сканирования: слева направо, от головы к ногам, спереди назад. Следовательно, применяемые радиочастотные (РЧ) импульсы воздействуют на спины с одинаковой мощностью, независимо от выбора среза, что обеспечивает корректную работу метода частотно-селективного спинового возбуждения, который обычно используется для определения жира в организме на МРТ [554].

Для анализа были получены два набора МР-изображений. Для получения первого набора МР-изображений перед подачей основного возбуждающего РЧ-импульса проводят селективное возбуждение исключительно жировой ткани с помощью  $^1\text{H}$  ядер. Спины жировой ткани

насыщаются и не влияют в регистрируемый МР-сигнал. Используя этот метод, мы получили первый набор МР-изображений – корональные T1-взвешенные МР-изображения всего тела мышей. В качестве последовательности импульсов применялось спиновое эхо (СЭ) со следующими параметрами сканирования: поле зрения:  $12 \times 4,8$  см<sup>2</sup>, матрица:  $200 \times 160$ , разрешение в плоскости:  $0,6 \times 0,3$  мм<sup>2</sup>, количество срезов: 24, толщина среза: 1,2 мм, TR = 560 мс, TE = 10,6 мс, количество усреднений: 2, общее время сканирования: 5 минут и 58 секунд. Второй набор МР-изображений был получен сразу после регистрации первого набора. Это были корональные T1-взвешенные МРТ-изображения всего тела мышей, полученные с использованием одной и той же импульсной последовательности SE с теми же параметрами сканирования и геометрией, но без подавления жира. Путем попиксельного вычитания первого набора МР-изображений (с подавлением жира) из второго набора МР-изображений (без подавления жира) были рассчитаны дифференциальные МР-изображения. Это было сделано с помощью программы ImageJ v.1.51j [555]. По факту эти изображения представляют весь жир тела мышей.

Обработка изображений состояла из подсчета объема жира в организме с помощью программного обеспечения ImageJ и включала следующие этапы. Во-первых, дифференциальные МР-изображения были бинаризованы с использованием автоматического выбора порога, который сохраняет моменты изображений [556]. При этом удалялись пиксели, не связанные с жировыми отложениями (например, вызванные артефактами движения грудной клетки и фоновыми сигналами), которые могли мешать расчету. Затем рассчитывали общую площадь жировых отложений. Умножив площадь на толщину среза, получали объем жира в организме. Для расчета массы телесного жира умножали объем жира на плотность жировой ткани, равную  $\sim 0,9$  г/мл. Процентное содержание жира в организме определяли путем деления массы жира в организме на общую массу тела.

МРТ-сканирование осуществлялось на животных под изофлюрановой анестезией при искусственном поддержании температуры тела животных в диапазоне  $37 \pm 1$  °C.

### **Эвтаназия**

Эвтаназия осуществлялась либо путем цервикальной дислокации, либо передозировкой изофлюрановым наркозом.

### **Критерии для эвтаназии животных по соображениям гуманности**

Установление гуманных конечных точек в моделях трансгенных животных представляет собой особую проблему в связи с непредсказуемым характером и возникновением неблагоприятных событий. Однако объем и глубина мониторинга благосостояния животных, необходимые для точного описания фенотипа, обеспечивают всеобъемлющую основу для

установления гуманных конечных точек с высоким уровнем точности, а также информируют о разработке эффективных стратегий снижения воздействия конкретной генетической модификации.

Было разработано несколько протоколов мониторинга благосостояния трансгенных животных, содержащих множество общих элементов [557; 558; 559].

Дэннис [560] подчеркнул, что мониторинг должен обнаруживать как прогнозируемые, так и непредвиденные признаки болезни, физических дефектов, травм или аномального поведения, отметив важность документирования того, что может показаться незначительными изменениями.

Аналогичным образом, Уэллс [561] предложили оценивать благополучие новых линий трансгенных мышей, сосредоточив внимание на начальном этапе: состояние новорожденных и сразу после отлучения от матерей. У новорожденных предлагаются такие критерии, как цвет кожи, температура поверхности, активность, рефлексы, реакция на прикосновение и наличие молочного пятна. При отлучении мышей оценивают по внешнему виду, состоянию шерсти, осанке, походке, активности, клиническим признакам и относительному размеру, массе тела; кроме того, регистрируют смертность, признаки агрессии и/или стереотипии, а также рекомендуют более детальные поведенческие оценки, если выявлены аномалии. Если у новорожденных не выявляется никаких проблем, то за животными следят во время стандартных рутинных процедур. Если проблемы благополучия животных либо выявляются на начальном этапе, либо возникают впоследствии, животные подвергаются более детальной оценке для выявления особых потребностей и критериев гуманных конечных точек.

Крайне важным при оценке фенотипических изменений у трансгенных животных является сравнение с их диким типом.

Все отклонения от стандартного состояния здоровья и/или поведения фиксируются в карточках на клетке и переносятся в электронные бланки наблюдения за состоянием животных.

### **Измерение электростимулированного сокращения мышц**

Переднюю большеберцовую (*Tibialis Anterior*), камбаловидную (*Soleus*) и икроножную (*Gastrocnemius*) мышцы последовательно выделяли по стандартной методике [562; 563; 564]. Дистальный конец мышцы соединяли лигатурой с механоэлектронным датчиком, проксимальный конец закрепляли зажимом. Блок стимуляции и регистрации мышечных сокращений включал электронный лабораторный стимулятор (ЭСЛ-2, Россия) и пару электродов с креплениями, присоединенными к мышце (прямая стимуляция). Электростимулятор позволял изменять амплитуду раздражителя, его продолжительность и частоту подаваемых возбуждений. Сигнал тензометрического датчика, измеряющего силу

сокращения мышц, усиливался на компьютере, что позволяло регистрировать сокращения мышц и их силу в граммах с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП Е-154, Россия) и программы PowerGraph 3.3 (ДиСофт, Россия). Тензометрический датчик был подобран специально, исходя из необходимости регистрировать силу мышечных сокращений мышцы с точностью до 0,01г. Мышцу стимулировали прямоугольными импульсами (амплитуда 20В, длительность 0,5мс). Выбранная амплитуда импульса в два раза превышала уровень наблюдаемого максимального сокращения, что обеспечивало вовлечение всех мышечно-двигательных единиц. Частота импульсов в сокращении составляла 40 Гц, что соответствует плавному напряженному стимулированному состоянию. Этот режим выбран для оценки анаэробного ресурса мышцы: максимальное количество ионов кальция высвобождается из мышечных волокон саркоплазматического ретикулума при частоте стимула 40 Гц, что приводит к постоянному снижению запасов АТФ и креатинфосфата, накоплению продуктов метаболизма и истощению запасов мышечной энергии, обычно накапливаемой за счет гликолиза. Мышцу взвешивали после записи механограммы для нормирования мышечной силы на вес.

### **Гистологический анализ**

После некропсии исследуемые органы фиксировали в 10% буферном растворе формалина (рН 7,4) в течение 24ч, после отмывали в стандартной воде, сохраняли в 70% спирте, далее обезвоживали 99,7% изопропанолом и заливали парафином. Полученные на микротоме тонкие срезы (3 мкм) депарафинизировали, гидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Патологии диагностировали и классифицировали в соответствии с опубликованными рекомендациями [565; 566].

Для изучения очагов миопатии с помощью криотома получали срезы свежих образцов скелетных мышц. Нефиксированные срезы криотома (5мкм) окрашивали трихромом по Гомори [567] для выявления миофибрилл с признаками митохондриальных аномалий. Срезы окрашивали фильтрованным гематоксилином в течение 5 минут, промывали дистиллированной водой, в течение 15 минут окрашивали фильтрованным трихромным красителем Гомори (зелёный прочный FCF 0,3г; хромотроп 2R 1,2г; фосфорновольфрамовая кислота 0,6г; ледяная уксусная кислота 1мл; дистиллированная вода 100мл, рН 3,4), далее промывали дистиллированной водой и кратковременно ополаскивали в 0,5% уксусной кислоте для дифференциации. Окрашенные срезы обезвоживали 95% этанолом и очищали ксилолом.

В исследовании почек для окрашивания бета-галактозидазоположительных стареющих клеток использовали протокол парафиновых срезов, созданный В.Н. Манских [568]. Образцы почек фиксировали кальциевым раствором Бейкера в течение суток при температуре +4°C (CaCl<sub>2</sub> г; 37% формальдегид 10мл; стандартная вода 90мл) [569], после промывали в



дистиллированной воде в течение 24 часов, обезвоживали ацетоном при +4°C пошагово три раза по 2 часа, очищали 1 час в бензоле и заливали в парафин по методу ферментативной гистохимии [570] Полученные на микротоме тонкие срезы (5мкм) окрашивали в течение 3 часов раствором X-gal (X-gal 20мг; диметилформамид 1мл; 1,65%  $K_3[Fe(CN)_6]$  5мл; 2,11%  $K_4[Fe(CN)_6]$  5мл; 0,1М цитратного буфера, рН6 70мл) при рН6 и температуре 37°C [571], и контрастно окрашивали красным на ядра. Количество стареющих клеток в полном срезе органа подсчитывали вручную и нормализовали на  $1\text{мм}^2$  площади среза с помощью программного обеспечения ImageJ v1.4.3 на микрофотографиях органов.

### **Анализ метаболитов сыворотки крови**

Кровь для биохимического и ЯМР анализа (Ядерный Магнитный Резонанс) отбирали из сердца мышей под изофлурановым наркозом без постанестетического восстановления [6]. После сбора цельной крови в пробирки с активатором свертывания, кровь центрифугировали в течение 20мин при 2000g и 22°C для отделения сыворотки от клеток.

Биохимический анализ концентрации лактата, триглицеридов, глюкозы и холестерина в собранной сыворотке проводили на биохимическом медицинском анализаторе A25 BioSystems (Biosystems SA, Испания). Концентрации этих веществ оценивали спектрофотометрически относительно соответствующих стандартных растворов.

Свободный карнитин и ацилкарнитины в сыворотке крови определяли методом tandemной масс-спектрометрии с разведением стабильных изотопов. Образцы сыворотки крови объемом 5мкл экстрагировали с 90мкл метанольного раствора, содержащего помеченные стабильными изотопами аминокислоты и внутренние стандартные растворы ацилкарнитинов, в течение 60 мин при комнатной температуре и перемешивании. Метанольные элюаты переносили в новые 96-луночные планшеты для дериватизации в бутиловые эфиры. Планшеты, содержащие метанольные элюаты, высушивали с использованием нагретого (40°C) азота в течение 20 минут. Затем в каждую лунку добавляли по 50мкл 3М HCl в бутаноле, накрывали и инкубировали в течение 30 минут при 65°C. После инкубации планшеты высушивали с использованием потока нагретого (40°C) азота в течение 20 минут, а затем восстанавливали с помощью 100мкл подвижной фазы (ацетонитрил:вода:муравьиная кислота; 80:20:0,1% по объему). С помощью автодозатора были сделаны инъекции по 20мкл на образец в поток подвижной фазы со скоростью 0,08мл/мин. Время анализа составляло по 2,1 мин/введение.

Сывороточный свободный карнитин и ацилкарнитины анализировали с помощью tandemной масс-спектрометрии с проточной инъекцией (Sciex API3200, США). Концентрации СО и отдельных ацилкарнитинов количественно определяли путем мониторинга

множественных реакций. Оценку данных проводили с помощью Analyst® 1.5.2 Instrument Control and Data Processing Software (Sciex). Концентрацию выражали в микромолях на литр.

Метод экстракции Фолча (Folch) использовали для выделения жирных кислот из сыворотки. Все липидные фракции были дериватизированы (метилованы) для ГХ-МС (газохроматография-масс-спектрометрия) раствором трифторида бора в метаноле (10%) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализировали жирные кислоты на ГХ/МС 7890A/5975C (Agilent Technologies, США) с HP-5MS. Скорость потока составляла 1мл/мин, температура печи составляла 40°C в течение 1 мин, с повышением до 280°C при 10°C/мин, затем с выдерживанием в течение 10 мин. Для введения проб, переходной линии и источника ионов температуры составляли 260°C, 260°C, 250°C соответственно. Метилловые эфиры жирных кислот в гексане вводили автоматическим пробоотборником G4567A (Agilent Technologies, США). Жирные кислоты идентифицировали по времени их удерживания и масс-спектру.

Для обработки первичных данных ГХ-МС использовалось программное обеспечение ACD/Labs (версия 12.5) (со скриптом IXCR для ACD/Labs Spectrus). Начальные установки были выполнены с использованием IXCR скрипта, который выделяет чистый масс-спектр для каждого пика на хроматограмме полного ионного тока и выполняет поиск полученного масс-спектра в базе данных NIST MS Search v2.0. В случае очень схожих масс-спектров в установки вносилась ручная коррекция с учетом индексов удерживания Kovats из NIST Chemistry WebBook [572] и рассчитанных значений LogP (ACD/Labs). Площади пиков определяли по хроматограммам ТИС с использованием программного обеспечения ACD/Labs Spectrus.

Для ЯМР-анализа 360мкл сыворотки разделяли на аликвоты и немедленно использовали для экстракции метаболитов 720мкл смеси холодного метанола для ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) и хлороформа в соотношении 1:1. После интенсивного перемешивания и инкубации в течение 10мин при 5°C пробирки центрифугировали в течение 30мин на скорости 14000g при 5°C. Водный (верхний) слой переносили в новую пробирку и высушивали с помощью вакуумного концентратора SpeedVac при комнатной температуре в течение 3ч до полного испарения растворителя. Затем твердые метаболиты растворяли в 550мкл буфера (20мМ фосфата натрия при pH 7,0, 6мкМ d6-DSS, 0,13мг/мл NaN<sub>3</sub>, растворенного в D<sub>2</sub>O) и загружали в стандартную 5мм ЯМР-пробирку).

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 700МГц, оснащенном криозондом HCN Prodigy с градиентом по оси Z 5мм, с использованием автоматического пробоотборника с температурой хранения 5°C. Измерения спектров проводили при 35°C. Одномерные спектры ЯМР 1H были получены от каждого образца с использованием стандартного эксперимента 1D NOESY-presat. Всего было получено 400 сканов. Всю обработку

спектров и идентификацию метаболитов проводили с использованием программы Chenomx NMR Suite.

### **Выделение митохондрий исследуемых тканей**

Выделение митохондрий осуществляли из исследуемых органов, согласно методики, представленной в [573] с модификациями. Ткани органов сначала рассекали охлажденными ножницами на ледяной чашке Петри, промывали ледяной средой выделения митохондрий (250 мМ сахарозы; 0,5мМ EGTA; 20мМ HEPES-NaOH; pH 7,6; 0,1% BSA) от крови, а затем в течение 2 мин при 4°C гомогенизировали в микрогомогенизаторе Поттера в среде выделения в соотношении 5/1 объема к весу фрагмента ткани. Полученный гомогенат в течение 10мин центрифугировали при условиях 1000g и 4°C (центрифуга модели 5410 Eppendorf, Германия). Далее отбирали супернатант и центрифугировали 10мин при 9000g и 4°C. Митохондриальный осадок собирали и суспендировали в том же объеме среды для выделения, но без BSA и центрифугировали в течение 10 мин при 10,500g и 4°C. Полученный осадок суспендировали в минимальном объеме ( $\approx 1$  мкл/мг массы исходной ткани) и стандартной концентрацией 90–100мг/мл, определяемой методом с использованием бицинхониновой кислоты с BSA в качестве стандарта, в соответствии с инструкциями производителя (Pierce, Waltham, MA, USA). Все процедуры проводились при температуре 4°C.

### **Анализ эффективности дыхания митохондрий**

Для оценки эффективности дыхания изолированных митохондрий измеряли скорость потребления кислорода при 25°C с помощью электрода Clark закрытого типа на оксиграфе Hansatech (Narborough, UK) [573]. Выделенные митохондрии (0,05–0,1мг белка) инкубировали в ячейке оксиграфа, содержащей 0,5мл MIR05 среды для дыхания (0,5мМ EGTA; 3мМ MgCl<sub>2</sub>; 60мМ лактобионата калия; 20мМ таурина; 10мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>; 20мМ HEPES; 110мМ сахарозы, 1г/л BSA). Эффективность дыхания оценивали в присутствии 5мМ глутамат/1,25мМ малат; 5мМ пируват/1мМ малат; 5мМ сукцинат/2мМ ротенон; 10μМ пальмитоил-L-карнитин. Затем к субстратам добавляли 1 мкМ олигомицина; 0,1мМ ADP; 0,1мМ АТФ / 2мМ креатина; или 10нМ FCCP.

### **Оценка активности креатинкиназы и анализ олигомеризации митохондриальной креатинкиназы**

Аликвоту гомогената мышечной ткани (надосадочная фаза без ядер после 10мин центрифугирования при 1000g), полученного в ходе выделения митохондрий, а также аликвоту фракции митохондрий использовали для измерения активности креатинкиназы и определения соотношения октамер/димер. Активность креатинкиназы (EC 2.7.3.2) измеряли в соответствии с протоколом Бюхера и соавторов [574]. Ферментативную активность определяли при 340нм на

двохлучевом спектрофотометре Cary Varian 300 с гексокиназой из дрожжей и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой из бактерий *Leuconostoc mesenteroides* (Roche) в качестве сопрягающих ферментов при pH 7,5 и АТФ/фосфо-креатине в качестве субстрата. Для выявления димерных и октамерных митохондриальных изоформ креатинкиназы использовали электрофорез в целлюлозо-полиацетатном геле. Октамер и димер из-за разного заряда разделяли электрофоретически (объемы экстрактов тканей составляли 1-5мкл) на полосках полиацетата целлюлозы при помощи установки "Sepraphore gelman III" (США) в неденатурирующих условиях в 0,06М вероналовом-буфере (pH 8,6), содержащем 1мМ 2-меркаптоэтанола в течение 3 часов при 250В и окрашивали на ферментативную активность *in situ*, как описано Валлиманном и соавторами [575]. Окрашивание для оценки активности креатинкиназы было достигнуто с помощью системы сопрягающих ферментов ферментов и техники наложения геля, как описано в оригинальной работе. Неспецифическое окрашивание за счет миокиназы мышц ингибировалось присутствием 0,3мМ диаденозин пентафосфата. Количественную оценку интенсивности окрашивания проводили с помощью денситометрии в полосках, относящихся к октамеру или димеру, на ChemiDoc (Biorad, США). Калибровку интенсивности полос проводили с использованием димерной креатинкиназы из мышц кролика (Roche).

#### **Анализ липидов**

Содержание кардиолипина в выделенных митохондриях оценивали с использованием набора для анализа кардиолипина (ab241036, Abcam, США) в соответствии с протоколом производителя.

Экстракцию липидов проводили по методу Блая и Дайера в азотном токе бескислородными растворами, барботированными в течение ночи N<sub>2</sub> чистоты 99% [576]. Экстрагированные липиды растворяли в смеси хлороформ/метанол в соотношении 2:1. Тонкослойную хроматографию проводили согласно методике, опубликованной Пино и коллегами [577]. Аналитические органические растворители и хроматографические пластины для ВЭТСХ (высокоэффективная тонкослойная хроматография) (20×10см, силикагель 60 F254 на алюминиевой подложке) были получены от E. Merck (Дармштадт, Германия). Перед нанесением образца или стандарта, пластины для ВЭТСХ готовили путем погружения в 2,3% борную кислоту в этаноле, а затем сушили в течение 2 часов после сушки активировали при 110°C в течение 20 минут.

Образцы наносили с помощью стеклянного капиллярного аппликатора с клапаном (приводимым в действие потоком азота) длиной 10мм на расстоянии 15мм от нижней части пластинки с постоянной скоростью нанесения около 200нл/с при непрерывной сушке потоком азота при давлении 1,4бар. Для стандартов полярных липидов (Avanti Polar Lipids, США)

готовили стоковый раствор (1мг/мл) в виде смеси хлороформ/метанол (в соотношении 2:1). Элюирование проводили в стеклянной камере, уравновешенной парами элюента до достижения фронтом растворителя 1 см до верхнего края пластинки. Элюент состоял из смеси хлороформ/этанол/триэтиламин/вода (в объемном соотношении 3/3,5/3,5/0,7).

После высушивания пластинки под вытяжным шкафом в течение 2 часов в потоке азота проводили окрашивание путем погружения пластинок в раствор 0,5% сульфата меди (масса/объем) в 1,16М ортофосфорной кислоты (2мин), пластины высушивали в вытяжном шкафу в течение 2 часов при комнатной температуре в потоке азота и нагревали на песчаной бане в течение 15 минут при 155°C для карбонизации органического вещества и визуализации полярных липидов.

Пластины фотографировали в режиме отражения при белом свете в программе Biorad ChemiDoc. Изображения анализировали в режиме поглощения. Интенсивность пятен полярных липидов была интегрирована, а поверхности пиков выражены в произвольных единицах с помощью Image J, затем, после калибровки со стандартами кардиолипина и монолизакардиолипина, переведены в нмоль/мг митохондриального белка.

Библиотеки транскриптомов готовили с использованием мРНК, выделенной путем фракционирования полиА, и набора Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Invitrogen, США) из тканей мышей. Качество и концентрации библиотек измеряли с помощью автоматизированной системы электрофореза Agilent 4200 Bioanalyzer™ с наборами High Sensitivity ScreenTape (Agilent, США) и флуориметром Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) соответственно. Библиотеки были обработаны в трех повторностях с использованием набора Ion Total-RNA Seq Kit v2 в соответствии с предоставленным руководством. Загрузку чипа проводили с помощью прибора Ion Chef™ с набором Chef Kit Ion 540™ (Thermo Fisher Scientific, США), а секвенирование проводили на системе Ion GeneStudio™ S5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Качество чтения анализировали с помощью программы FastQC. Риды неудовлетворительного качества и/или длины удалялись с помощью комплекта Trimmomatic-0.36. Риды из полученных файлов выравнивали относительно эталонного генома *Mus musculus* посредством GRCm39-сборки (GCA\_000001635.9) с помощью программы STAR 2.7 [578]. Полученные файлы с выровненными и отсортированными по координатам ридами использовались для получения матрицы счета с помощью пакета HTSeq. Полученную матрицу счета анализировали с помощью веб-приложения Phantasus, интегрированного в среду R. Дифференциально экспрессируемые гены оценивали с помощью пакета Limma. Корректирующие значения p (значение q или FDR, частота ложных открытий) для генов были установлены на уровне менее 0,05 для обнаружения дифференциально выраженных генов.

Анализ функционального обогащения был выполнен с помощью GSEA [579] по базе данных h.all.v7.5.

### **Реализация иммуноблотинга**

Иммуноблотинг проводили согласно протоколу, опубликованному нашей лабораторией ранее [568] с использованием специально изготовленных кроличьих анти-Mtn антител против пептида CRRLQDKLATTTQKKLDLE производства Eurogentec S.A., мышинных анти-GAPDH антител (39-8600, клон ZG003, ThermoFisher Scientific), мышинных анти-mtCK антител (ab131188, Abcam), мышинных антицитозольных ЦК антител (ab72004, Abcam), кроличьих анти-VDAC1 антител (ab34726, Abcam) и кроличьих анти-тубулину  $\alpha$  антител (ab18251, Abcam). Для иммуноблотинга образцы тканей лизировали в буфере RIPA (хлорид натрия 150мМ; трис-НСl 50мМ pH8; 0,5% Nonidet P-40, 1% дезоксихолат натрия, 0,5% SDS) с коктейлем ингибиторов протеаз (ThermoFisher Scientific, США). Готовую к переносу PVDF мембрану (Thermo Scientific, США) блокировали в течение 1 часа в TBST (10мМ Tris-НСl pH 7,5, 150мМ NaCl, 0,1% Tween-20), содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Proliant Biologicals, США). Все первичные антитела разводили в соотношении 1:1000 в TBST, содержащем 5% BSA. Использовали следующие первичные антитела: анти-OPA1 (ab42364, Abcam, США), анти-MFN2 (ab56889, Abcam, США), анти-CYB5R3 (sc-398043), анти-VDAC1 (ab15895, Abcam, США).

Вторичные HRP-конъюгированные антимышьи (1721011, Biorad, США) и антикроличьи (1706515, Biorad, США) антитела использовали в разведении 1:3000. GAPDH (ab8245, Abcam, США) использовали в качестве контроля нагрузки.

### **Проведение количественной ПЦР**

Оценку соотношения митохондриальной и ядерной ДНК проводили, согласно протоколу, опубликованному нашей лабораторией ранее [568]. ДНК экстрагировали из 5–15мг мышинной ткани с помощью набора для очистки ДНК GeneJET Genomic (ThermoFisher Scientific, США). Количественную ПЦР-амплификацию генов проводили с использованием мастер-микса SYBR® Green PCR (ThermoFisher Scientific, США) в CFX384 Touch системе ПЦР в реальном времени. Количественную ПЦР проводили с использованием наборов праймеров: mt-Nd1 5'-TCCCCTACCAATACCACACC-3', 5'-CGGCTCGTAAAGCTCCGAAT-3' и Ndufv1 5'-GATGTGTTTGTGGTGCGTGG-3', 5'-GAATTGCGTTCTCGGCCAAA-3'. Количество митохондриальной ДНК рассчитывали методом 2- $\Delta\Delta$ CT и нормализовали к ядерной ДНК.

### **Анализ данных**

Для анализа данных задействовали программное обеспечение Excel (Microsoft, США), STATISTICA (StatSoft Inc., США) и Prism (GraphPad, США).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ

#### §1. Исследование новых подходов усовершенствования технологии создания мышей с измененным геномом

*При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [268; 287], в которых, основополагающий вклад принадлежит соискателю.*

Технология получения мышей с измененным геномом создана в 1980-х годах [580; 581; 582] и направлена на исследование функций генов, генетических механизмов возникновения заболеваний человека и разработку способов их лечения. Первые протоколы процедуры получения мышей с измененным геномом опубликованы более 30 лет назад. В настоящее время эта технология продолжает совершенствоваться и основные усилия ученых сконцентрированы на создании новых молекулярных инструментов редактирования генома. При этом, для создания новых линий мышей с измененным геномом важны и технические аспекты получения мутантных мышей. В связи с данной мультиэтапностью процесса создания мутантных мышей в исследовании были поставлены две задачи, направленные на оптимизацию как процесса создания генетической конструкции, так и технологии манипуляций с объектами, подвергающимися генетическим изменениям:

1. Провести сравнительный анализ эффективности гомологичной рекомбинации, направляемой различными ДНК-матрицами с технологией праймированного редактирования второго поколения на модели микроинъекции зигот мышей.
2. Подобрать оптимальные условия для получения максимально возможного количества зигот мышей для микроинъекций и последующей эффективной подсадки эмбрионов с целью рождения максимально возможного числа жизнеспособных особей.

#### **Сравнительный анализ эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей**

Для сравнения эффективности технологии праймированного редактирования второго поколения (PE2) с эффективностью гомологичной рекомбинации (HR), определяемой одноцепочечным ДНК-олигонуклеотидом (оцОНК), была поставлена задача произвести замены оснований в зонах генома chr3:89314728G/A (1), chr3 :89310707T/A (2), chr2:140025881T/C (3), chr2:140044791-3GGT/TAA (4), chr5:66441024-6TGT/GCC (5) в мышинных зиготах (*Рисунок 12*). В данном исследовании для генетических координат использовалась современная референсная сборка генома GRCh38 от 2020 года. Мутации, соответствующие зонам 1 и 2, локализованы в гене *FLAD1*, кодирующем флавинадениндуклеотидсинтазу, мутации которой обнаружены у

людей с миопатией накопления липидов [583]. Мутации, введенные в зоны 3 и 4, соответствуют мутациям гена *NDUFAF5*, обнаруженным у пациентов с дефицитом митохондриального комплекса I [584]. Наконец, зона 5 локализована в гене *NSUN7*, мутантные формы которого встречаются у мужчин, страдающих бесплодием [585].

Для каждой зоны редактирования был создан набор матриц егРНК и оцОНК длиной 200 нуклеотидов для HR, нацеленного на запланированную зону мутации (*Рисунок 12.А,В,Д,Е,З; Таблица 6.*) и *pegRNA* для варианта редактора PE2, согласно схеме Анзалоне и соавторов [253] для введения целевой мутаций (*Рисунок 12.Б,Г,Е,Ж,И; Таблица 6.*). Последовательности егРНК и *pegРНК* были сконструированы таким образом, чтобы минимизировать расстояние между местами разрывов и предполагаемыми участками мутации при этом избежать повторного расщепления ДНК после успешного мутагенеза. Поскольку в выборе егРНК существовало ограничение по расположению целевой мутации, не было возможности выбрать егРНК с высокими показателями эффективности и избирательности, использовали одни и те же последовательности для егРНК- и *pegРНК*- направленного расщепления там, где это было возможно. В частности, места расщепления и редактирования для зон 1 и 2 были разработаны таким образом, чтобы успешное редактирование приводило к замене одного основания в положении 3 и 2 относительно РАМ (мотив, примыкающий к протоспейсеру). Редактирование зоны 3 приводило к замене в положении 1 относительно РАМ. Поскольку этот участок наиболее чувствителен к комплементарности между егРНК и ДНК, ожидалось, что введение смоделированных мутаций предотвратит повторный разрыв геномной ДНК даже в случае положения 3, где мутация создает новую смещенную последовательность РАМ на один нуклеотид в область комплементарности егРНК/*pegРНК*. Зона редактирования 4 расположена непосредственно внутри РАМ, и, таким образом, успешное редактирование предотвратит повторное расщепление генома. Редактирование зоны 5 включает замену 3п.н. в положениях от 4 до 6, относительно РАМ, при HR редактировании, однако, та же зона разрыва не подходит для направленного редактирования PE2, поскольку зона редактирования должна быть расположена ниже относительно места расщепления, генерируемого PE2. Чтобы преодолеть эту проблему, была задействована другая зона расщепления и матрица егРНК, чтобы ввести дополнительную замену в зону РАМ.



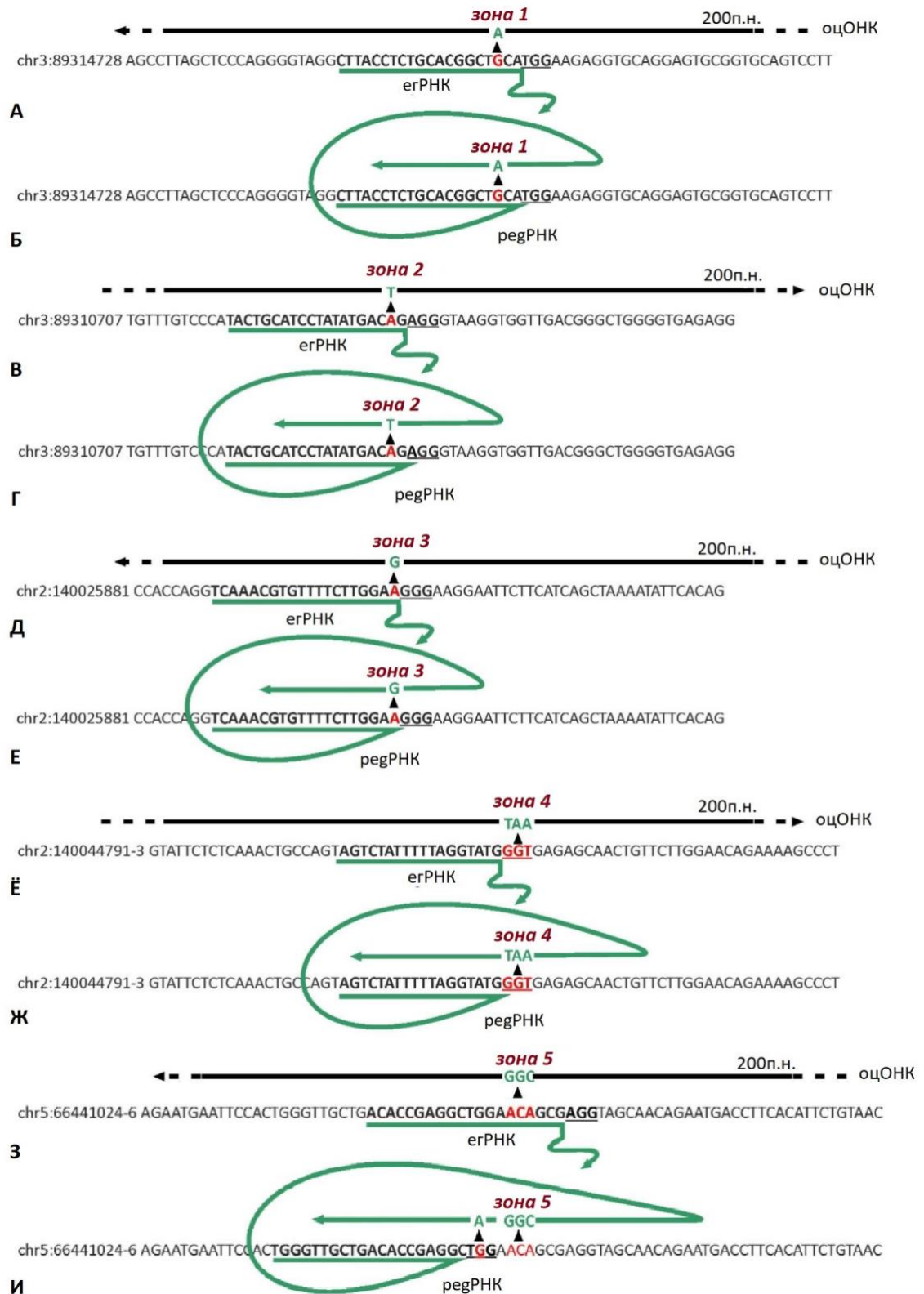


Рисунок 12. Схема erPHK или pegPHK (зеленые стрелки) для целевого (буквенный символ) расщепления и обратной транскрипции, а также матрицы ДНК (черные линии) для HR. Сайты PAM подчеркнуты. Нуклеотиды (буквенные обозначения красного и зеленого ирифта) обозначают соответственно дикий тип и отредактированные последовательности.

- пункты А, В, Д, Ё, З: схемы редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием erPHK и HR, определяемой оцОНК.
- пункты Б, Г, Е, Ж, И: схемы редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием pegPHK и обратной транскрипции.

Таблица 6. Последовательности праймеров.

CasSA_F	TGTAATACGACTCACTATAGGGAATACAAGCTACTTGTCTTTTTGCA
CasSA_R	TTGCGAATTAATAAACCTCCCACACC
T7 (PE_F)	TGTAATACGACTCACTATAG
PE_R	TTGCGATGCAATTTTCTCATTTTATTAGGAAAGG
sgRNA rev	AAAAGCACCGACTCGGTGCC
1_HR	AGACCATCGAGACTGCCCTGGCTCAGTACCATCTCTCCAGCTCTCGTGGGCTTCAATGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACCT CTTCCATGTAGCCGTGCAGAGGTAAGCCTACCCTGGGAGCTAAGGCCTCAGAAAGACCCACCTGAAACCTCTCCAGCTCCCCACCCAGA AAGCACAGCGTCAGCGTG
1_PEF	TGTAATACGACTCACTATAGGCTTACCTCTGCACGGCTGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
1_PER	AAAACCTCTGCACGGCTACATGGAAGAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC
1_CHK_F1	AGTCTCTGCGTGGGCTTCAATGG
1_CHK_F2	CTGCTCTGCGTGGGCTTCAATGG
1_CHK_R	GCTGATCACCTAGCTACCTTC
2_HR	TGTGGCTGAGGACAGGCTAGTGACTGATTGTCAATTTCCAGGACTGGACCTACAGAAACATCTGGGAGTTTCTGCGGCAGCTGTTGTCC CATACTGCATCCTATATGACTGAGGGTAAGGTGTTGACGGGCTGGGGTGAGAGGATGCTGGGAAAGAGAGCCACCCATCACCCACAT CACCCACATGCTCCTGTCTC
2_PEF	TGTAATACGACTCACTATAGGACTGCATCCTATATGACAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
2_PER	AAAACATCCTATATGACTGAGGGTAAGGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC
2_CHK_F1	AGTATCTGGGAGTTTCTGCGGC
2_CHK_F2	CTGATCTGGGAGTTTCTGCGGC
2_CHK_R	AGGGATGTGTACCTGGAGTGTT
3_HR	TTAAAAATATTGAACTTTATTTTTTACCATTAGAAAAATCTTTAGAAACAGATATTCCTACTGTGAATATTTAGCTGATGAAGAATTCCT TCCCTCCAAGAAAACACGTTTGACCTGGTGGTTAGCAGCTTAAGGTTAGTAATCCATTTGACTTTTTAAAAAATATGTTACAGAGGCTAGT GAGATACTCTGACT
3_PEF	TGTAATACGACTCACTATAGGTCAAACGTGTTTTCTTGGAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
3_PER	AAAACGTGTTTTCTTGGAGGGGAAGGGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC
3_CHK_F	AGCATTAGGAGTGTCAACAATGA
3_CHK_R1	AGTGCTGCTAACCACCAGGTCAA
3_CHK_R2	CTGGCTGCTAACCACCAGGTCAA
4_HR	TGGATCATGACTTGATACTGAGCTGGGGGATTTGACAGCTTGATACTGAGCTGGGGGATTTGACAGTATTCTCTCAAAGTCCAGTAGTC TATTTTTAGGTATGTAAGAGAGCAACTGTTCTTGGAAACAGAAAAGCCCTGCTGCACCGAGACACAATGCTGGCAGCTGCAGCGTTTACA GAGGTGAGCCGCCACTCC
4_PEF	TGTAATACGACTCACTATAGGAGTAGTCTATTTTTAGGTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
4_PER	AAAAGTCTATTTTTAGGTATGTAAGAGAGCAACTGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC
4_CHK_F1	AGTATTTGCAGTATTCTCTCAAAGTCC
4_CHK_F2	CTGATTTGCAGTATTCTCTCAAAGTCC
4_CHK_R	CCATCTGTGATTGCAGGTAGAA
5_HR	GTTTTTCTTCTCAGATATTGAAATACTTACGAAACATTTCTAGCATTGAATCCAAAGATCACCGTTACAGAATGTGAAGGTCATTCTGT TGCTACCTCGGCCTCCAGCCTCGGTGTGAGCAACCCAGTGAATTCATTCTAAATGAACACGAAGGACTTGTGTTTATTCTAAATTAAT GAAATTCATTGA
5_HR_DS	TAATCAATGAATTTCAATATTTAGAAATCAAAACAAGTACCTTCGTGTTTATTTAGAATGAATCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGG AGGCGCAGGTAGCAACAGAATGACCTTACATTTCTGTAACCGGTGATCTTTGGATTCAATGCTAAGAAATGTTTCTGTAAGTATTTCAAT ATCTGAGAAGAAAAAAC
5_HR_5	ATTGTTTAAATTTGAAATCAATGAGTTTCATGATTAACCTCACGAGTAATTAATCAATGAATTTCAATATTTAGAAATCAAAACAAGTACCT TCGTGTTTATTTAGAATGAATCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAGGCGCAGGTAGCAACAGAATGACCTTACATTTCTGTAAC GGTGATCTTTGGATTCT
5_HR_3	CATTTAGAATGAATTCCTACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAGGCGCAGGTAGCAACAGAATGACCTTACATTTCTGTAACCGGTGAT CTTTGGATTCAATGCTAAGAAATGTTTCTGTAAGTATTTCAATATCTGAGAAGAAAAACAGCAAGCAAAACAAAAGAAAACACTCGT GTTAAATATGAAAAATCTG
5_HR_bio	Biotin- GTTTTTCTTCTCAGATATTGAAATACTTACGAAACATTTCTAGCATTGAATCCAAAGATCACCGTTACAGAATGTGAAGGTC ATTCTGTTGCTACCTCGGCCTCCAGCCTCGGTGTGAGCAACCCAGTGAATTCATTCTAAATGAACACGAAGGACTTGTGTTTATTCTA AATTAATGAAATTCATTGA
5_PEF	TGTAATACGACTCACTATAGGTGGGTTGCTGACACCGAGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
5_PER	C AAAATTGCTGACACCGAGGCTAGAGGCGCAGGTAGCAACAGAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTT
5_SGF	TGTAATACGACTCACTATAGGACACCGAGGCTGGAACAGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
5_CHK_F	GTCAGAGCTGCAGTCACAT
5_CHK_R1	AGTAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R2	CTGAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R3	TACAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R4	GCAAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R5	ACGAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R6	CATAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R7	TGAAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC
5_CHK_R8	GTCAGAATGAATTCCTACTGGGTTGC

В общей сложности 1237 зигот были микроинъецированы оцОНК, мРНК Cas9 и егРНК (191 развилась до стадии бластоцисты и 113 до стадии морулы), а 828 зигот были микроинъецированы мРНК PE2 и регРНК (155 развились до стадии бластоцисты и 33 до стадии морулы). В среднем, показатели выживаемости зигот и успешного развития до стадий морул и бластоцист после микроинъекций (*Таблица 7*) были сопоставимы для редактирования генома посредством HR и PE2, однако в случае PE2 наблюдаемая выживаемость была несколько ниже (*Рисунок 13.*). В некоторых случаях, например, при редактировании зоны 3 и, в меньшей степени, зон 2 и 5, выживаемость была заметно ниже для обоих редакторов генома, что можно объяснить фенотипическим последствием целевого или гипотетически нецелевого редактирования. В других благоприятных случаях частота успешного развития после микроинъекции была сравнима с таковой для интактных зигот, которые не подвергались инъекции (около 70%).

Группы бластоцист (*Таблица 7*) использовались для выделения ДНК, амплификации области ДНК-мишени и секвенирования Illumina [586]. Полученные данные были сопоставлены с целевыми участками генома и классифицированы по найденным мутациям (*Таблица 8; Рисунок 13.*). Исходя из полученного результата, эффективность технологии праймированного редактирования, по крайней мере в этом эксперименте низка, что подтверждает результаты, полученные некоторыми другими группами [269]. Хотя наблюдалась очень высокая вариабельность эффективности редактирования в зависимости от конкретного участка генома, как для редактирования с помощью PE2, так и для направленного оцОНК, во всех случаях эффективность PE2 была ниже, чем при оцОНК-направленном редактировании. Обе методики редактирования генома генерировали InDel чаще, чем целевые сайтспецифичные мутации. Анализ конкретных частот мутаций (*Таблица 8; Рисунок 13*) продемонстрировал, что предпочтительные наборы InDel являются общими для определенных зон разрывов и не зависят от используемой системы расщепления, т.е. Cas9/егРНК (*Рисунок 13.А,В,Д,Е,З*) или PE2/регРНК (*Рисунок 13.Б,Г,Е,Ж,И*). Считается, что основным преимуществом технологии PE2 является повышенная точность редактирования генома, т.е. более высокое соотношение целевой мутации по сравнению с InDel и в текущем анализе действительно наблюдался ряд зон редактирования, где это имело место. Например, применение PE2 в зоне 3 приводит к соотношению целевой мутации и нецелевых InDel 38:1 (*Рисунок 13.Е*), в то время как HR дает 1,9:1 (*Рисунок 13.Д*) соответственно. Однако в некоторых случаях, таких как зоны 1, 2 и 5, точность редактирования сравнима для HR и PE2, при этом HR немного точнее (*Рисунок 13.А,В,Е,З* – для HR; *Рисунок 13.Б,Г,Ж,И* – для PE2).

Таблица 7. Экспериментальные группы и выживаемость эмбрионов после микроинъекции генетической конструкцией.

Воздействие	исходное количество зигот	количество (%) эмбрионов, развившихся до бластоцист	количество (%) эмбрионов, развившихся до морул	количество (%) невыживших эмбрионов	неанализированные эмбрионы - *
зона 1 HR	58	27 (47%)	4 (7%)	27 (47%)	
зона 1 PE2	69	30 (43%)	0 (0%)	39 (57%)	
зона 2 HR	182	14 (77%)	9 (5%)	159 (87%)	
зона 2 PE2	62	18 (29%)	9 (15%)	35 (56%)	
	64	0 (0%)	0 (0%)	64 (100%)	*
зона 3 HR	153	26 (17%)	0 (0%)	127 (83%)	
зона 3 PE2	132	12 (9%)	4 (3%)	116 (88%)	
зона 4 HR	34	21 (62%)	6 (18%)	7 (20%)	
зона 4 PE2	64	20 (31%)	0 (0%)	44 (69%)	
зона 5 оцДНК	48	4 (8%)	13 (27%)	31 (65%)	
	49	5 (10%)	4 (8%)	40 (82%)	
	286	17 (6%)	28 (10%)	241 (84%)	
	57	11 (19%)	6 (11%)	40 (70%)	
	81	28 (35%)	17 (21%)	36 (44%)	
	134	0 (0%)	0 (0%)	134 (100%)	*
	115	25 (22%)	15 (13%)	75 (65%)	*
40	13 (33%)	11 (28%)	16 (40%)	*	
зона 5 дцДНК	55	8 (15%)	12 (22%)	35 (64%)	
	266	0 (0%)	0 (0%)	266 (100%)	*
	88	21 (24%)	4 (5%)	63 (72%)	
	64	12 (19%)	20 (31%)	32 (50%)	
зона 5 5'-липкий конец	112	0 (0%)	0 (0%)	112 (100%)	*
	92	0 (0%)	8 (9%)	84 (91%)	*
	29	0 (0%)	0 (0%)	29 (100%)	*
	104	21 (20%)	2 (2%)	81 (78%)	
	135	0 (0%)	0 (0%)	135 (100%)	*
	135	0 (0%)	0 (0%)	135 (100%)	*
	97	4 (4%)	34 (35%)	59 (61%)	
зона 5 3'-липкий конец	48	10 (21%)	5 (10%)	33 (69%)	
	38	5 (13%)	2 (5%)	31 (82%)	
	142	0 (0%)	0 (0%)	142 (100%)	*
	34	9 (26%)	0 (0%)	25 (74%)	
	63	32 (51%)	0 (0%)	31 (49%)	*
зона 5 5' bio-оцДНК	63	16 (25%)	11 (17%)	26 (41%)	
зона 5 HR Cas белок	138				
		17 (12%)	4 (3%)	117 (85%)	
зона 5 PE2	83	6 (7%)	13 (16%)	64 (77%)	
	58	17 (29%)	3 (5%)	38 (66%)	
	97	48 (49%)	0 (0%)	49 (51%)	
	123	0 (0%)	0 (0%)	123 (100%)	*
	76	4 (5%)	4 (5%)	68 (89%)	*
Интактные эмбрионы, не подверженные микроинъекции	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	10	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	
	10	6 (60%)	1 (10%)	3 (30%)	
	10	4 (40%)	0 (0%)	6 (60%)	
	10	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	10	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	
	10	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	
	10	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	
	14	6 (43%)	0 (0%)	8 (57%)	
	10	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)	
	10	2 (20%)	3 (30%)	5 (50%)	
	10	2 (20%)	3 (30%)	5 (50%)	
	10	3 (30%)	6 (60%)	1 (10%)	
	10	4 (40%)	2 (20%)	4 (40%)	
	10	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	
	10	0 (0%)	2 (20%)	8 (80%)	
	10	3 (30%)	0 (0%)	7 (70%)	
	10	5 (50%)	0 (0%)	5 (50%)	
	10	5 (50%)	0 (0%)	5 (50%)	
	10	5 (50%)	1 (10%)	4 (40%)	
	10	6 (60%)	0 (0%)	4 (40%)	
	10	5 (50%)	0 (0%)	5 (50%)	
	10	4 (40%)	2 (20%)	4 (40%)	
	10	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	
	10	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)	
	10	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	
	10	4 (40%)	2 (20%)	4 (40%)	
	10	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	
	10	7 (70%)	0 (0%)	3 (30%)	
	8	1 (13%)	0 (0%)	9 (113%)	
	10	9 (90%)	0 (0%)	1 (10%)	
	48	24 (50%)	20 (42%)	4 (8%)	
26	12 (46%)	11 (42%)	3 (12%)		

не анализировались \*

Таблица 8. Последовательности и частоты аллельных вариантов в экспериментальных зонах.

Таблица Последовательностей и частот аллельных вариантов в зоне-1

	аллельные варианты	Стратегия редактирования / частота аллельных вариантов	
		HR	PE2
WT	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG CAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,26	0,96
MUT	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG TAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,067	0,002
d1	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG AAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,28	0,006
d3	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG C ····CGTGCAGAGGTAAGC	0,076	0,0015
d8	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG ····GTGCAGAGGTAAGC	0,026	0,0005
d3	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG C CCTGGAGC ····TAAGC	0,019	0,0002
d8	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG ····GTGCAGAGGTAAGC	0,017	1E-04
d1	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG T GCCGTGCAGAGGTAAGC	0,01	0,0002
d2	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG GCAAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,01	0,0002
d4	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG ····GTGCAGAGGTAAGC	0,007	0,00015
d2	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG ····CGTGCAGAGGTAAGC	0,006	0,0002
d66	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG (d66) CAGCTCCCAACCCC	0,009	0,0002
d2	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG GCAAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,006	1E-04
d1	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG TAAGCCGTGCAGAGGTAAGC	0,006	1E-04
d22	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG (d22) CCCCTGGAGCTAA	0,005	0,0001
d9	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG ····GTGCAGAGGTAAGC	0,005	3E-05
d1	CTCTGGGTGGGCTTCAATGGGGGCAAGGACTGCACCGCACTCTGCACTCTCCATG C ·GCCGTGCAGAGGTAAGC	0,005	7E-05

Таблица Последовательностей и частот аллельных вариантов в зоне-2

	аллельные варианты	Стратегия редактирования / частота аллельных вариантов	
		HR	PE2
WT	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC AGAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,68	0,97
MUT	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC TAGAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,1	0,005
d4	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,05	0,0007
d3	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ·GA ·GGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,02	0,0004
d8	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,014	0,00015
d1	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC CACAGAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,013	0,0002
d9	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,005	2,5E-05
d3	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,011	0,0002
d5	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,008	0,0001
d14	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····TATA ·TG AGAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,007	1E-04
d1	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ·GAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,005658	6,24E-05
d12	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····GAGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,005606	7,49E-05
d15	ATCTGGGAGTTTCTGGCGGAGCTGTTTGTCCCATCTGCATCCTATATGAC ····AGGTAAGGTGGTTGACGGGCTGG	0,00313	6,24E-05

Таблица Последовательностей и частот аллельных вариантов в зоне-3

	аллельные варианты	Стратегия редактирования / частота аллельных вариантов	
		HR	PE2
WT	GCTGCTAACCCAGGTCACAGCTGTTTCTGGAGGGGAGGAATTCTTCATCAGTAAATATTCACAGTAGGAA	0,98	0,99
MUT	GCTGCTAACCCAGGTCACAGCTGTTTCTGGAGGGGAGGAATTCTTCATCAGTAAATATTCACAGTAGGAA	0,013	0,005
d1	GCTGCTAACCCAGGTCACAGCTGTTTCTGGAGGGGAGGAATTCTTCATCAGTAAATATTCACAGTAGGAA	0,007	0,0001

Таблица Последовательностей и частот аллельных вариантов в зоне-4

	аллельные варианты	Стратегия редактирования / частота аллельных вариантов	
		HR	PE2
WT	ATTTGACAGTATCTCTCAAAGTCCAGTAGTCTATTTTAGGT ATGGGTGAGAGCAACTGTCTTTGGAA	0,97	0,9995
MUT	ATTTGACAGTATCTCTCAAAGTCCAGTAGTCTATTTTAGGT ATGTAAGAGAGCAACTGTCTTTGGAA	0,015	0,0003
d2	ATTTGACAGTATCTCTCAAAGTCCAGTAGTCTATTTTAGGT ····GGGTGAGAGCAACTGTCTTTGGAA	0,005	0,0001
d12	ATTTGACAGTATCTCTCAAAGTCCAGTAGTCTATTTTAGGT ············TATGGGTGAGAGCAACTGTCTTTGGAA	0,003	4E-05
d11	ATTTGACAGTATCTCTCAAAGTCCAGTAGTCTATTTTAGGTGAGTAGTCTATTTAGGTGAGAGCAACTGTCTTTGGAA	0,003	1E-05

Таблица Последовательностей и частот аллельных вариантов в зоне-5

	аллельные варианты	Стратегия редактирования / частота аллельных вариантов												
		ssDNA	ssDNA	dsDNA	dsDNA	5' over	5' over	3' over	3' over	bio-ssDNA	Cas9 prot	PE2	PE2	
WT	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,18	0,11	0,46	0,14	0,09	0,10	0,30	0,10	0,19	0,31	0,84	0,09	
MUT	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,25	0,24	0,17	0,31	0,78	0,25	0,14	0,20	0,15	0,09	0,02	0,15	
d2	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0	0,006	0	0,002	0	0,005	0	0,008	0	0	0	0,009	
d2b	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	3,5E-05	0,004	0	0,001	0	0,002	0	0,005	5E-05	0,01	9E-05	0,007	
d1	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,33	0,36	0,16	0,29	0,04	0,32	0,37	0,40	0,39	0,29	0,03	0,42	
d1b	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,04	0,00015	0,005	0	0,001	0,0002	0,001	1E-04	0,003	0,003	0,002	5E-05	
d1	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,008	0,022	0,005	0,006	0,0006	0,017	0,0006	0,03	0,03	0,002	0,0008	0,04	
d1b	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,003	0,02	0,025	0,036	0,0006	0,025	0,0006	0,01	0,002	0,005	0,001	0,002	
d2	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,002	0,011	0,0002	0,015	0,0008	0,013	1E-04	0,011	0,006	0,004	0,0007	0,01	
d2	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,006	0,005	0,0002	0,001	0	0,004	0	0,006	0,001	0	5E-05	0,008	
d3	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	7E-05	0,006	0,0002	0,0009	0,0001	0,004	0,004	0,008	5E-05	0,003	0,0002	0,01	
d4	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,0002	0,011	0	0,002	0	0,007	0,003	0,014	0,0002	0,0006	0,0002	0,018	
d5	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,017	0	0,0005	0	0,0005	0	0,0003	0	0,0003	0	0,0004	5E-05	
d5b	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,009	0,009	0,0003	0,003	0,0007	0,006	0,004	0,013	0,0003	0,0009	0,0003	0,016	
d7	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,0009	0	0,0008	0	0,0007	0	0,0004	0	0,02	0,021	0,001	0	
d9	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,017	0	0,003	0	0,0007	0	0,005	0	0,011	0,001	0,001	0	
d13	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0	0,012	0	0,004	0	0,012	0	0,019	0	0	0	0,024	
d14	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,03	0,008	0,012	0,002	0,003	0,005	0,008	0,01	0,043	0,062	0,003	0,015	
d14b	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,005	0,023	0,004	0,04	0,002	0,03	0,02	0,015	0,018	0,027	0,003	0,003	
d23	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0,0005	0,015	0,011	0,005	0,0003	0,015	0,0003	0,023	0,002	0,006	0,0004	0,034	
d34	AGAATGAATCCCACTGGGTTGCTGACACCGAGGCTGGAACA GCGAGGTAGCAACAGAAATGACCTTCACATTCGTGA	0	0,008	8E-05	0,001	0,0001	0,007	0	0,012	0,001	0	0	0,017	

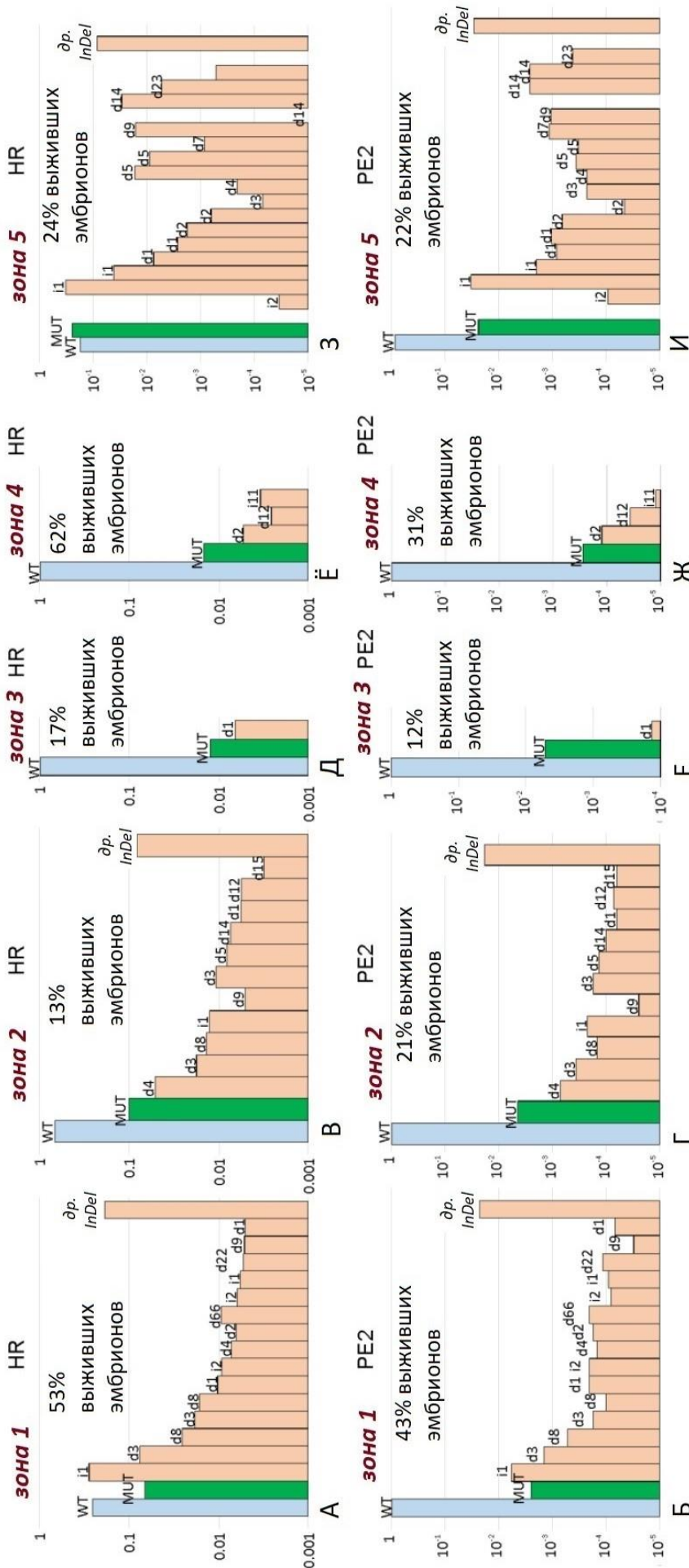


Рисунок 13. Сравнительный анализ эффективности редактирования генома в зонах 1–5 при HR, определяемой оцОНК и с задействием технологии PE2. На диаграммах показаны частоты аллельных вариантов на логарифмической шкале, обнаруженных в бластоцистах, развившихся из зигот после микроинъекции. Для каждой конструкции над диаграммой указан процент зигот, развившихся до стадии бластоцисты или морулы.

- пункты А, В, Д, Ё, З: результаты редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием егРНК и HR, определяемой оцОНК.
- пункты Б, Г, Е, Ж, И: результаты редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием регРНК и обратной транскрипции.
- синие столбцы – дикий тип с аллельными вариантами над столбцами;
- зеленые столбцы – запрограммированные мутации с аллельными вариантами над столбцами;
- бежевые столбцы – вставки и делеции с аллельными вариантами над столбцами.

Зависимости эффективности редактирования от расположения зон редактирования относительно РАМ не наблюдалось. Можно ожидать, что замена РАМ в случае зоны 4 приведет к полной потере возможности повторного расщепления отредактированных последовательностей ДНК и, таким образом, к снижению образования InDel. Однако эффективность редактирования в этом случае была очень низкой, в то время как точность редактирования, т.е. отношение целевой мутации к InDel, была сравнима с другими зонами редактирования.

Репарация двуцепочечных разрывов ДНК осуществляется по пути гомологичной рекомбинации [587], а в качестве матрицы используется дцДНК. Обязательным этапом HR является резекция 5'-конца ДНК с образованием 3'-выступов, вторгающихся в интактную матрицу дцДНК. В поисках наиболее подходящей матрицы для редактирования генома по пути HR, после расщепления ДНК, управляемого егРНК Cas9, в данном исследовании были создан набор матриц для HR непосредственно для конкретной целевой области (chr5: 66441024-6TGT/GCC). В дополнение к матрице оцДНК длиной в 200 нуклеотидов использовалась дцДНК матрица с тупым концом той же длины и вариантами 3'- или 5'- выступами длиной по 50 нуклеотидов для микроинъекций в зиготы мышей вместе с мРНК Cas9 и егРНК (*Таблица 6; Рисунок 14.*). Для оценки альтернативного варианта доставки Cas9 в клетки кроме соответствующей мРНК, в исследование был добавлен опыт по микроинъекции белка Cas9. Кроме того, стремясь увеличить шансы репарации по HR-пути относительно NHEJ, был задействован новый метод, основанный на использовании гибрида Cas9 со стрептавидином (Cas9-mSA) [548], который в итоге в формате мРНК, вместе с егРНК и с 5'-биотинилированной одноцепочечной ДНК (bio-оцДНК) инъецировали непосредственно в зиготы. Выживаемость зигот после микроинъекции и успешное развитие до стадии морулы и бластоцисты существенно различались в разных экспериментах, даже для одного и того же инструмента редактирования генома (*Таблица 7*), вероятно, из-за различий в диаметре капилляра для микроинъекции от эксперимента к эксперименту. В среднем выживаемость была сопоставима для всех инструментов редактирования генома (*Рисунок 15.*), что несколько лучше для инъекции мРНК Cas9-mSA/bio-оцДНК и несколько хуже для инъекции мРНК Cas9/5'-выступающей ДНК. Группа бластоцист (*Таблица 7*) была задействована для выделения геномной ДНК, амплификации локуса ДНК-мишени и NGS-анализа ампликонов (*Рисунок 15.*).

В результате проведенного анализа было показано, что применение оцДНК матриц и матриц с 3'- или 5'-выступами привело к получению почти одинаковых долей целевых мутаций в продуктах репарации двуцепочечных разрывов (*Рисунок 15.*). Это несколько удивительно, поскольку 3'-выступающие концы ДНК являются естественными промежуточными продуктами HR, и отжиг должен проходить эффективнее в присутствии матриц с 3'-выступающими

концами. Однако, вариабельность получения целевых мутаций от эксперимента к эксперименту значительна, что можно наблюдать, например, для двух повторностей экспериментов при применении матрицы с 5'-выступом (*Рисунок 15.В*). Использование новых технологий Cas9-mSA (*Рисунок 15.Д*) и доставки Cas9 в виде белка (*Рисунок 15.Е*) не привели к увеличению эффективности целевого мутагенеза. Как и в эксперименте с редактированием пяти различных геномных локусов, спектр InDel характерен для сайта расщепления и слабо зависит от используемого метода редактирования генома.

В итоге, точность редактирования генома, представленная, как соотношение между частотой генерации целевых мутаций и побочных продуктов InDel, сопоставима для всех типов матриц, используемых в HR-пути репарации (*Рисунок 15.*).



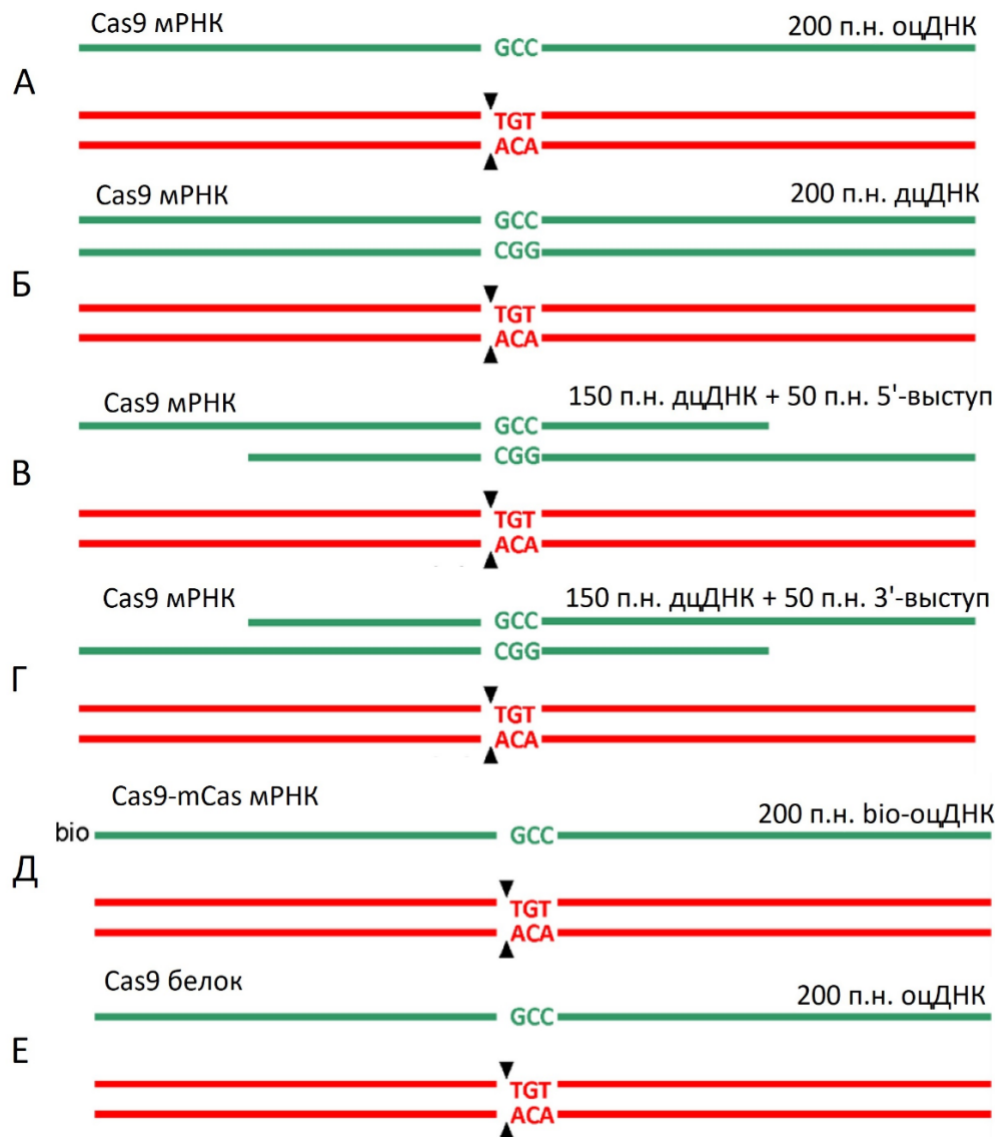


Рисунок 14. Схема редактирования генома по пути HR, после расщепления ДНК, управляемого егРНК Cas9.

- место расщепления отмечено черными стрелками.
- нуклеотиды, выделенные красными литерами, отмечают последовательности дикого типа.
- нуклеотиды, выделенные зелеными литерами, отмечают отредактированные последовательности.
- матрицы ДНК, показаны зелеными линиями.

- А: Схема HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9.
- Б: Схема HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого дцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9.
- В: Схема HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого ДНК-матрицей с 5'-выступом; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9.
- Г: Схема HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого ДНК-матрицей с 3'-выступом; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9.
- Д: Схема биотинилированного (bio) HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9-mSA доставлена путем инъекции мРНК Cas9-mSA.
- Е: Схема HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции белка Cas9.

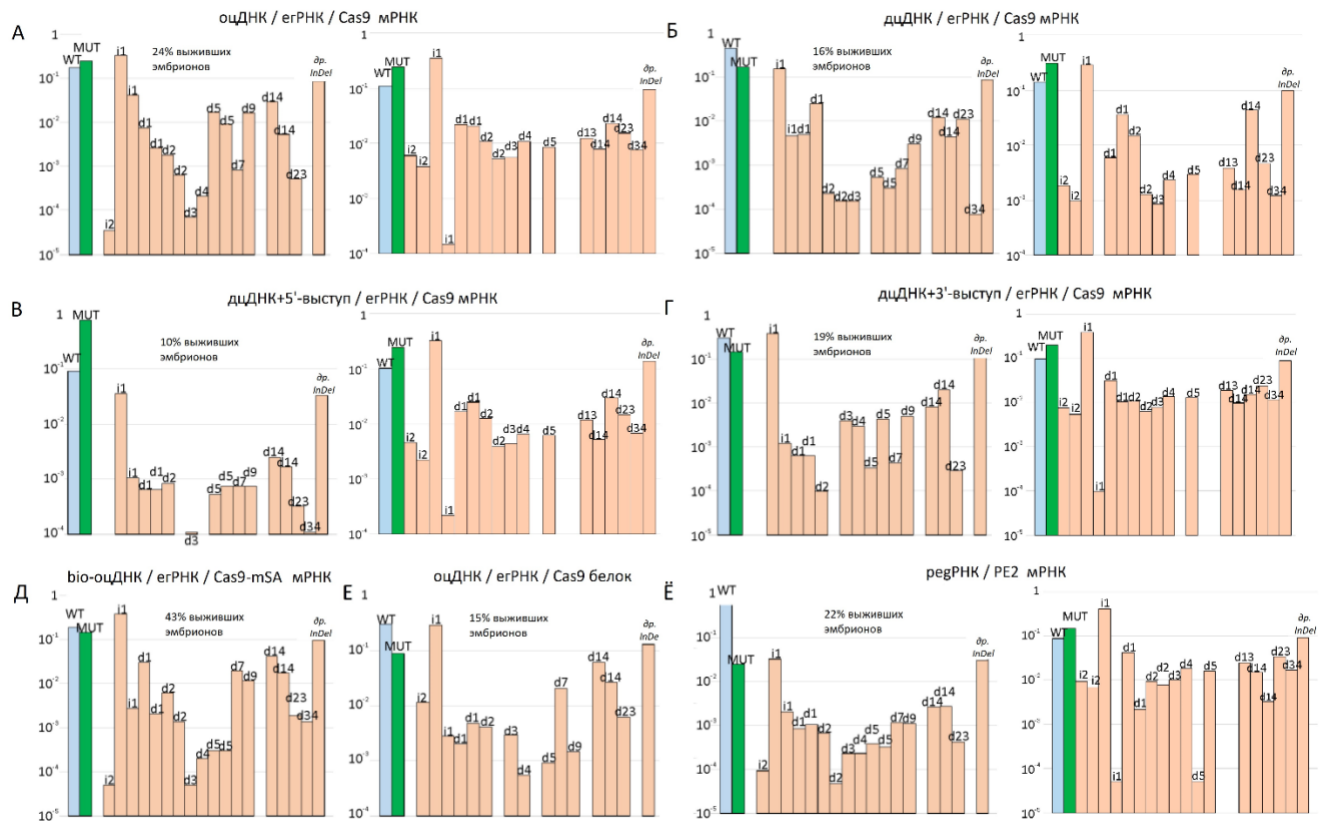


Рисунок 15. Сравнение эффективности редактирования генома по пути HR с использованием различных типов матриц, а также альтернативными методами редактирования. На диаграммах показаны частоты аллельных вариантов на логарифмической шкале, обнаруженных в бластоцистах, развившихся из зигот после микроинъекции. Для каждой конструкции над диаграммой указан процент зигот, развившихся до стадии бластоцисты или морулы.

- синие столбцы – дикий тип с аллельными вариантами над столбцами;
- зеленые столбцы – запрограммированные мутации с аллельными вариантами над столбцами;
- бежевые столбцы – вставки и делеции с аллельными вариантами над столбцами.

- А: Результаты HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9. (два эксперимента)
- Б: Результаты HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого дцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9. (два эксперимента)
- В: Результаты HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого ДНК-матрицей с 5'-выступом; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9. (два эксперимента)
- Г: Результаты HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого ДНК-матрицей с 3'-выступом; Cas9 доставлена путем инъекции мРНК Cas9. (два эксперимента)
- Д: Результаты биотинилированного (bio) HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9-mSA доставлена путем инъекции мРНК Cas9-mSA.
- Е: Результаты HR-редактирования генома с помощью расщепления, направленного егРНК, и, управляемого оцДНК; Cas9 доставлена путем инъекции белка Cas9.
- Ё: Результаты редактирования генома путем regРНК-направленного расщепления и обратной транскрипции с помощью PE2. (два эксперимента)

В результате проведенного сравнительного анализа эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей были сделаны следующие заключения:

- Применение новых методов редактирования генома, таких как PE2 или Cas9-mSA, не увеличивает частоту реализации целевых мутаций.
- Применение различных матриц для гомологической рекомбинации, таких как одноцепочечная, двуцепочечная или с 3'- и 5'-выступами ДНК, приводит к почти равновероятному возникновению целевой мутации.
- В то время как применение технологии PE2 в некоторых экспериментах повышает точность целевого мутагенеза, однако, эффективность PE2 сопоставима с редактированием генома после расщепления ДНК, управляемого egРНК Cas9, по HR-пути с использованием одноцепочечной, двуцепочечной или с 3'- и 5'-выступами ДНК-матриц.

## Сравнительный анализ стратегий получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом

Схема непосредственных манипуляций с мышами для получения особей с измененным геномом проходит в несколько стадий, и каждая нуждается в оптимизации для достижения максимальной эффективности (Рисунок 16.).

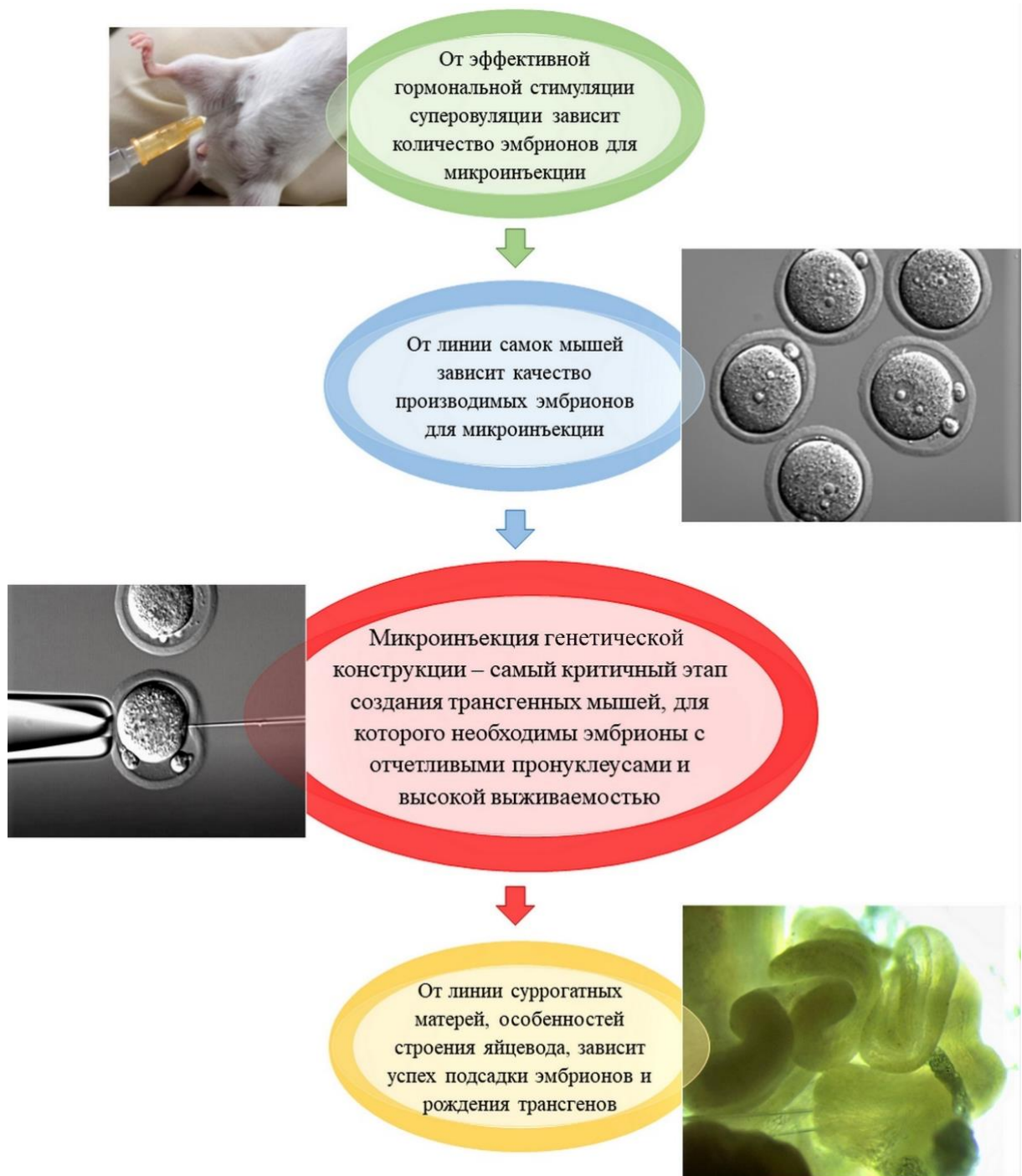


Рисунок 16. Схема получения линий мышей с измененным геномом.

Для тестирования и внедрения новых подходов в схему получения мутантных мышей, было выделено свыше 10 000 яйцеклеток из примерно 850 мышей, проведены операции по внедрению эмбрионов более чем 300 суррогатным матерям, у которых родилось больше 380 мышат, прошедших процедуру редактирования генома. Были отобраны 34 линии мышей с направленным изменением 16 генов (Таблица 9.).

Таблица 9. Значения эффективности получения зигот, пригодных для микроинъекции, при разных условиях.

Эффективность получения яйцеклеток, пригодных для микроинъекции								
Линия мышей	Тип гормональной нагрузки	Число мышей, прошедших супер-овуляцию и ссаженных с самцами	Число покрытых мышей	Медиана доли покрытых мышей	Число выделенных зигот	Медиана числа зигот на одну мышь	Число зигот, перенесших микроинъекцию	Медиана доли зигот, перенесших микроинъекцию, от общего числа выделенных
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	ГСЖК & ХГЧ	2007	619	0.40	5124	8.39	2215	0.43
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	Антисыворотка ингибина + ГСЖК & ХГЧ	166	105	0.67	3499	33.20	1191	0.33
Инбредная линии CBA	ГСЖК & ХГЧ	540	92	0.15	721	5.11	386	0.50
Инбредная линии FVB	Антисыворотка ингибина + ГСЖК & ХГЧ	105	64	0.60	1449	22.83	696	0.41
Эффективность получения потомства от суррогатных матерей после подсадки яйцеклеток, прошедших микроинъекцию								
Линия мышей	Число подсаженных эмбрионов, перенесших микроинъекцию		Число рожденных мышат		Медиана доли рожденных мышат от числа подсаженных эмбрионов			
Гибрид F1 C57Bl/6 × CBA	1361		145		0.053			
Аутбредная линия CD1	1532		154		0.040			

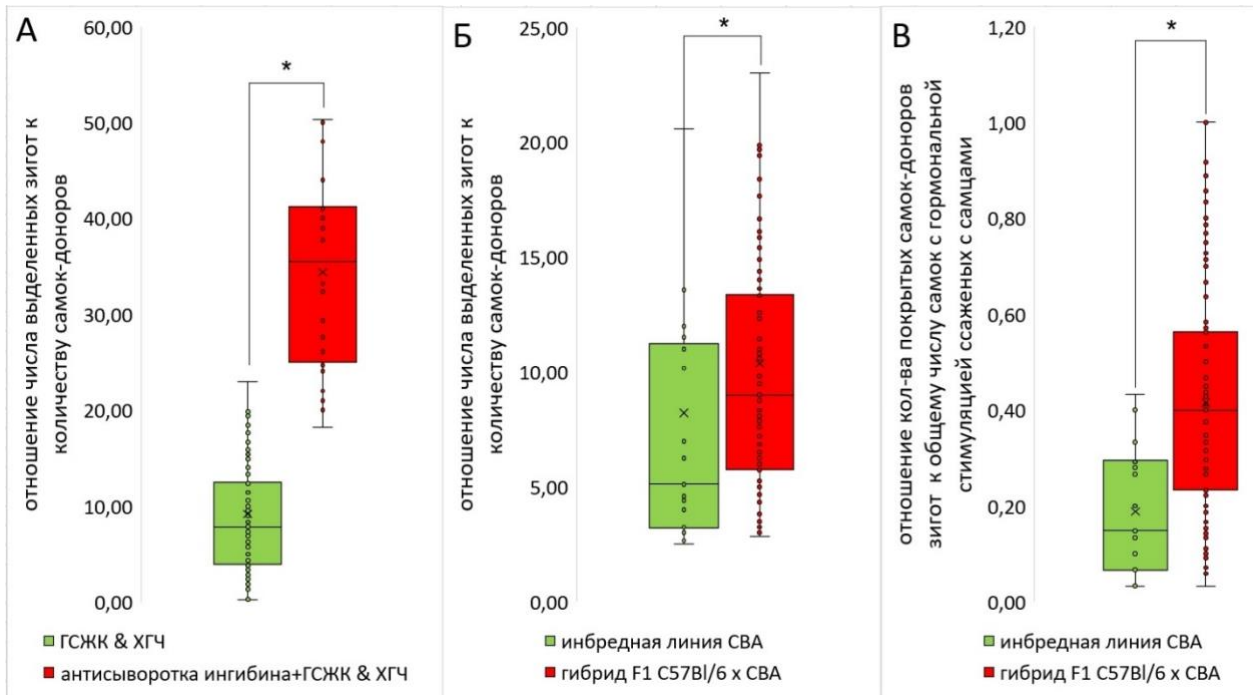
Первой задачей стало получение максимально возможного количества качественных зигот от одной мыши для процедуры микроинъекции генетической конструкцией. Для этого был произведен сравнительный анализ продуктивности самок мышей после классической гормональной стимуляции смесью ГСЖК и ХГЧ [588] или комбинацией данных гормонов на фоне антисыворотки ингибина [589]. Введение в протокол гормональной стимуляции сыворотки, содержащей антитела к ингибину, было обусловлено тем, что сам ингибин – это белковый гормон, который, действуя на клетки гипофиза, подавляет выработку фолликулостимулирующего гормона, а его инактивация с помощью антисыворотки должна способствовать созреванию фолликулов, тем самым стимулируя суперовуляцию [590; 591; 592]. В результате сравнительного анализа, при классической схеме гормональной стимуляции средний выход составил 9 зигот, однако при добавлении к ГСЖК антител к ингибину число получаемых от каждой мыши овулировавших яйцеклеток возросло на 275% ( $p < 0.01$  U-критерий Манна–Уитни) (среднее – 34, максимум – 50) (Таблица 9; Рисунок 17.A). Это

усовершенствование позволило снизить количество животных для проведения эксперимента, что отразилось на уменьшении затрат на их разведение и содержание, а главное, увеличило выход выживших после введения генетической конструкции эмбрионов для последующей подсадки суррогатной матери.

Далее критической точкой в схеме создания мутантных мышей является выживаемость эмбрионов после введения генетической конструкции. С этой целью были подобраны линии мышей, самки которых производят зиготы, более устойчивые к проникновению микроинъекционной иглы и подходящие по структуре для пронуклеарных введений. В первую очередь были изучены гибридные самки F1, родителями, которых являются подробно генетически охарактеризованные и часто используемые инбредные линии C57Bl/6 (также встречается аббревиатура B6) и CBA. Самки F1 за счет эффекта гибридной силы отличаются повышенной фертильностью, лучше реагируют на суперовуляцию, дают большое количество яйцеклеток [593; 594], а их зиготы до 8 раз эффективнее переживают микроинъекцию по сравнению с инбредными линиями [595]. Однако эмбрионы от родителей F1 генетически отличаются друг от друга и содержат разные комбинации полиморфных генетических участков, которые различаются в исходных инбредных линиях, что может приводить к случайным искажениям результатов из-за возможного влияния различий в генетическом фоне на фенотип [594]. Для нивелирования неблагоприятных эффектов, мутантных мышей, полученных при редактировании генома гибридов F1, необходимо проводить через процедуру обратного скрещивания и выводить на одну из инбредных родительских линий. Это приводит к дополнительным затратам на разведение и содержание, а также увеличивает промежуток времени между рождением мышей с измененным геномом и началом экспериментальных исследований. В экспериментах по изучению фенотипа мутантных мышей предпочтительнее использовать инбредные линии, обладающие одинаковыми геномами. Самым распространенным генетическим фоном мутантных мышей является линия C57Bl/6. Тем не менее, несмотря на хорошую реакцию молодых самок C57Bl/6 на стимуляторы суперовуляции [594], их одноклеточные эмбрионы имеют зернистую цитоплазму и мелкие, плохо различимые пронуклеусы. Кроме того, зиготы C57Bl/6 плохо переносят микроинъекцию, которая приводит к повышенной смертности эмбрионов этой линии [596; 597], вследствие чего их использование для получения мутантных мышей представляется малоэффективным. Поэтому анализу была подвержена и вторая родительская инбредная линия гибридов, а именно CBA. Оценка продуктивности самок CBA по сравнению с гибридами первого поколения показала, что инбредные самки CBA дают на 21% ( $p < 0.05$  U-критерий Манна–Уитни) меньше зигот, чем F1 мыши (Таблица 9; Рисунок 17.Б), что может быть связано с разными концентрациями

эндогенных гормонов или с различной чувствительностью яичников к экзогенным гонадотропинам, которая может влиять на количество овулировавших ооцитов [598]. Для того, чтобы выявить возможную причину низких репродуктивных показателей линии СВА, была проверена стабильность эстрального цикла мышей этой линии. Оказалось, что по сравнению с гибридными мышами, у которых эструс наступает стабильно каждые 4–5 дней, что нормально для лабораторных мышей [599], у мышей линии СВА значимо ( $p < 0.05$  U-критерий Манна–Уитни) чаще фиксировались провалы в наступлении эструса на фоне пролонгации стадии метэструса (Рисунок 18.). При этом эффективность покрытия самок СВА на 55% ( $p < 0.01$  U-критерий Манна–Уитни) ниже, чем гибридных особей (Таблица 9; Рисунок 17.В). Полученные данные свидетельствуют о нестабильности эстрального цикла самок линии СВА, что, вероятно, и приводит к низкой эффективности покрытия и слабой реакции на суперовуляцию. При этом, согласно опубликованным данным, эмбрионы, полученные от самок СВА, по ряду параметров уступают гибридным, они значительно хуже переносят не только процедуру микроинъекции, но и криоконсервацию [600].

Поскольку инбредные линии СВА и С57В1/6 оказались малопригодными для получения большого количества качественных оплодотворенных яйцеклеток [596; 597], была исследована ещё одна инбредная линия – FVB, которую тоже задействуют в качестве донора зигот для микроинъекций [594]. В итоге анализ показал, что самки FVB менее эффективно реагируют на суперовуляцию и дают на 32% ( $p < 0.05$  U-критерий Манна–Уитни) меньше зигот, чем гибриды F1 (Таблица 9; Рисунок 20.А). Хотя среднее количество овулировавших яйцеклеток у линии FVB было меньше, чем у гибридов F1, одноклеточные эмбрионы FVB по сравнению с гибридными имеют «чистую» незернистую цитоплазму, крупные, четко различимые пронуклеусы, которые служат легкими мишенями для микроинъекций (Рисунок 19.). Также эмбрионы FVB на 22% ( $p < 0.05$  U-критерий Манна–Уитни) демонстрируют более высокую выживаемость после микроинъекции по сравнению с эмбрионами от самок F1 (Таблица 9; Рисунок 20.Б). Таким образом, проанализировав две распространенные линии для использования в качестве доноров зигот, можно заключить, что и FVB и гибриды первого поколения С57В1/6 × СВА подходят для данной задачи, однако необходимо учитывать специфику эмбрионов каждой из линий при планировании эксперимента.



Рису

нок 17. \* $p < 0.01$  Манна–Уитни (U-критерий)

А: Влияние способа гормональной стимуляции самок F1 C57Bl/6 × СВА на кол-во овулировавших яйцеклеток.

Б: Количество овулировавших яйцеклеток у самок мышей инбредной линии СВА и гибридов F1 C57Bl/6×СВА; суперовуляцию вызывали инъекциями смеси ГСЖК и ХГЧ.

В: Эффективность покрытия самок мышей инбредной линии СВА и гибридов F1 C57Bl/6×СВА самцами соответствующей линии.



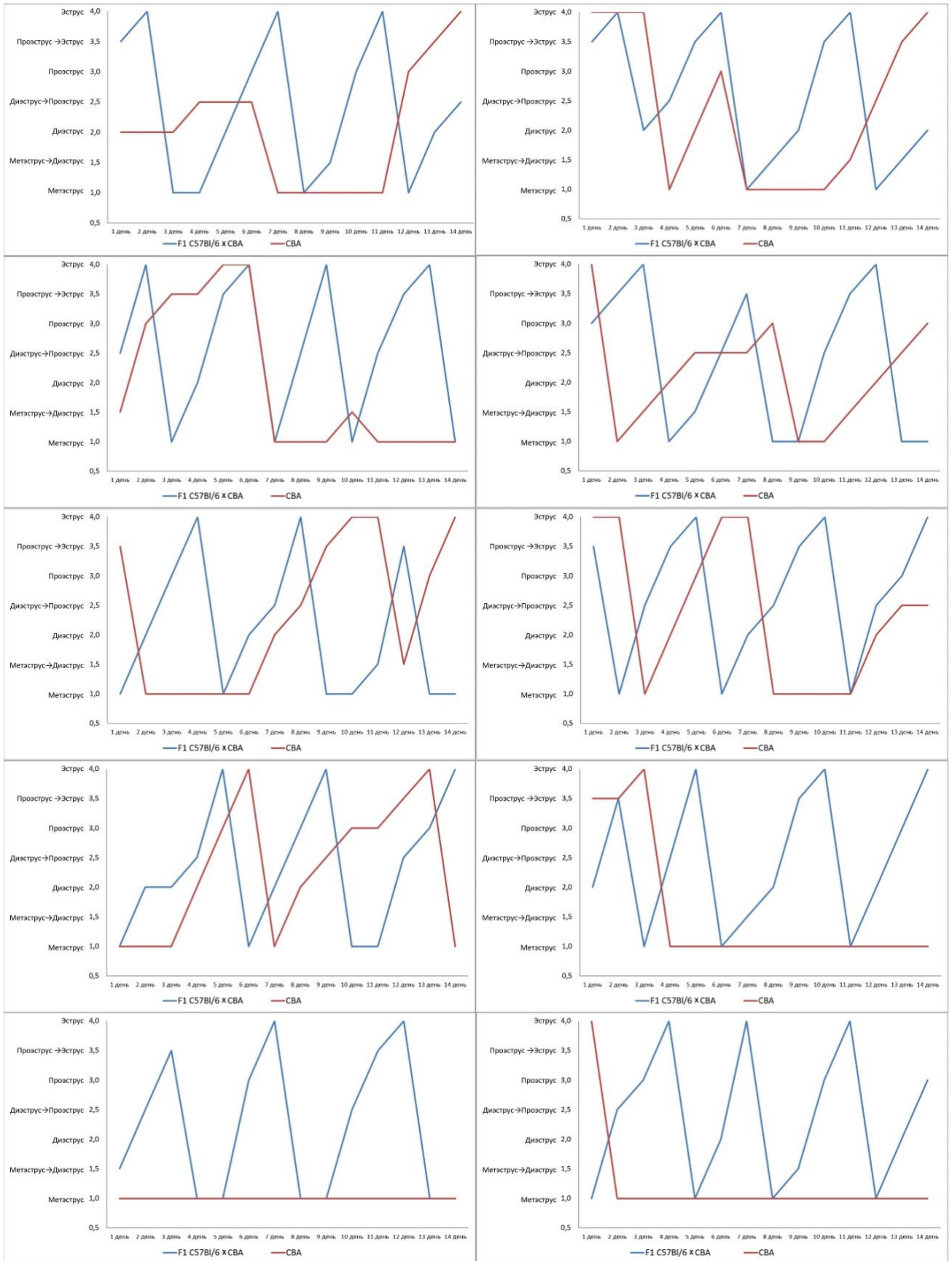


Рисунок 18. Динамика эстрального цикла половозрелых самок мышей инбредной линии CBA и гибридов F1 C57Bl/6 x CBA.

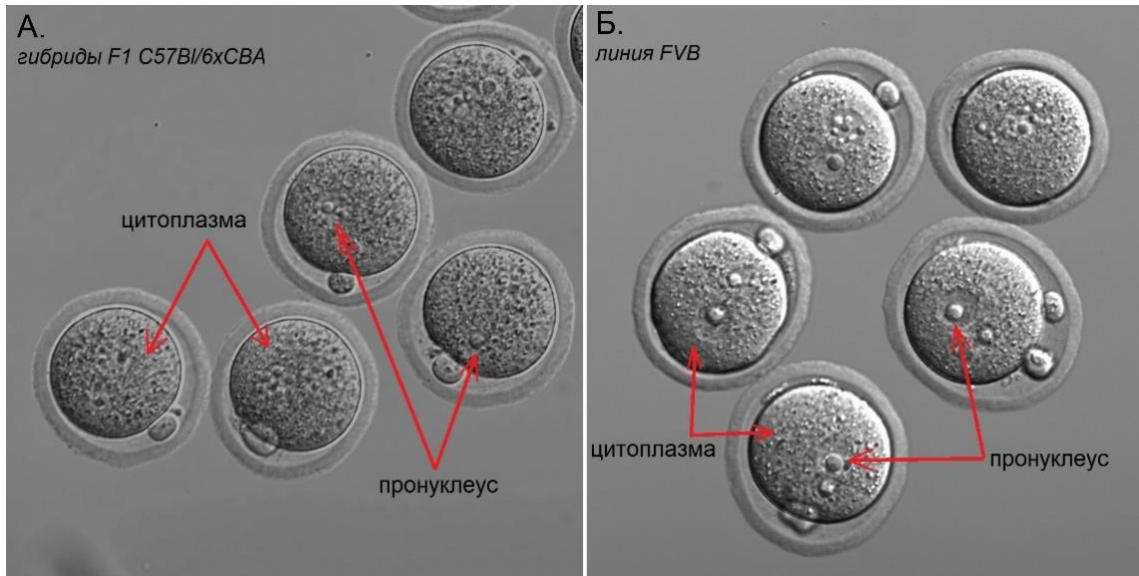


Рисунок 19. Особенности структуры оплодотворенных яйцеклеток, предназначенных для микроинъекции генетической конструкции:

А: зернистая цитоплазма и плохо различимые пронуклеусы у гибридов F1 C57Bl/6×CBA;

Б: однородная цитоплазма и четко очерченные пронуклеусы у инбредной линии FVB.

Следующим ответственным этапом в создании мутантных мышей становится подсадка оплодотворенных яйцеклеток, переживших микроинъекцию, в инфундибулум суррогатной матери, и их последующее внутриутробное и постнатальное развитие. Существенную роль здесь играет выбор линии для получения псевдобеременных самок – суррогатных матерей [595; 601]. Процедура микроинъекции крайне травматична для эмбрионов. Сравнение нативных и микроинъекцированных зародышей показало, что последние значительно отстают в эмбриональном развитии [602]. Это накладывает особую ответственность на оператора при проведении операции и подборе суррогатной матери, поскольку при выполнении этой задачи исследователь может столкнуться с рядом ограничений. Небольшие репродуктивные пути мыши и положительное давление в яйцевоме может привести к обратному выталкиванию эмбрионов в раскрытую полость яичника после подсадки в инфундибулум. Кровь и/или слизь на кончике капилляра может привести к его закупориванию и потере эмбрионов во время операции. Наконец, дефекты маточной восприимчивости, сокращение матки также могут стать причинами неудачной беременности [603]. Чтобы оптимизировать проведение операции по подсадке микроинъекцированных эмбрионов, обеспечить стабильное протекание беременности, успешное рождение и выживание помета, важно, чтобы линия самки-реципиента имела хорошие репродуктивные характеристики и ярко выраженное материнское поведение [604]. Это подтверждается сообщениями о том, что показатели имплантации эмбрионов и рождаемости мышей разного генетического происхождения в высокой степени зависят от характеристик линии приемной матери [601]. Использование инбредных мышей в качестве

суррогатных матерей неэффективно [605]. Чаще всего они становятся «плохими» матерями, что может привести к гибели помета мышей с измененным геномом. Отдельную трудность представляет гибель большей части микроинъецированных эмбрионов после подсадки в яйцевод суррогатной матери. Если в матке выживает только один или два эмбриона, то они могут стать слишком большими, чтобы родиться без ущерба для самих себя и/или матери, а самки некоторых линий вообще могут не заботиться о малочисленных пометах, что тоже приведет к гибели новорожденных мутантных мышей [604]. Часто в качестве приемных матерей выбирают гибридных самок F1 [606; 607], которые считаются «хорошими» матерями, способными родить и сохранить помет, состоящий даже из двух особей [601]. Сообщалось, что в роли суррогатных матерей используют как гибридных, так и аутбредных мышей [597; 608; 609]. В связи с этим были выбраны и проанализированы в качестве суррогатных матерей гибридные самки F1 C57Bl/6×CBA и аутбредные самки CD1. Линия CD1 была выбрана в связи с тем, что эта линия выведена именно для проведения хирургических операций [610]. Результаты трехлетних наблюдений показали, что по эффективности вынашивания и характеристикам материнского поведения достоверных различий между мышами F1 и CD1 не обнаружено (*Таблица 9; Рисунок 20.В*). Самки обеих линий в среднем рожают от 10% жизнеспособных мышей относительно количества подсаженных эмбрионов и в актах каннибализма отмечены не были, кроме единичных случаев, укладывающихся в рамки нормального поведения самок грызунов [611; 612]. Однако самкам CD1 намного удобнее проводить операции по внедрению эмбрионов, чем гибридным мышам. В отличие от F1, самки CD1 имеют крупный, с более тонкими стенками и широким входом яйцевод (*Таблица 9; Рисунок 21.*), меньшее количество жировых отложений на яичнике, что снижает общее количество лишней жидкости в операционной области и облегчает работу оператора. В целом, обе эти линии могут успешно использоваться в качестве суррогатных матерей.

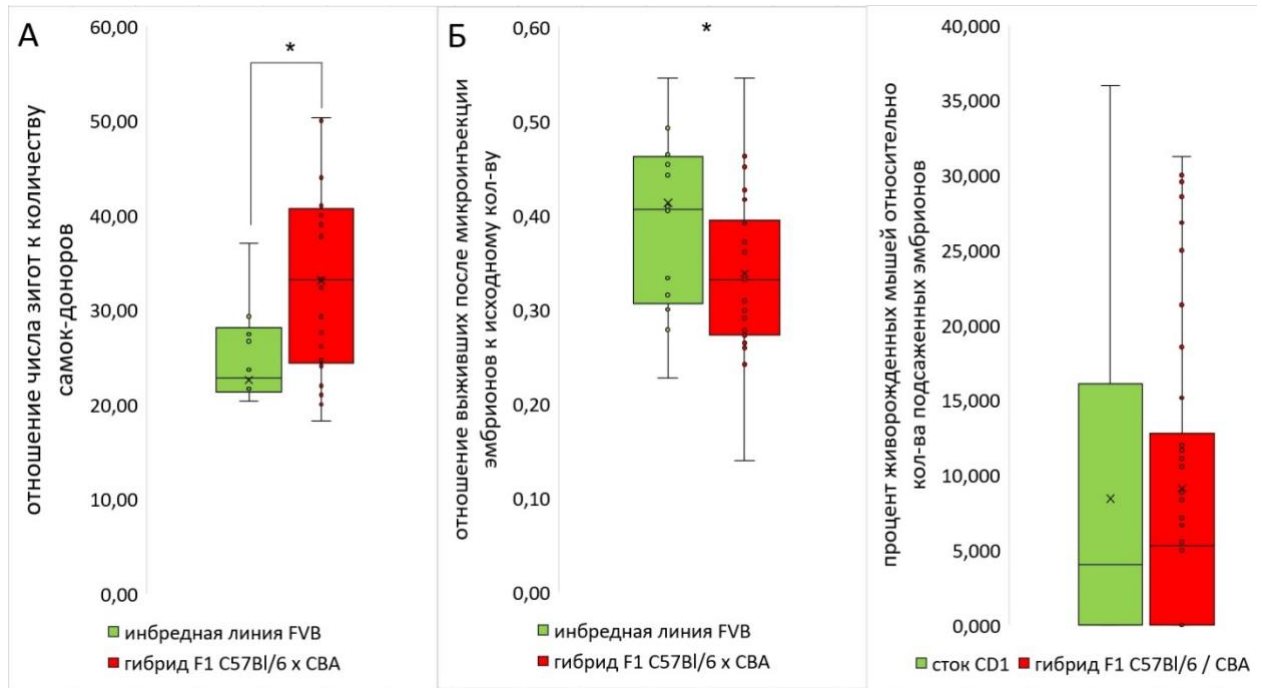


Рисунок 20. \* $p < 0.05$  Манна–Уитни (U-критерий)

А: Количество овулировавших яйцеклеток у самок мышей инбредной линии FVB и гибридов F1 C57Bl/6×CBA; суперовуляцию вызывали инъекциями смеси ГСЖК с добавлением антисыворотки ингибина и ХГЧ.

Б: Влияние генетического фона самок мышей инбредной линии FVB и гибридов F1 C57Bl/6×CBA на выживаемость эмбрионов после микроинъекции.

В: Процент живорожденных мышей относительно количества подсаженных эмбрионов.

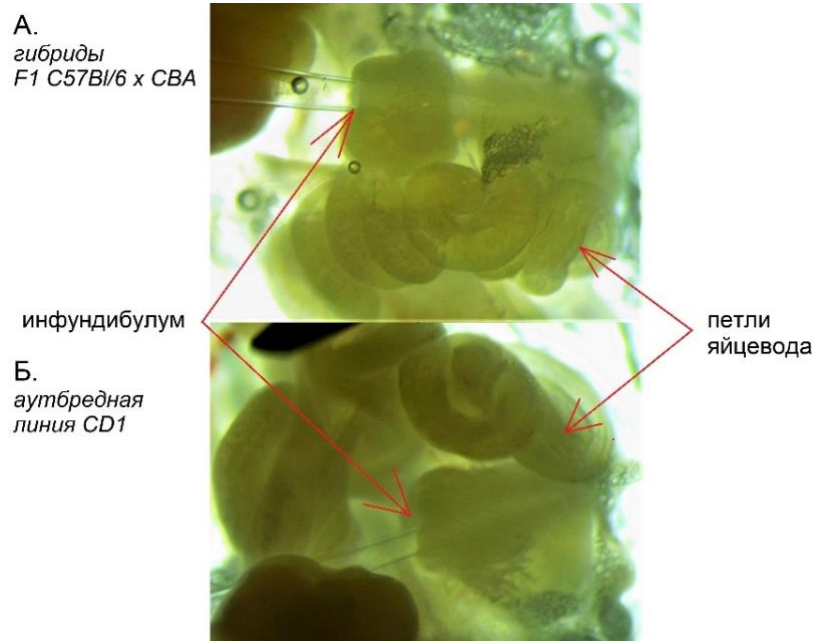


Рисунок 21. Особенности строения инфундибулума у суррогатных матерей.

А: инфундибулум у гибридов F1 C57Bl/6×CBA с толстыми стенками и узким входом.

Б: инфундибулум у аутбредных самок CD1 крупный, с тонкими стенками и широким входом.

В итоге проведенного сравнительного анализа стратегий получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом были выдвинуты следующие заключения:

- Гормональная стимуляция с использованием антисыворотки ингибина значительно (примерно в 3 раза) повышает продуктивность самок – доноров оплодотворенных яйцеклеток, по сравнению с традиционной гормональной стимуляцией.
- В качестве доноров наиболее целесообразно использовать мышей линии FVB, зиготы которых имеют пронуклеусы с четкими границами, а эмбрионы обладают высокой выживаемостью после микроинъекции. У этой линии отсутствует необходимость обратного скрещивания с носителем инбредного генетического бэкграунда.
- Аутбредные самки CD1 так же подходят в качестве суррогатных матерей, как и гибриды F1 C57Bl/6 × CBA.

## §2. Исследование на мышинной модели фенотипических, физиологических и биохимических последствий нокаута гена *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок *Mtln*

При подготовке данного раздела диссертации использованы публикации [644; 645; 646], в которых, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Пептиды, кодируемые короткими открытыми рамками считывания, считаются новым классом биологически активных молекул [1; 2; 3]. Одним из недавно идентифицированных пептидов стал митохондриальный белок миторегулин (*Mtln*), закодированный у мышей ядерным геном *1500011k16Rik* и найденный, в том числе и нашей лабораторией [4; 7]. В международных публикациях встречаются несколько вариантов обозначения данного пептида: *Mtln* (*mitoregulin*), *MOXI* (*micropeptide regulator of  $\beta$ -oxidation*), *MPM* (*micropeptide in mitochondria*), *LEMUR* (*lncRNA-encoded micropeptide*). Этот пептид состоит из 56 аминокислот и локализован в межмембранном пространстве митохондрий, содержит единственный гидрофобный сегмент, предположительно трансмембранный, расположенный вблизи его N-конца и положительно заряженную C-концевую часть. *Mtln* консервативен у позвоночных и экспериментально обнаружен у человека [7; 8], мышей [4; 7; 8] и рыб *Danio rerio* [9]. Хотя существует общее мнение об участии *Mtln* в контроле дыхания митохондрий и метаболизме липидов/жирных кислот, конкретные детали его функциональной роли несколько противоречивы. Список возможных ролей *Mtln* в физиологии митохондрий включает участие в ассоциации дыхательных комплексов [8], взаимодействии с цитохромом b5 редуктазой 3 (*CYB5R3*), влияющее на состав липидов [4], усилении  $\beta$ -окисления жирных кислот [6; 7] и взаимодействии с АТФ-синтазой [6].

Среди фенотипов, наблюдаемых у мышей с нокаутом гена *1500011k16Rik*, наблюдаются признаки миопатии:

- более низкая производительность на беговой дорожке или вращающемся тренажере [5; 7], но не без некоторых противоречий [8];
- сниженная сила захвата [5; 9];
- более мелкие миофибриллы [5; 9], опять же с некоторыми сомнениями [7];

Описан ряд характеристик эффективности митохондриального дыхания при инактивации *Mtln* для изолированной мышечной ткани [7; 8], выделенных митохондрий [5; 7] и культуры клеток [4; 6]. Однако проявление дефекта дыхания варьирует от исследования к исследованию. В то время как по одним данным дыхание на глутамате/малате или глюкозе/глутамате/пирувате снижено для митохондрий  $\Delta$ *Mtln* [4; 5], в других исследованиях дефект дыхания

обнаруживается только на жирнокислотном субстрате пальмитоилкарнитине [6; 7; 8], или на фоне пищевой депривации животных [8].

Измерение массы тела мышей с нокаутом гена *1500011k16Rik* также дало противоречивые результаты: от отсутствия зависимости от функциональности *Mtln* [6; 5; 7] до снижения веса нокаутных мышей [9]. Накопление триглицеридов при инактивации *Mtln* было зарегистрировано для фибробластов и клеток миеломы [4], а также адипоцитов [6], что неожиданно оказалось не влияющим на накопление жировой ткани у мышей с нокаутом гена *1500011k16Rik* по некоторым данным литературы [7].

В связи с неоднозначными данными по функциям *Mtln*, была поставлена цель исследовать на мышинной модели фенотипические, физиологические и биохимические последствия нокаута гена *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок *Mtln*. Для достижения поставленной цели была создана линия  $\Delta Mtln$  мышей несущих делецию из 82 нуклеотидов, охватывающую промоторную область гена *1500011k16Rik* (Рисунок 22.). Анализ тканей, выделенных из ряда органов полученных  $\Delta Mtln$  мышей, подтвердил репрезентативность мутантной модели (Рисунок 23.). Основываясь на предшествующих наблюдениях, было выбрано несколько направлений фенотипирования  $\Delta Mtln$  мышей и сформулированы задачи исследования:

- Исследовать влияние митохондриального пептида *Mtln* на окислительный метаболизм мышей.
- Исследовать функциональную роль *Mtln* в скелетных мышцах мышей.
- Исследовать влияние митохондриального пептида *Mtln* на функцию почек мышей.

WT  
 CTCTACTTTTGCTGAGTGGTTGCAATGGCCGGACGTGTCTGAGAGGACGCTGCAGGTGT  
 CCGTGCTAGTGGCTTTCGCCCTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGCAAGCGAATCGGCTGCGG  
 AGGCGTTACCTAGACTGGAGGAAGCGGAGGCTGCAGGACAAGCTGGCAACGACTCAGAA  
 AAAGCTGGACCTGGCCTGAGCACGCGCTGCAGC

$\Delta Mtn$   
 CAGACTCAGAGCGGGCCTCAAGCGAGCGCTGTGGCATCTGATCCTTGGCGCAATCCGTA  
 GCTCACTCTACTTTTGCTGAGTGGTTGCAATGGCCGGACGTGTCTGAGAGGACGCTGCA  
 GGTGTCCGTGCTAGTGGCTTTCGCCCTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGCAAGCGAATCGGC  
 TGGCGAGGCGTTACCTAGACTGGAGGAAGCGGAGGCTGCAGGACAAGCTGGCAACGACT  
 CAGAAAAAGCTGGACCTGGCCTGAGCACGCGCTGCAGC

Рисунок 22. Схема редактирования гена 1500011k16Rik. Область генома мыши, охватывающая ген *1500011k16Rik* у мышей дикого типа (WT) и такую же область у мышей с нарушенной кодирующей областью *Mtn* ( $\Delta Mtn$ ). Область кодирования *Mtn* отмечена зеленым цветом, а удаленная область отмечена перечеркнутым текстом.

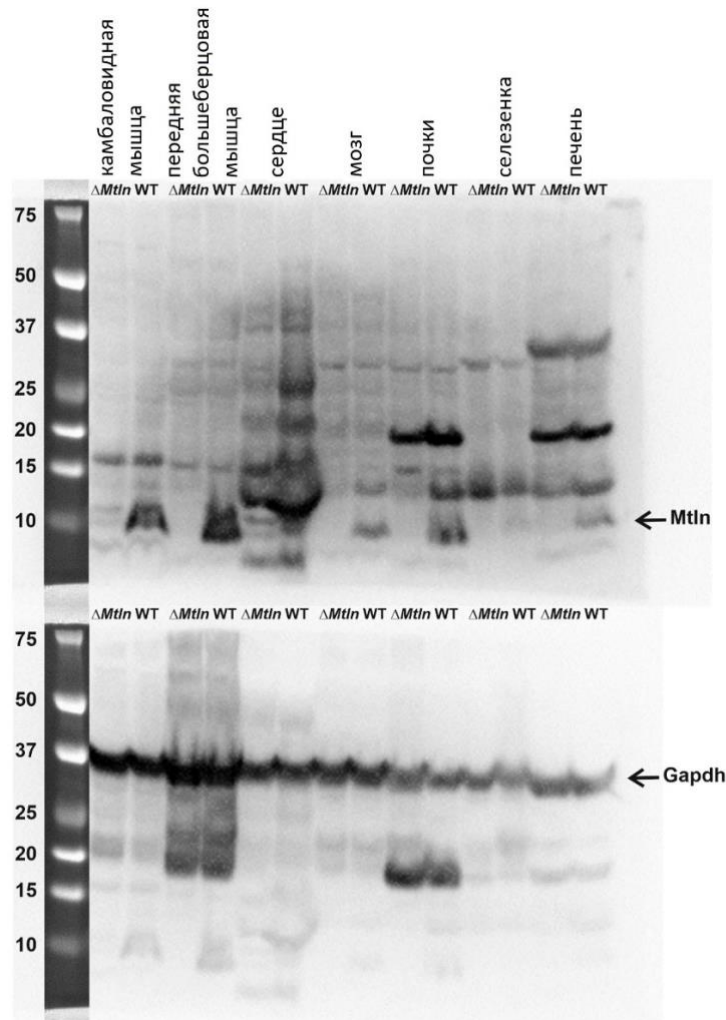


Рисунок 23. Тканевое распределение *Mtn*. Органы представлены в порядке: передняя большеберцовая (*Tibialis anterior*) и камбаловидная (*Soleus*) мышцы, сердце, мозг, почки, селезенка и печень.

- правые дорожки в каждой паре – иммуноблотинг органов мышей дикого типа (WT).
- левые дорожки в каждой паре – иммуноблотинг органов нокаутных мышей ( $\Delta Mtn$ ).
- верхняя панель – гель с антителами anti-*Mtn*.
- нижняя панель – гель с антителами anti-GAPDH, после удаления anti-*Mtn*.
- стрелками обозначены полосы, соответствующие *Mtn* и GAPDH.



## **Исследование влияния митохондриального пептида Mtlн на окислительный метаболизм мышечной ткани**

### Влияние Mtlн на ожирение мышечной ткани

Поскольку многочисленные литературные источники указывали на участие Mtlн в процессе метаболизма липидов/жирных кислот [4; 6], метаболизм мышечной ткани нокаутных по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta$ Mtlн) и мышечной ткани дикого типа (WT) исследовали в течение 19 недель на фоне содержания в условиях высокожировой диеты (Рисунок 24.А), а в качестве контроля, были выделены соответствующие группы, содержащиеся на стандартном комбикорме (Рисунок 24.Б). В то время как разница между весом мышечной ткани дикого типа и нокаутами на обычном рационе была незначительной, избыточное увеличение веса наблюдалось у группы нокаутных мышечной ткани на диете с высоким содержанием жиров. Количество жировой ткани у мышечной ткани оценивали с помощью магнитно-резонансной томографии, чтобы показать, что увеличенная масса тела у нокаутных мышечной ткани была связана именно с повышенным накоплением жировой ткани (Рисунок 25.А,Б). Надо заметить, что признаки ожирения были отмечены даже у тех нокаутных мышечной ткани, которые питались обычным кормом (Рисунок 25.В). Этот результат согласуется с полученными ранее наблюдениями [4] повышенного накопления триглицеридов в клеточных линиях NIH3Т3 и NS0 с нокаутным геном *1500011k16Rik* и аналогичными наблюдениями Фризена и его сотрудников на адипоцитах [6].

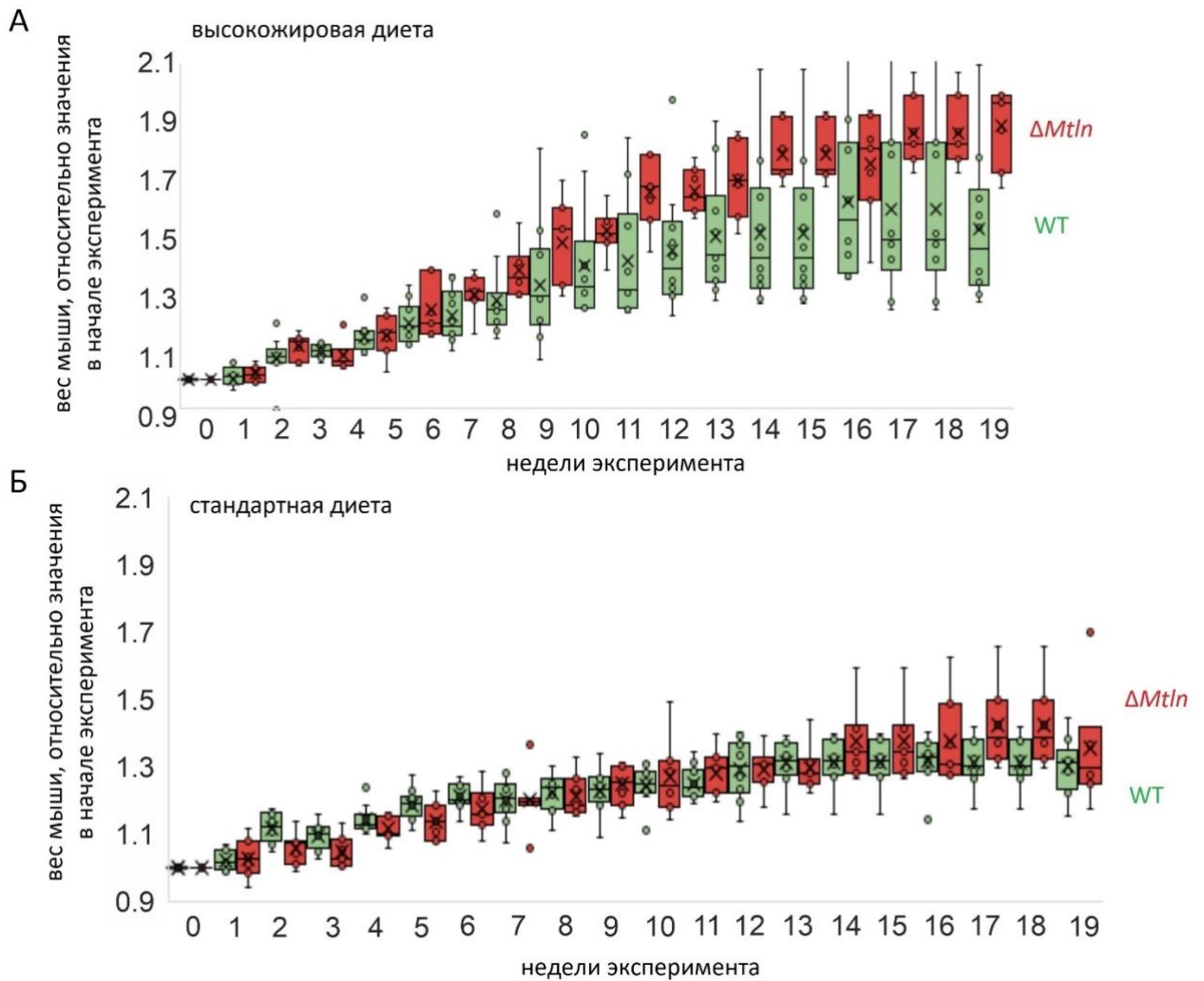


Рисунок 24. Влияние Mtn на весовую динамику самок мышей в течение 19 недель наблюдения. А: Ежедневная прибавка массы тела относительно массы тела в начале эксперимента самок мышей, содержащихся на высокожировой диете.

Б: Ежедневная прибавка массы тела относительно массы тела в начале эксперимента самок мышей, содержащихся на стандартной диете.

- зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10.
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ), n=7.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.



### Влияние Mtlн на концентрацию метаболитов в сыворотке крови мышей

Некоторые исследователи полагали, что Mtlн способствует окислению жирных кислот посредством его взаимодействия с субъединицами HADHA и HADHB митохондриального трифункционального белка, ответственного за окисление жирных кислот [7; 6]. Патологические мутации в компонентах системы окисления жирных кислот могут быть диагностированы путем оценки уровня сывороточных ацилкарнитинов [613], как при мутации HADHA (LCHAD), приводящей к повышению уровня ацилкарнитина C14OH, C16OH, C18:1OH в сыворотке крови в 3-30 раз [614]. Основываясь на этих данных, в текущем исследовании были проанализированы уровни ацилкарнитинов (Рисунок 26.) и свободных жирных кислот (Рисунок 27.) в сыворотке крови мышей дикого типа и нокаутов по гену *1500011k16Rik*, содержащихся на обычном и высокожировом комбикормах. В крови нокаутных мышей, получавших обычный корм, наблюдалось умеренное, хотя и статистически значимое повышение соотношения ацилкарнитинов C3/C0, C3/C2, C8/C10 и уровня сукцинилацетонацилкарнитина, характерное для пропионовой ацидемии [615], специфической MCAD недостаточности [616] и тирозинемии (II синдром Рихнера-Ханхарта) [617]. Хотя и повышенные, но значения этих маркеров намного ниже, чем те, что обычно ассоциируются с патологическим состоянием. Анализ уровня свободных жирных кислот (Рисунок 27.) в сыворотке крови нокаутных мышей, получавших обычный корм, выявил заметное снижение количества насыщенных C16:0, C18:0 и C20:0, сопровождающееся увеличением уровня полиненасыщенной докозагексаеновой (C22:6) кислоты (DHA). Результаты на фоне высокожировой диеты, не демонстрируют такой зависимости от Mtlн, возможно, из-за повышенной диетической компенсации дисбаланса жирных кислот.

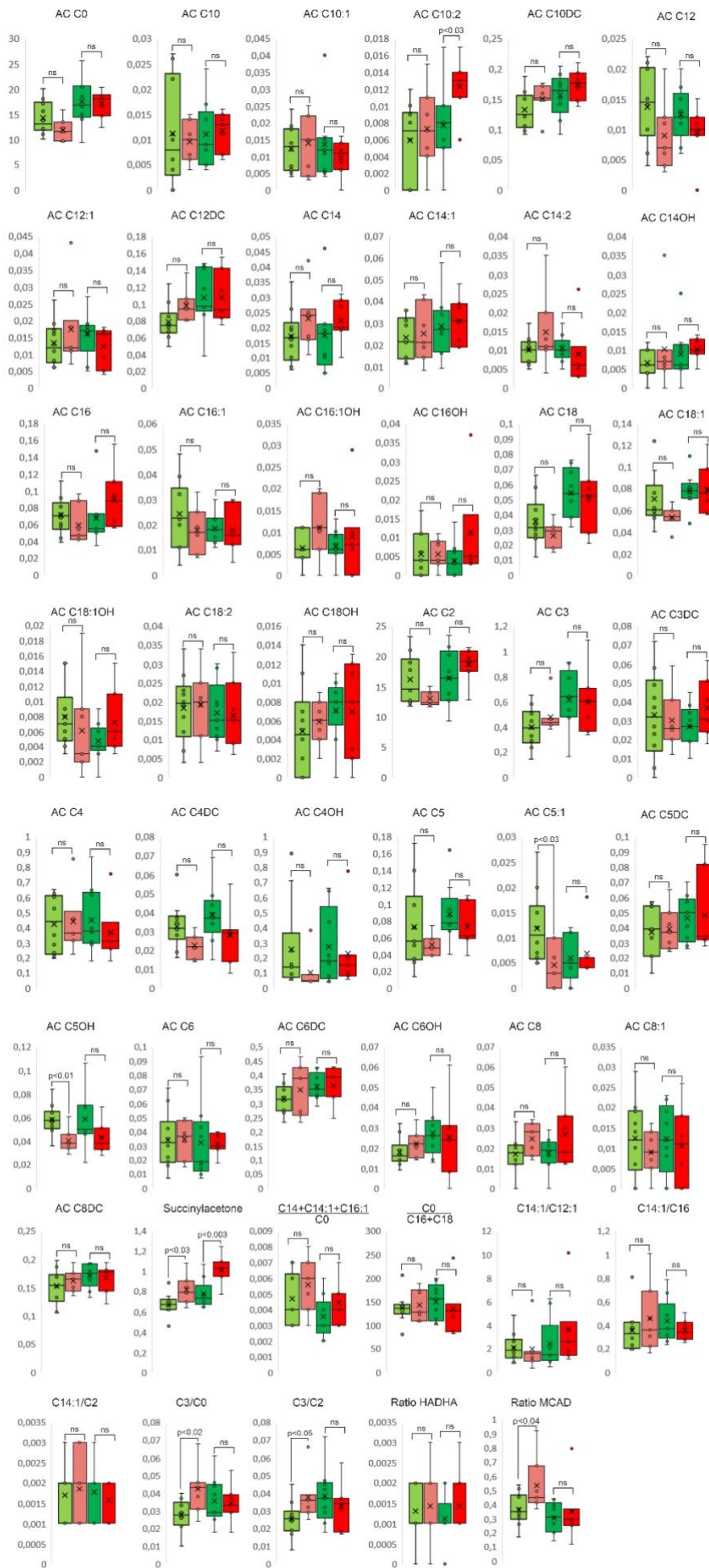


Рисунок 26. Уровень ацилкарнитинов в сыворотке крови самок мышей

- бледно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, стандартна диета.
- темно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, высокожировая диета.
- бледно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl$ ), n=7, стандартна диета.
- темно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl$ ), n=7, высокожировая диета.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

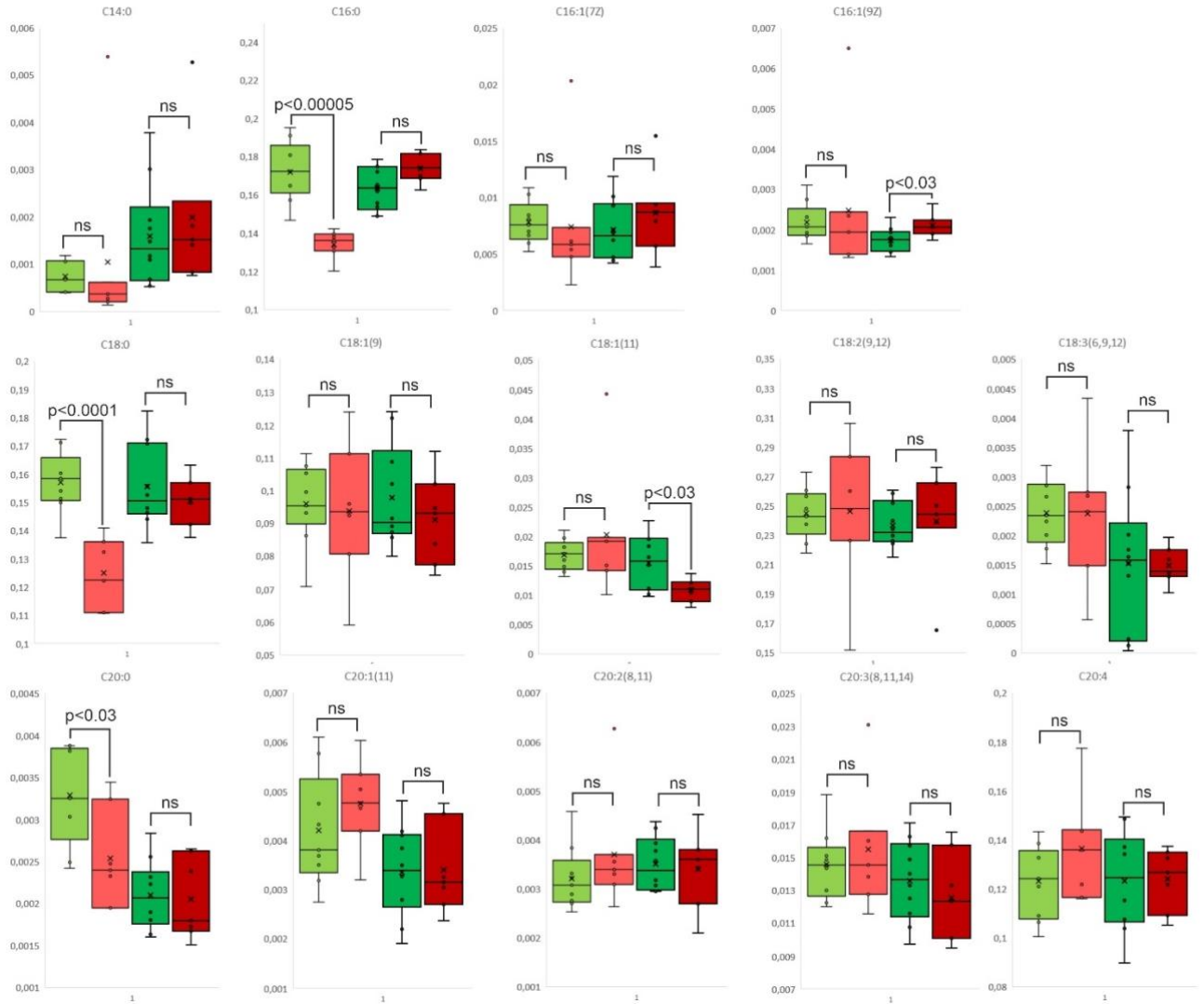


Рисунок 27. (часть 1) Уровень свободных жирных кислот в сыворотке крови самок мышей

- бледно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, стандартна диета.
- темно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, высокожировая диета.
- бледно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl n$ ), n=7, стандартна диета.
- темно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl n$ ), n=7, высокожировая диета.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

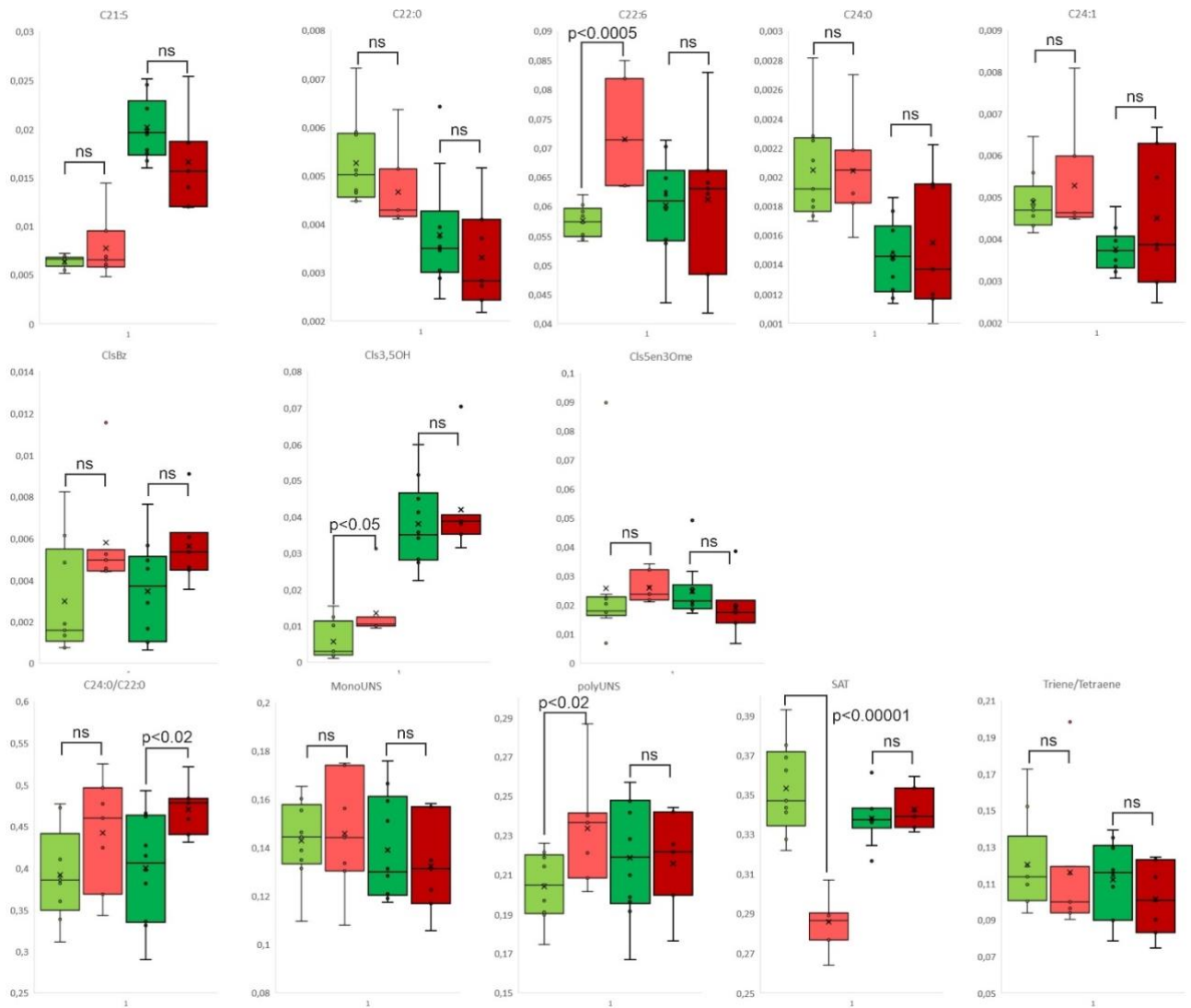


Рисунок 27. (часть 2) Уровень свободных жирных кислот в сыворотке крови самок мышей

- бледно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, стандартна диета.
- темно зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=10, высокожировая диета.
- бледно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtln$ ), n=7, стандартна диета.
- темно красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtln$ ), n=7, высокожировая диета.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

Для дальнейшей оценки метаболических изменений, вызванных инактивацией *Mtln*, в сыворотке крови был произведен анализ уровня лактата, триглицеридов, глюкозы и холестерина (Рисунок 28.). Выявлено, что у нокаутных мышей существенно повышены уровни лактата и триглицеридов, но не глюкозы и холестерина.

Учитывая наблюдаемое влияние нокаута гена *1500011k16Rik* на концентрацию нескольких ключевых метаболитов, было проведено метаболическое профилирование на основе ядерного магнитного резонанса, чтобы оценить влияние *Mtln* на метаболические пути. С этой целью были проанализированы образцы сыворотки крови мышей дикого типа и нокаутов (Рисунок 29.), а наблюдаемые изменения были нанесены на схему энергетического метаболизма мышей (Рисунок 30.). Концентрация ряда метаболитов существенно изменилась при инактивации *Mtln* в сыворотке самцов, но не самок мышей. Анализ показал истощение ряда промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, свидетельствующее о дефиците анаплеротических реакций с одновременным повышением концентрации ряда субстратов, подвергающихся окислению в митохондриях.

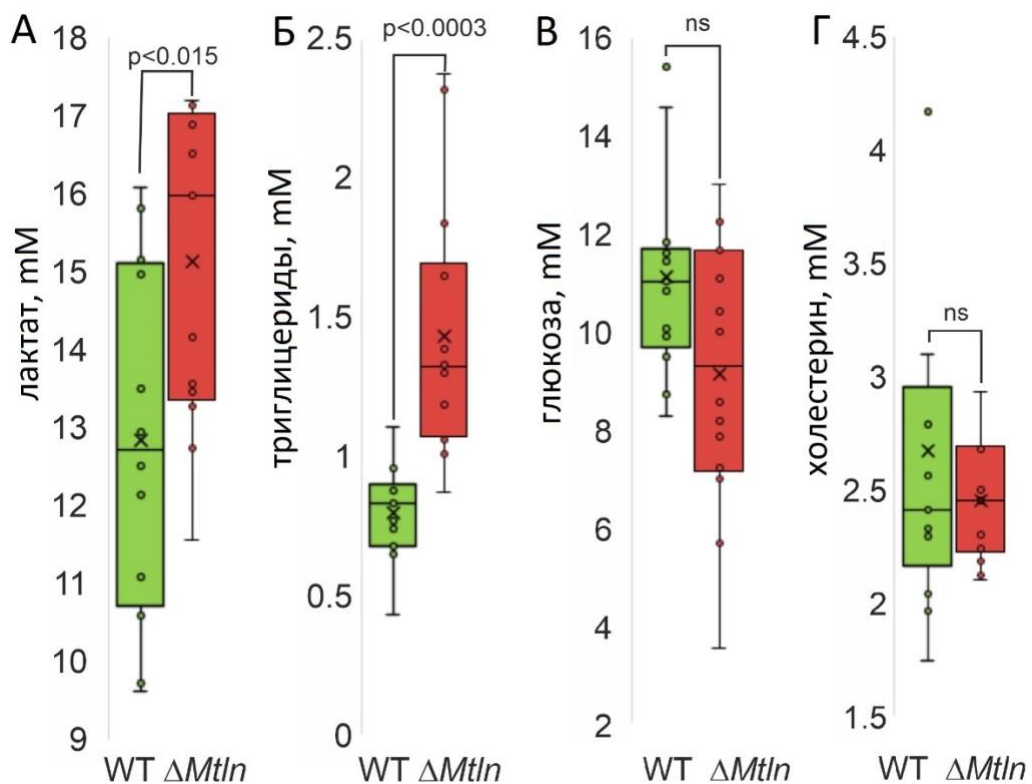


Рисунок 28. Биохимия крови самцов мышей. Уровень (mM) сывороточного А: лактата, Б: триглицеридов, В: глюкозы, Г: холестерина

- зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=12.
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtln$ ), n=13.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.



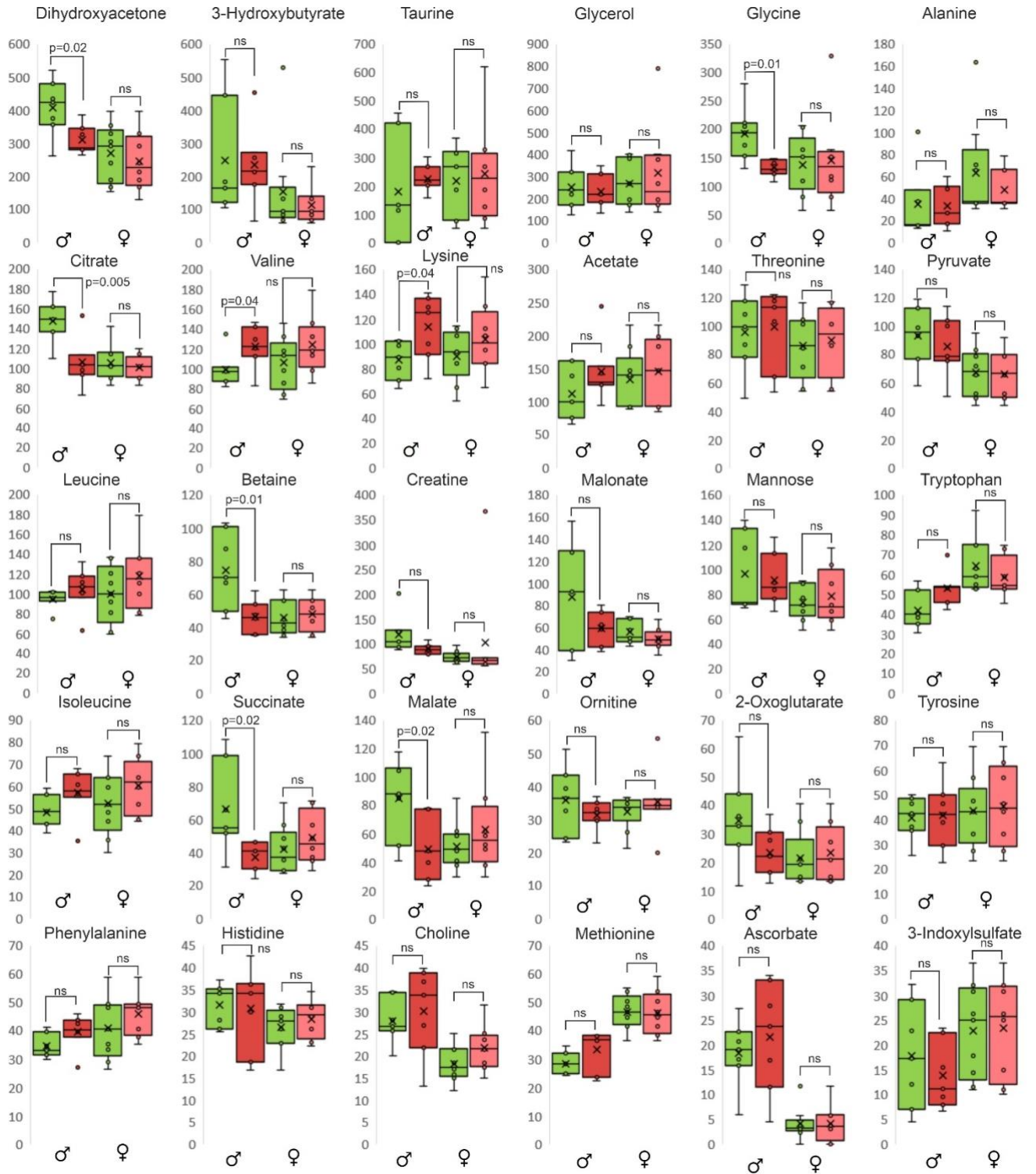


Рисунок 29. Уровень метаболитов ( $\mu\text{M}$ ) в сыворотке крови мышей. Анализ проведен с помощью ЯМР.

Левые столбцы – самцы мышей ( $\sigma$ ):

- зеленые столбцы – дикий тип (WT),  $n=7$ .
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl$ ),  $n=7$ .

Правые столбцы – самки мышей ( $\text{♀}$ ):

- зеленые столбцы – дикий тип (WT),  $n=9$ .
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtl$ ),  $n=8$ .

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

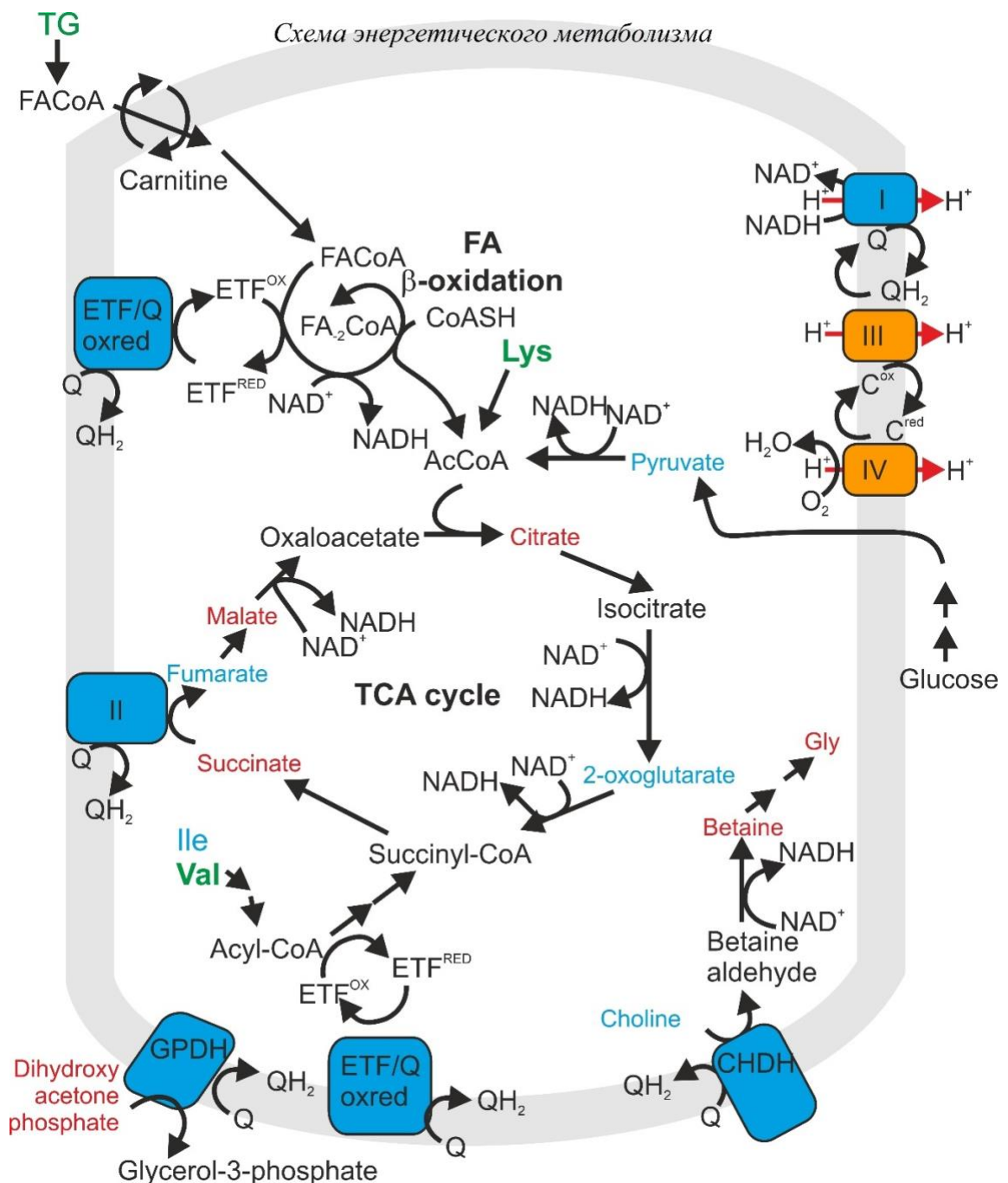


Рисунок 30. Схема энергетического метаболизма. Зеленым показаны метаболиты, концентрация которых увеличилась, а красным – уменьшилась при инактивации гена *1500011k16Rik*.

## Исследование функциональной роли Mtn в скелетных мышцах

### Мышечная сила $\Delta Mtn$ мышей

Ранее была показана возможная роль белка Mtn, кодируемого ядерным геном *1500011k16Rik*, в формировании и функционировании мышечной ткани [8; 7; 5; 9]. Для оценки мышечной активности, было произведено тестирование силы захвата лап мышей с нокаутом по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ) и дикого типа (WT) на фоне 24-часовой пищевой депривации (Рисунок 31.). В результате  $\Delta Mtn$  мыши продемонстрировали снижение мышечной силы, что согласуется с ранее опубликованными данными [5; 9]. В развитии полученных данных была произведена оценка работоспособности выделенных гликолитической передней большеберцовой (*tibialis anterior*), оксидативной камбаловидной (*soleus*) и смешанной икроножной (*gastrocnemius*) мышц при электростимулированном сокращении *ex vivo*. Отбор образцов был произведен у мышей дикого типа и нокаутов по гену *1500011k16Rik* на фоне 24-часовой пищевой депривации. Однако не было продемонстрировано статистически значимого снижения электростимулированной мышечной силы (Рисунок 31.).

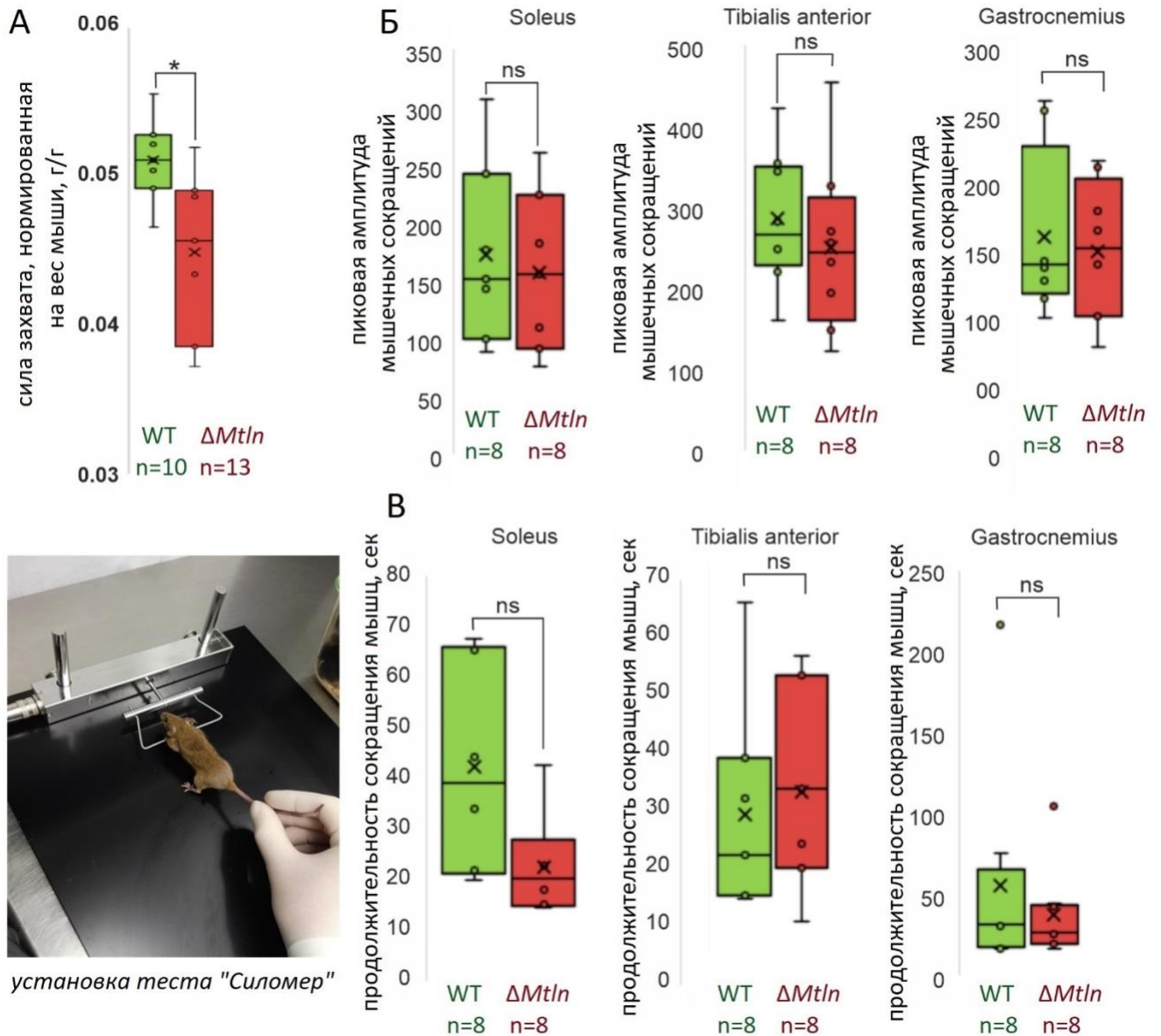


Рисунок 31. Мышечная сила мышей.

- зеленые столбцы – дикий тип (WT).
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ).

*А*: максимальная сила захвата передних конечностей, нормированная на вес мыши.

*Б*: пиковая амплитуда сокращения изолированных мышц при электростимуляции *ex vivo*.

*В*: продолжительность сокращения изолированных мышц при электростимуляции *ex vivo*.

Типы мышц: soleus (камбаловидная-оксидативная), tibialis anterior (передняя большеберцовая-гликолитическая), gastrocnemius (икроножная-смешанная)

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости «\*», рассчитанный по критерию Стьюдента.

### Гистопатологический анализ мышц $\Delta Mtl$ мышей

Мышцы расходятся в своих предпочтениях в отношении того или иного источника энергии. Поскольку было показано, что как оксидативные (камбаловидная, *Sol*), так и гликолитические (передняя большеберцовая, *TA*) мышцы содержат пептид *Mtl*n (*Рисунок 23.*), был произведен детальный анализ обеих мышц. Гистологический анализ камбаловидной мышцы (*Рисунок 32.А*) и передней большеберцовой мышцы (*Рисунок 32.Б*) мышцей дикого типа (WT) и нокауты по гену 1500011k16Rik ( $\Delta Mtl$ n) не выявил различий в диаметре миофибрилл (*Рисунок 32.В*). По показателям ремоделирования мышц, представленного долей миофибрилл с ядерной цепью в центре, наблюдается, хотя не достоверная, но тенденция к увеличению у нокаутных мышцей (*Рисунок 32.Г*). Для выявления миофибрилл с признаками митохондриальных аномалий, усугубленных инактивацией *Mtl*n, нефиксированные срезы камбаловидной и передней большеберцовой мышцей были окрашены трихромом по Гомори (*Рисунок 32.Д*). Несмотря на то, что с помощью этого подхода у  $\Delta Mtl$ n мышцей не было обнаружено значительного повреждения мышечных митохондрий, нельзя исключать, что более тонкие различия могут быть обнаружены с помощью электронной микроскопии в будущих исследованиях.

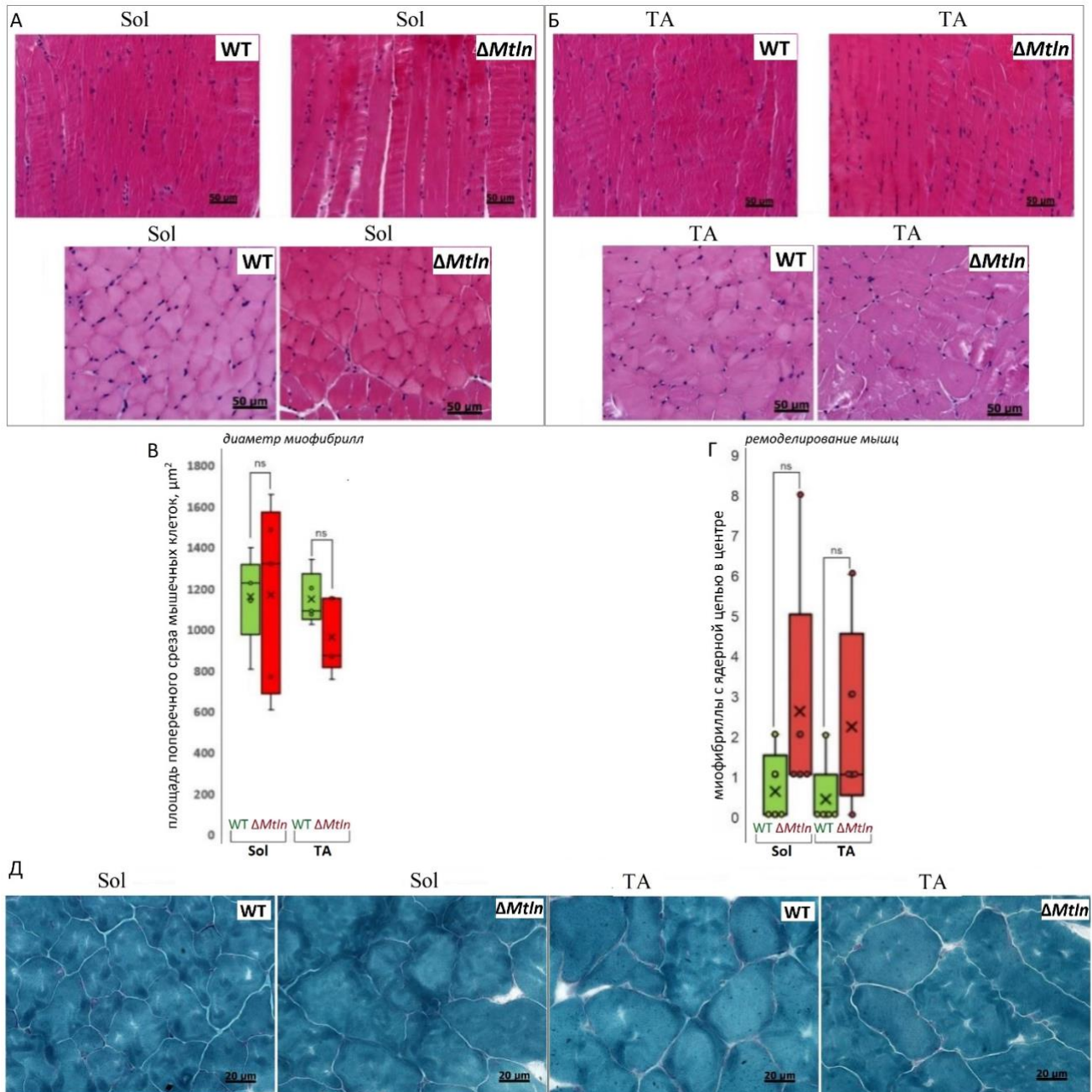


Рисунок 32. Гистопатологический анализ мышц образцов камбаловидной (Sol) и передней большеберцовой (TA) мышц мышей дикого типа (WT) и нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ).

Окрашивание гематоксилином/эозином образцов (А) камбаловидной и (Б) передней большеберцовой мышц.

В: Количественное определение площади поперечного среза клеток (n=50 клеток на мышь) мышц Sol и TA.

Г: Количественное определение мышечных волокон с ядерной цепью в центре (n = 150 клеток на мышь) для мышц Sol и TA.

- зеленые столбцы – дикий тип (WT), n=5.
- красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ), n=5.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

Д: Выявление миофибрилл с признаками митохондриальных аномалий с помощью окрашивания трихромом по Гомори нефиксированных срезов мышц Sol и TA.

### Дыхание мышечных митохондрий $\Delta Mtl_n$ мышей

Ранее было показано, что нокаут по гену *1500011k16Rik* в клеточных линиях и мышечных моделях влияет на митохондриальное дыхание. Однако информация неоднозначна в отношении того, для каких именно используемых субстратов митохондриального дыхания критично отсутствие *Mtl\_n* [4; 6; 5; 7; 8]. Для разрешения этого вопроса, в рамках исследования мышц  $\Delta Mtl_n$  мышей, митохондрии были выделены из оксидативных (камбаловидная) и гликолитических (передняя большеберцовая) мышц. Эффективность митохондриального дыхания оценивалась с использованием субстратов пальмитоилкарнитина (активность CI + CII + ETF), пирувата/малата (активность CI), глутамата/малата (активность CI) и сукцината (активность CII). Следующие условия были использованы для оценки эффективности дыхания на каждом из вышеупомянутых субстратов:

- отдельно субстрат,
- субстрат и ингибитор комплекса I - ротенон,
- субстрат с добавлением избытка АДФ – состояние 3,
- субстрат после истощения добавленного АДФ – состояние 4,
- субстрат после истощения добавленного АДФ с ингибированием АТФ-синтазы олигомицином – состояние 4о,
- субстрат после истощения добавленного АДФ и добавлением избытка креатина, т.е. когда регенерация АДФ зависит от активности митохондриальной креатинкиназы,
- субстрат после истощения добавленного АДФ с ингибированием АТФ-синтазы олигомицином и добавлением разобщителя FCCP – состояние 3и,
- субстрат после истощения добавленного АДФ с ингибированием АТФ-синтазы олигомицином и добавлением разобщителя FCCP и ингибированием комплекса IV цианидом калия – остаточное потребление кислорода.

Результаты анализа скорости дыхания выделенных митохондрий показали, что не стимулированное дыхание продемонстрировало незначительные различия только на пальмитоил-карнитине (Рисунок 33). Митохондриальное дыхание в состоянии 3 и 3и продемонстрировало значительную разницу между мышцами дикого типа и нокаутами по гену *1500011k16Rik* для обоих типов мышц и всех субстратов комплекса I (Рисунок 33). Дыхание на сукцинате, субстрате комплекса II, в равной степени стимулируется АДФ и FCCP в митохондриях мышц дикого типа и  $\Delta Mtl_n$  (Рисунок 33), что согласуется с более ранним исследованием клеточных линий с нокаутом гена *1500011k16Rik* [4].

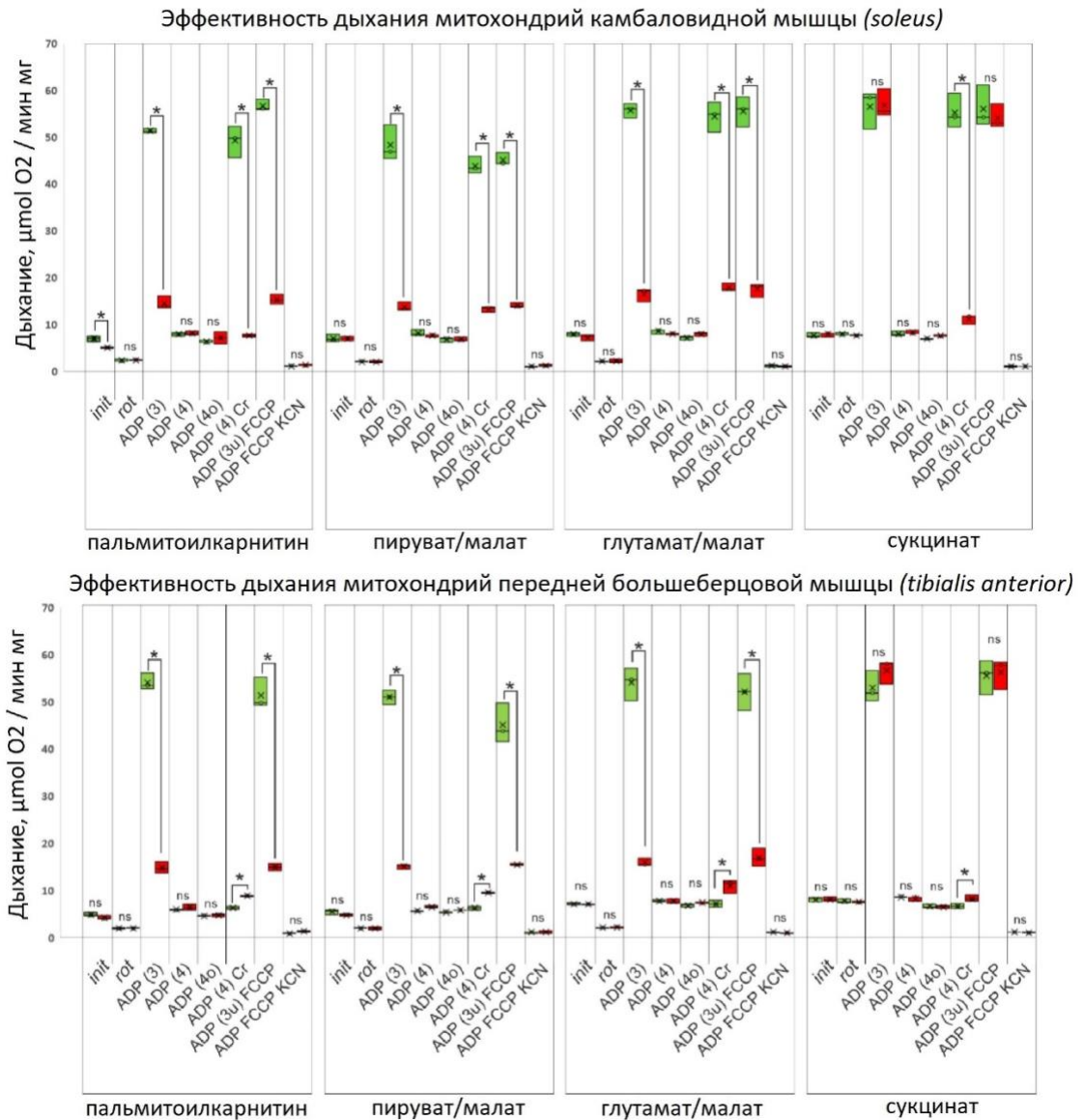


Рисунок 33. Дыхание мышечных митохондрий мышей.

зеленые столбцы – дикий тип, WT (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).  
красные столбцы – нокауты,  $\Delta Mitn$  (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).

Группы столбцов соответствуют дыханию на пальмитоилкарнитине (активность CI + CII + ETF), пируват/малате (активность CI), глутамат/малате (активность CI) и сукцинате (активность CII).

Измеряемыми экспериментальными точками являются:

- отдельно окисляемый субстрат - *init*
- *init* + ротенон (ингибитор комплекса I) - *rot*
- *init* + АДФ (состояние 3) -  $ADP_{(3)}$
- *init* после истощения добавленного АДФ (состояние 4) -  $ADP_{(4)}$
- *init* + ингибитор АТФ-синтазы, олигомицин (состояние 4о) -  $ADP_{(4o)}$ ,
- *init* + креатин (регенерация АДФ зависит от состояния креатинкиназы) -  $ADP_{(4)Cr}$
- *init* + олигомицин + разобщитель FCCP (состояние 3u) -  $ADP_{(3u)FCCP}$
- *init* + олигомицин + разобщитель FCCP + цианид (ингибитор комплекса IV) -  $ADP FCCP KCN$

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости «\*», рассчитанный по критерию Стьюдента.



### Влияние Mtlн на функционирование креатинового челнока в мышцах

Скелетные мышцы используют Кр/КрФ челнок (креатин/креатинфосфат) для облегчения диффузии богатых энергией соединений из митохондрий в области их потребления (АТФаза миозина и АТФ-зависимые ионные помпы плазмалеммы). Для этого АТФ, вырабатываемый митохондриями при аэробном окислении субстратов, используется для производства КрФ из Кр. Эта реакция ( $\text{АТФ} + \text{Кр} \leftrightarrow \text{АДФ} + \text{КрФ}$ ) катализируется митохондриальной креатинкиназой (mtСК) — ферментом, расположенным в митохондриальном межмембранном пространстве и состоящим из двух (mtСК2) или восьми (mtСК8) идентичных субъединиц. С помощью цитозольных креатинкиназ ВВ и М типа в местах расхода энергии происходит обратная реакция, превращающая КрФ в Кр, сопряженная с синтезом АТФ из АДФ и возвращением креатина в митохондрии.

Выше представлен анализ эффективности дыхания мышечных митохондрий в сочетании с фосфорилированием креатина (*Рисунок 33. ADP(4)Cr*). Митохондрии гликолитических (передняя большеберцовая) мышц не демонстрируют связи активности дыхания с креатиновым челноком как у мышей дикого типа (WT), так и у нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtlн$ ). Напротив, эффективность дыхания митохондрий оксидативных (камбаловидная, *Sol*) мышц значительно падает на субстратах Комплекса I (пальмитоил-карнитин, пируват/малат и глутамат/малат) у нокаутных мышей по сравнению с диким типом (*Рисунок 33.*), что может быть объяснено снижением активности Комплекса I при инактивации Mtlн. Тем не менее, для митохондрий оксидативных мышц  $\Delta Mtlн$  животных снижение митохондриального дыхания наблюдалось и на субстрате комплекса II (сукцинат) при фосфорилировании креатина, но не в присутствии FCCP (состояние 3u) или АДФ (состояние 3) (*Рисунок 33.*). В связи с этим, можно заключить, что митохондриальный креатиновый челнок в оксидативных мышцах зависит от функциональности Mtlн.

Этот результат побудил на следующем этапе оценить олигомерное состояние и активность mtСК в мышцах нокаутных и животных дикого типа. Анализ показал значительное снижение соотношения октамерной к димерной форм mtСК при инактивации Mtlн как для оксидативных, так и для гликолитических мышц относительно дикого типа (*Рисунок 34. А, Б*). Однако анализ активности креатинкиназы в оксидативной и гликолитической  $\Delta Mtlн$  мышцах показал разнонаправленный эффект. Было выявлено значительное снижение активности mtСК оксидативной мышцы при инактивации Mtlн на фоне увеличения активности цитозольной изоформы креатинкиназы (*Рисунок 34. В*), что может представлять собой компенсаторный ответ. Напротив, в гликолитической мышце при инактивации Mtlн наблюдалось увеличение активности mtСК. Проведенный с помощью иммуноблоттинга количественный анализ mtСК в

передней большеберцовой мышце позволил предположить, что повышенная активность mtCK может быть связана с непосредственным увеличением её количества в  $\Delta Mtl$  мышце (*tibialis anterior*) (Рисунок 34.Г) или с различием в основной изоформе mtCK. [618] Согласно опубликованным данным [619], гликолитические мышцы содержат более широко распространенные umtCK, чем саркомерные smtCK, которые различаются по своим свойствам, таким как, например, связывание кардиолипина (CL) [620]. Количественный анализ mtCK в камбаловидной мышце  $\Delta Mtl$  мышцей согласуется с данными по активности и выявил умеренное, в примерно 1,5 раза, снижение количества mtCK в камбаловидных мышцах при инактивации Mtl (Рисунок 34.Г). Таким образом, и снижение количества mtCK и уменьшение октамеризации mtCK, вероятно, приводит к разрушению и инактивации локального компартмента конверсии свободной энергии АТФ с участием креатинового челнока. Причины, способствующие снижению эффективности метаболического компартмента mtCK, что приводит к энергодефициту в мышцах оксидативного типа при инактивации Mtl и состоянию мышечной дисфункции рассмотрены ниже [621].

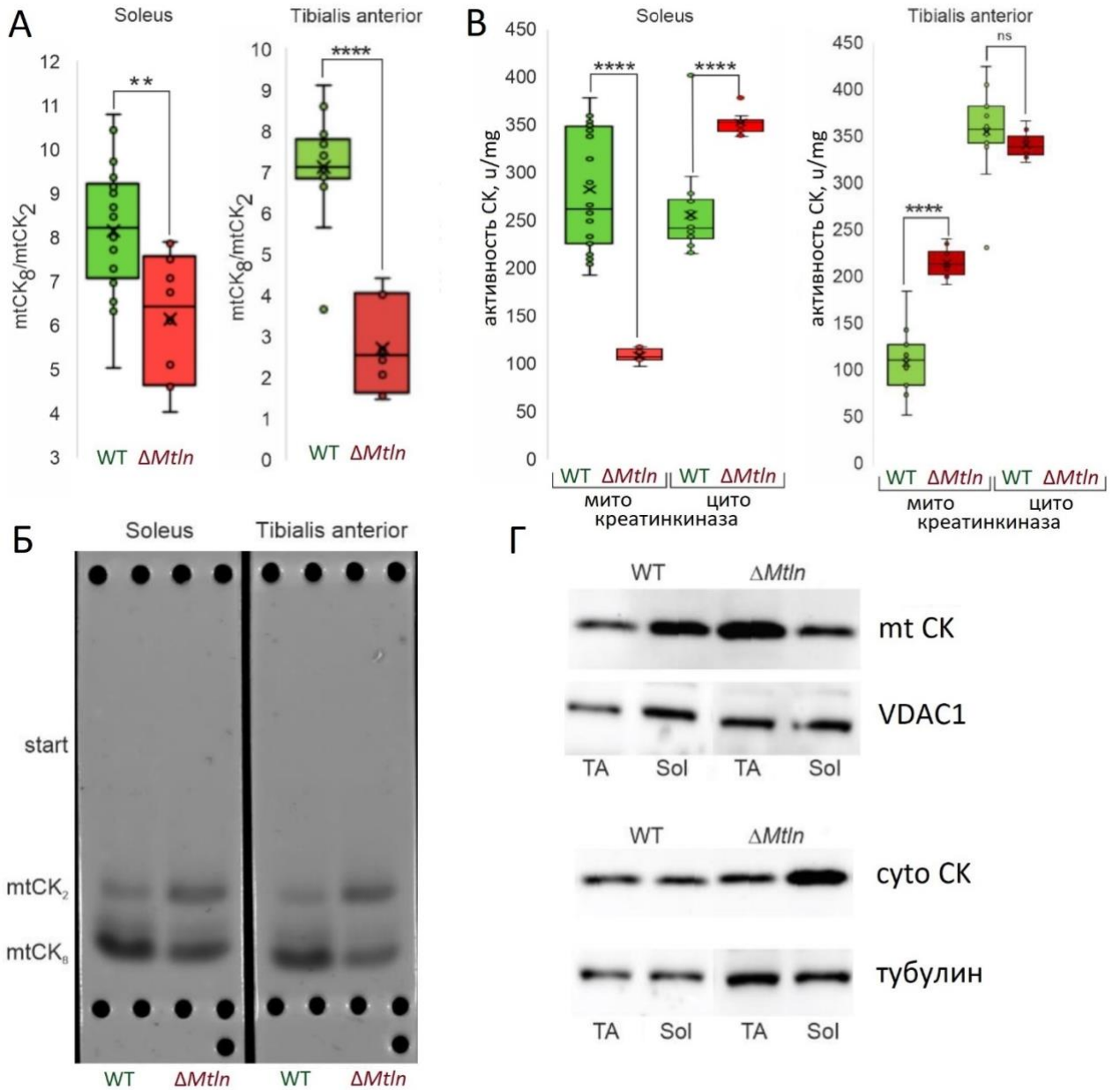


Рисунок 34. Функционирование креатинкиназы (СК) в митохондриальных экстрактах гликолитической передней большеберцовой (tibialis anterior) и оксидативной камбаловидной (soleus) мышц.

*А:* Отношение содержания октамерной (mtCK<sub>8</sub>) и димерной форм (mtCK<sub>2</sub>) митохондриальной креатинкиназы (mtCK).

*В:* Митохондриальная (*мито*) и цитозольная (*цито*) активность СК.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 18$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtn$ ),  $n = 10$  самцов мышей.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента:

\*\* - значение  $p < 0,01$

\*\*\*\* - значение  $p < 10^{-4}$

*Б:* Обнаружение октамерной (mtCK<sub>8</sub>) и димерной (mtCK<sub>2</sub>) форм mtCK методом электрофореза на полиацетатцеллюлозной мембране при ферментативном окрашивании креатинкиназы.

*Г:* Репрезентативное количественное определение митохондриальной и цитозольной СК с помощью иммуноблоттинга, где в качестве контроля было произведено окрашивание на VDAC1

и

тубулин.

### Влияние Mtlн на стабильность и содержание кардиолипина

Известно, что влияние Mtlн на дыхательный комплекс I носит косвенный характер и, вероятно, опосредовано модуляцией состава липидов [4]. Кардиолипин является наиболее специфическим липидом внутренней мембраны митохондрий, необходимым для поддержания структуры крист, а также для оптимального функционирования ферментативных комплексов, встроенных и связанных с внутренней мембраной митохондрий, включая комплексы I, III, IV и АТФ-азу [622; 623]. Более того, ранее было продемонстрировано прямое взаимодействие Mtlн с кардиолипином и влияние этого взаимодействия на стабильность комплексов дыхательной цепи [8]. Известно, что кардиолипин также взаимодействует с митохондриальной креатинкиназой и способствует образованию гомооктамерного комплекса mtСК из гомодимеров mtСК [624], что более характерно для оксидативных мышц [620]. Основываясь на данной информации, был проведен анализ влияния инактивации Mtlн на содержание кардиолипина в митохондриях, выделенных из оксидативных (камбаловидная) и гликолитических (передняя большеберцовая) мышц мышей нокауты по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtlн$ ) и в качестве контроля, мышей дикого типа (WT). Результаты анализа продемонстрировали достоверное значимое снижение кардиолипина в митохондриях и оксидативных и гликолитических мышц  $\Delta Mtlн$  мышей (Рисунок 35.А,В).

Как известно, основной причиной истощения этого липида при старении или наследственных патологиях (синдром Барра) является преобладание его окислительного повреждения над ремоделированием [625]. Ранее было обнаружено, что инактивация гена Mtlн увеличивает продукцию АФК [8]. Поскольку основной путь восстановления CL проходит через удаление поврежденных жирных кислот из основного метаболита монолизокардиолипина (MLCL) [625] в текущем исследовании был отслежен уровень MLCL в митохондриях оксидативных и гликолитических мышц  $\Delta Mtlн$  и WT мышей. Полученные результаты показали ожидаемое значительное увеличение количества MLCL после инактивации гена *1500011k16Rik* в митохондриях обоих типов мышц (Рисунок 35.Б,В). Наблюдаемый феномен позволяет объяснить структурно-функциональные изменения октамера митохондриальной креатинкиназы и локального метаболического компартмента креатинового челнока в мышцах мышей при инактивации гена Mtlн, приводящие к формированию фенотипа мягкой саркопении.

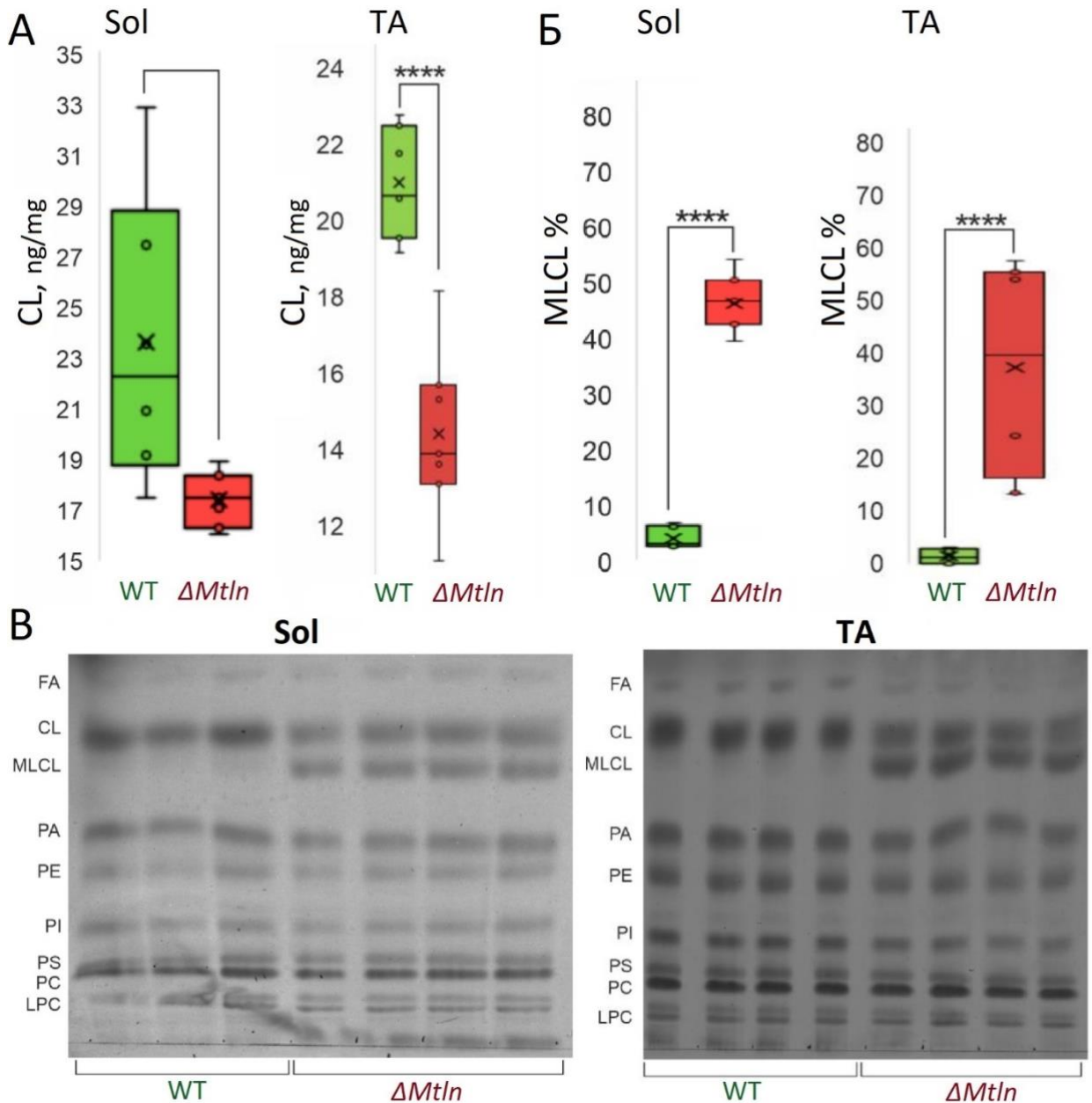


Рисунок 35. Влияние инактивации *Mtlm* на количество и целостность кардиолипина (CL) в митохондриальных экстрактах гликолитической передней большеберцовой (TA) и оксидативной камбаловидной (Sol) мышц.

**A:** Количественное определение уровня CL в митохондриях мышц Sol и TA.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 6$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtlm$ ),  $n = 7$  самцов мышей.

**B:** Количественное определение уровня монолизокардиолипина (MLCL) по отношению к общему количеству CL и MLCL (MLCL+CL) в митохондриях мышц Sol и TA.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 7$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtlm$ ),  $n = 8$  самцов мышей.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, \*\*\*\* - значение  $p < 10^{-4}$ , рассчитанный по критерию Стьюдента.

**B:** Тонкослойная хроматография липидов митохондрий Sol и TA: жирные кислоты (FA), кардиолипин (CL), монолизокардиолипин (MLCL), фосфатидная кислота (PA), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилхолин (PC), лизофосфатидилхолин (LPC).

## Исследование влияния митохондриального пептида Mtlн на функцию почек мышей

### Изменения морфологии почек при инактивации Mtlн

Первичным наблюдением патологического состояния у мышей нокаутных по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtlн$ ), кодирующего митохондриальный белок Mtlн, были возрастные фенотипические изменения, которые наступали значительно раньше и проявлялись ярче, чем у мышей дикого типа (WT). Было отмечено сокращение продолжительности жизни нокаутов по сравнению с мышами дикого типа. К 18-месячному возрасту нокаутные самцы проявляли признаками неподвижности, лежачего положения, жесткой шерсти, сгорбленной позы, слабой реакции на внешние раздражители. Результаты некропсии животных с патологическим фенотипом, и последующий гистологический анализ, показал летальное нарушения функции почек (*Рисунок 36.*).

После обнаружения патологических изменений почек у мышей с выраженным болезненным фенотипом, был произведен гистологический анализ органов всех мышей, вне зависимости от фенотипа, возрастом 12 месяцев (14 особей дикого типа и 9  $\Delta Mtlн$ ). Кроме почек анализу были подвержены так же селезенка, сердце, печень, скелетная мышца и абдоминальный жир (*Рисунок 36.*). Для большинства органов  $\Delta Mtlн$  значительных патологических различий относительно WT обнаружено не было, хотя для скелетных мышц было выявлено развитие дисфункции, ассоциированной с разрушением метаболического компартмента, на молекулярном уровне проявляющее в изменении содержания критически важного липида митохондрий - кардиолипина. Напротив, для почек большинства проанализированных  $\Delta Mtlн$  мышей (77,77%) было подтверждено заключение о вакуолярной дегенерации проксимальных канальцев (*Рисунок 37.*), в то время как WT мыши в меньшей степени (28,57%) демонстрировали аналогичную патологию (*Рисунок 36.*). Гистопатологический анализ почек более молодых 6-месячных самцов мышей или старых 24-месячных самок не выявил подобной патологии.

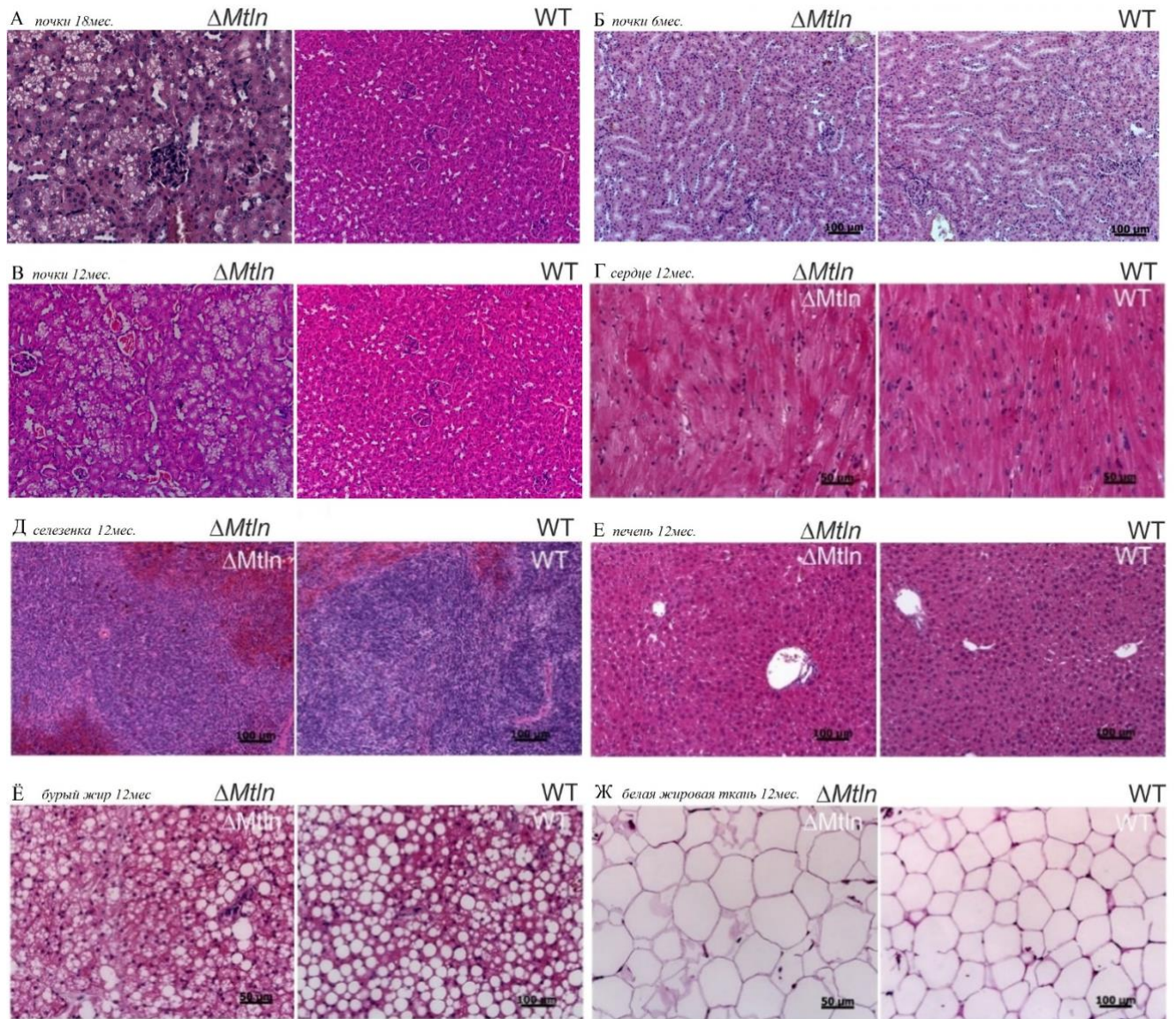


Рисунок 36. Гистопатологический анализ влияния *Mtn* на структуру почек и других органов.

**А:** Окрашивание гематоксилином/эозином образцов почек 18-месячных самцов мышей дикого типа (WT) и нокаутов по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ), демонстрирующих возрастные патологические признаки. Для образцов  $\Delta Mtn$  показана вакуолярная дегенерация проксимальных канальцев по сравнению с WT.

**Б:** Окрашивание гематоксилином/эозином образцов почек 6-месячных самцов мышей дикого типа (WT) и нокаутов по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ). На данном этапе признаков патологии не обнаружено ни для одной из групп образцов.

**В:** Окрашивание гематоксилином/эозином образцов почек 12-месячных самцов мышей дикого типа (WT) и нокаутов по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ ). Для образцов  $\Delta Mtn$  показана вакуолярная дегенерация проксимальных канальцев по сравнению с WT.

**Г-Ж:** Окрашивание гематоксилином/эозином образцов тканей сердца, селезенки, печени, бурового жира и белой жировой ткани 12-месячных мышей. Для образцов  $\Delta Mtn$  значительных патологических различий от WT обнаружено не было.

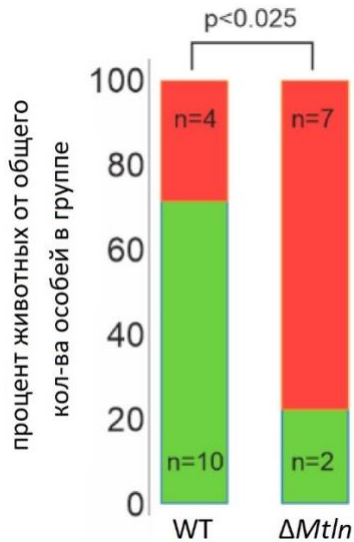


Рисунок 37. Частота проявления дегенерации проксимальных канальцев почек у 12-месячных самцов мышей.

Каждый из столбцов, представляющий животных дикого типа (WT, n=14) или нокаутов ( $\Delta Mtlm$ , n=9) разделен на две зоны:

- *красная зона* – процент животных с вакуолярной дегенерацией проксимальных канальцев, от общего количества особей в группе.
- *зеленая зона* – процент животных без патологии почек, от общего количества особей в группе.

Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

### Дыхание митохондрий почек при инактивации Mtlm

Влияние Mtlm на эффективность дыхания митохондрий неоднократно наблюдали как на клеточных линиях [4; 8; 7; 6], так и в мышечных моделях [8; 7]. Почки относятся к тканям с постоянной высокой метаболической нагрузкой и окислительное фосфорилирование составляет основной источник энергии в этой ткани. В текущем исследовании, по результатам количественного определения мтДНК было показано, что инактивация Mtlm не влияет на количество митохондрий в почках (Рисунок 38.А). Поэтому для оценки влияния Mtlm непосредственно на функцию митохондрий почек были измерены кинетические параметры митохондриального дыхания с использованием пальмитоил-карнитина (активность CI + CII + ETF), пирувата/малата (активность CI), глутамата/малата (активность CI) и сукцината (активность CII) (Рисунок 38.Б). Данный набор веществ был выбран, основываясь на информации о неоднозначной роли Mtlm в дыхании, зависимом от комплекса I на разных субстратах [4; 8; 6; 5].

Полученные результаты свидетельствуют о снижении зависимого от комплекса I дыхания почечных митохондрий на фоне инактивации Mtlm. Разница в функционировании митохондрий почек мышей дикого типа и  $\Delta Mtlm$  была показана для всех субстратов дыхательного комплекса I, в то время как для сукцината, который является субстратом для дыхательного комплекса II, подобный эффект не наблюдается без стимуляции дыхания до максимальных значений в присутствии FCCP. Аналогичным образом, дыхание, стимулированное избытком АДФ и дыхание, не связанное с продукцией АТФ, подавлялось инактивацией Mtlm, что согласуется с более ранними наблюдениями на клеточной культуре  $\Delta Mtlm$  [4] и представленными выше результатами анализа митохондрий мышц (Рисунок 33.).



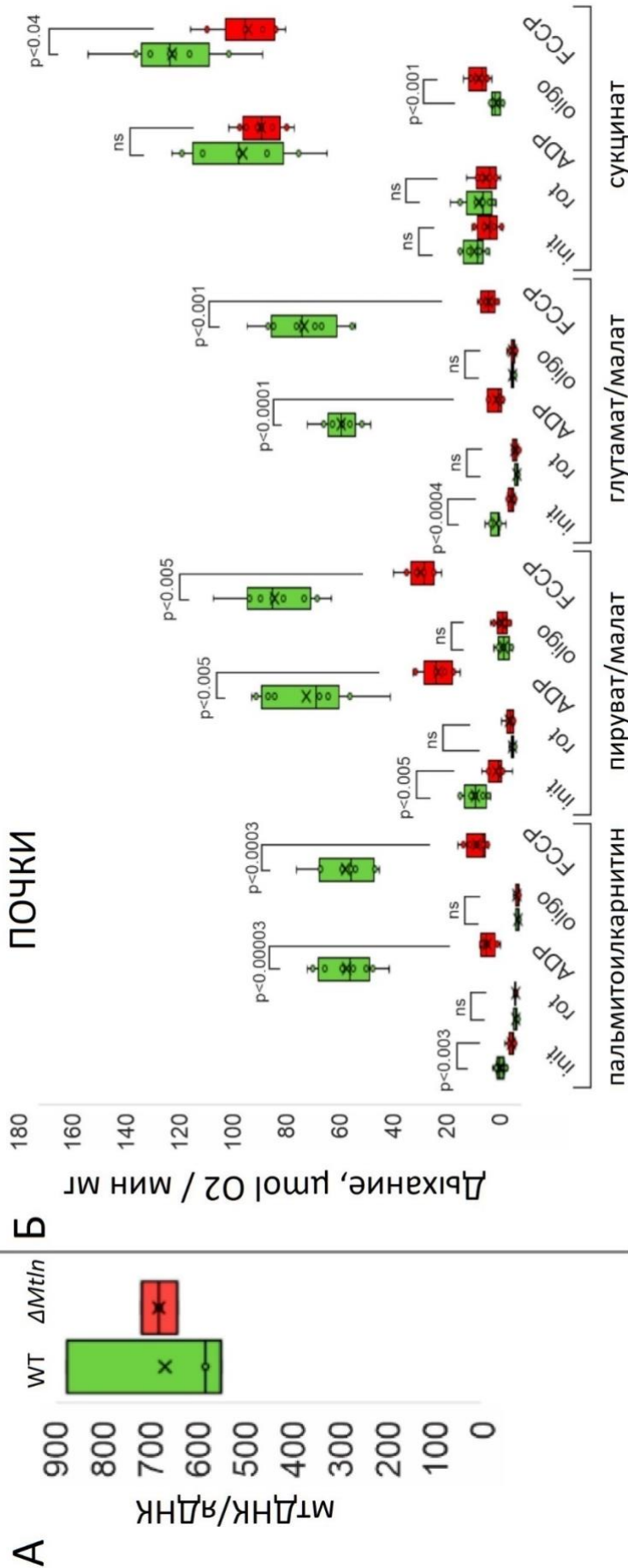


Рисунок 38. Влияние *Mtlm* на эффективность митохондриального дыхания.

**А:** Количество митохондрий по результатам количественной ПЦР мтДНК (ген *mtND1*) по сравнению с яДНК (ген *Ndufv1*):

- зеленые столбцы – дикий тип, WT (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).

- красные столбцы – нокауты,  $\Delta Mtlm$  (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).

**Б:** Скорость потребления кислорода выделенных почечных митохондрий:

- зеленые столбцы – дикий тип, WT (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).

- красные столбцы – нокауты,  $\Delta Mtlm$  (3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей).

Группы столбцов соответствуют дыханию на пальмитоилкарнитине (активность CI + CII + ETF), пируват/малате (активность CI), глутамат/малате (активность CI) и сукцинате (активность CII).

Измеряемыми экспериментальными точками являются: отдельно субстрат (*init*), субстрат с ротеноном (*rot*), субстрат и АДФ (*ADP*), субстрат, АДФ и олигомицин (*oligo*), субстрат и разобщитель FCCP (*FCCP*).

Данные представлены в формате ящичков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

### Повреждение кардиолипина в митохондриях почек при инактивации Mtn

Так как кардиолипин является вездесущим митохондриально-специфическим липидом, присутствующим в органеллах всех тканей и достигающим 20% от всех липидов митохондрий, логично предположить, что на митохондриальный CL почек может повлиять инактивация Mtn подобно эффекту, наблюдаемому на мышцах (*Рисунок 35.*). Для проверки этой гипотезы была проведена количественная оценка уровней CL и монолизокардиолипина в митохондриях почек. В соответствии с наблюдениями для митохондриальных экстрактов гликолитической передней большеберцовой и оксидативной камбаловидной мышц, в митохондриях почек было обнаружено уменьшение количества CL и увеличение доли MLCL (*Рисунок 39.*). Вопрос изменения содержания липидов, являющихся донорами ацильной группы при ремоделинге кардиолипина и других липидов митохондрий нуждается в проведении дальнейших исследований, хотя из представленных данных можно сделать предварительные выводы, что если таковые изменения и имеют место, то они незначительны.

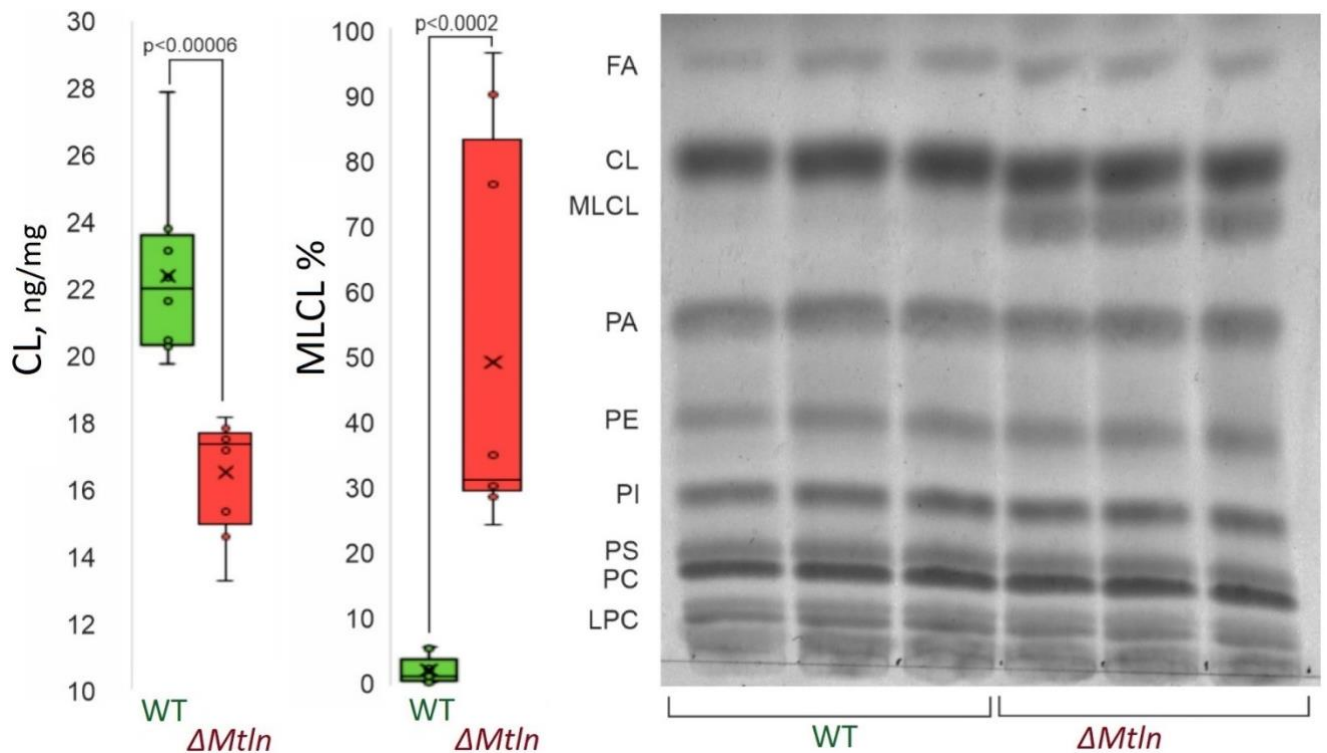


Рисунок 39. Повреждение кардиолипина (CL) в митохондриях почек самцов мышей.

*A:* Количественное определение уровня кардиолипина CL

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 8$ .
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtl_n$ ),  $n = 9$ .

*B:* Количественное определение уровня монолизокардиолипина (MLCL) по отношению к общему количеству CL и монолизокардиолипина (MLCL+CL).

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 9$ .
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtl_n$ ),  $n = 9$ .

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

*B:* Тонкослойная хроматография липидов митохондрий почек: жирные кислоты (FA), кардиолипин (CL), монолизокардиолипин (MLCL), фосфатидная кислота (PA), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидилсерин (PS), фосфатидилхолин (PC), лизофосфатидилхолин (LPC).

Олигомеризация и активность митохондриальной креатинкиназы почек зависят от функциональности Mtl<sub>n</sub>

Основываясь на результатах влияния Mtl<sub>n</sub>, обусловленного вероятно сдвигом соотношения CL\MLCL, на олигомеризацию и активность mtCK в экспериментах с оксидативными (камбаловидная) и гликолитическими (передняя большеберцовая) мышцами, был проведен анализ олигомеризации mtCK (Рисунок 40.А) и оценка её активности (Рисунок 40.Б). Хотя активность креатинового челнока менее важна для почек, стоит заметить, что почки являются тканью, где происходит важнейший этап синтеза креатина и в рамках метаболизма азот-содержащих соединений образование креатинина. В данной работе были получены значимые различия по функционированию креатинкиназы почек между мышами дикого типа (WT) и нокаутами по гену 1500011k16Rik ( $\Delta Mtl_n$ ). Показано ингибирование октамеризации mtCK и снижение активности mtCK в митохондриях почек  $\Delta Mtl_n$  мышей. Анализ дыхания, связанного с регенерацией ADP посредством фосфорилирования Cr (Рисунок 40.В), продемонстрировал общее ингибирование комплекс I – опосредованного дыхания независимо от креатинового челнока, что согласуется с меньшей важностью этого процесса в почках, где, в отличие от мышц – ткани с переменной метаболической нагрузкой, не так важна емкость энергетического буфера, а важна скорость синтеза АТФ, зависящая от интактности основного генератора мембранного потенциала в митохондриях – комплекса I. Снижение содержания кардиолипина, критичного для этого белкового комплекса, вероятно, является причиной энергодефицита и почечной недостаточности при инактивации Mtl<sub>n</sub> (см.ниже).

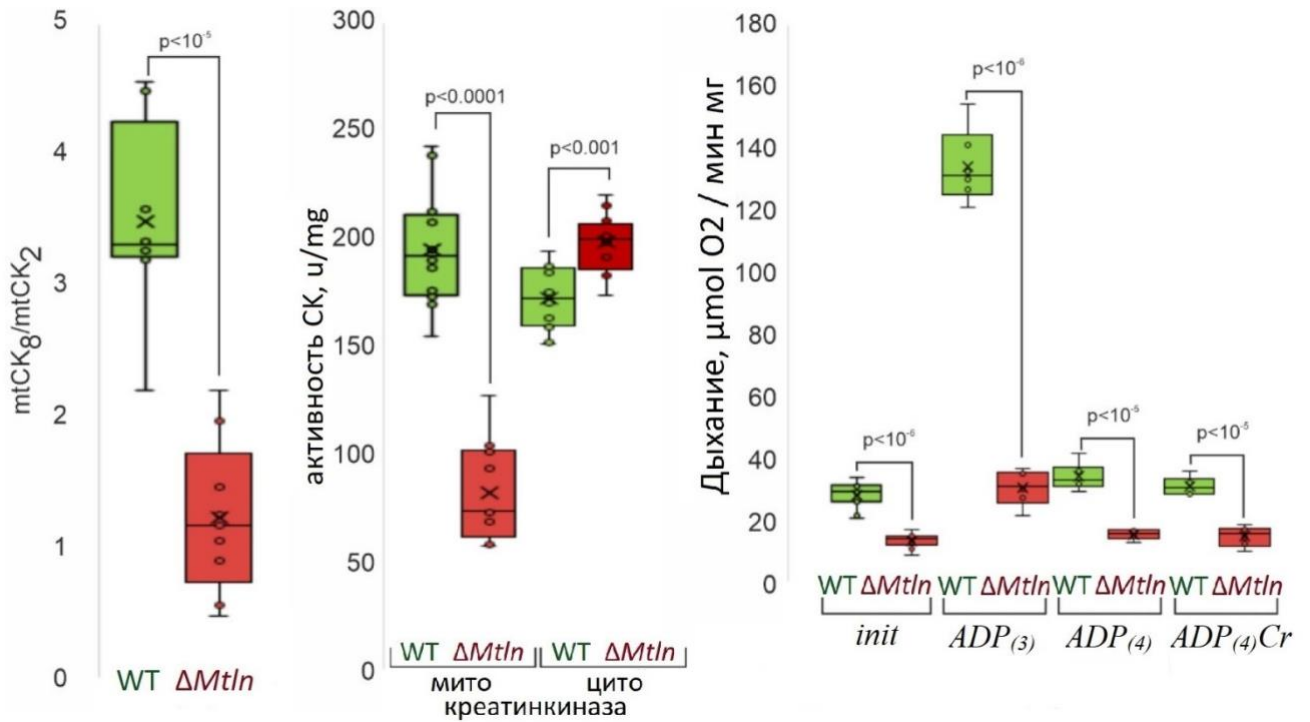


Рисунок 40. Олигомеризация и активность креатинкиназы (СК) почек.

A: отношение содержания октамерной (mtCK<sub>8</sub>) и димерной форм (mtCK<sub>2</sub>) митохондриальной СК.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 8$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtn$ ),  $n = 9$  самцов мышей.

B: Митохондриальная (*мито*) и цитозольная (*цито*) активность СК.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 12$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtn$ ),  $n = 12$  самцов мышей.

B: Дыхание почечных митохондрий мышей.

- *зеленые столбцы* – дикий тип (WT),  $n = 6$  самцов мышей.
- *красные столбцы* – нокауты, ( $\Delta Mtn$ ),  $n = 6$  самцов мышей.

*init* – отдельно окислительный субстрат.

*ADP<sub>(3)</sub>* – окислительный субстрат с добавлением избытка ADP (состояние 3).

*ADP<sub>(4)</sub>* – окислительный субстрат после истощения добавленного ADP (состояние 4).

*ADP<sub>(4)</sub>Cr* – окислительный субстрат после истощения добавленного ADP и добавлением избытка креатина, т.е. когда регенерация ADP зависит от связывания креатинкиназы.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

### Снижение скорости клубочковой фильтрации при инактивации Mtlп

Гистологический анализ, а также уровень митохондриального кардиолипина или дыхания напрямую не свидетельствуют о нарушении функций почек. Для проверки патологического влияния инактивация Mtlп на работу почек, была оценена скорость клубочковой фильтрации посредством трансдермального мониторинга выведения FITC-синистрина из кровотока [552]. Затухание интенсивности флуоресценции в крови отслеживалось с помощью миниатюрного флуориметра, зафиксированного на коже мышей. Абсолютные значения флуоресценции неинформативны из-за разбросов интенсивности, связанных со спецификой распределения вещества по сети кровеносных сосудов. Именно скорость снижения флуоресценции указывает на интенсивность клубочковой фильтрации. В то время как у молодых (6-месячных) самцов мышей не было продемонстрировано зависимости скорости клубочковой фильтрации от функциональности Mtlп, для старых (24-месячных)  $\Delta Mtlп$  самок было показано значительное замедление клубочковой фильтрации (Рисунок 41.А,Б). Недостаточная функция почек у пожилых  $\Delta Mtlп$  мышей может быть объяснена избыточным накоплением стареющих клеток, поэтому на следующем этапе было произведено окрашивание срезов почек 24-месячных самок мышей на наличие  $\beta$ -галактозидаза-позитивных клеток и оценено их количество (Рисунок 41.В). Однако существенной разницы в плотности стареющих клеток между мышами дикого типа и нокауты по гену *1500011k16Rik* обнаружено не было. Поэтому можно заключить, что продемонстрированное снижение скорости клубочковой фильтрации связано именно с инактивацией Mtlп.

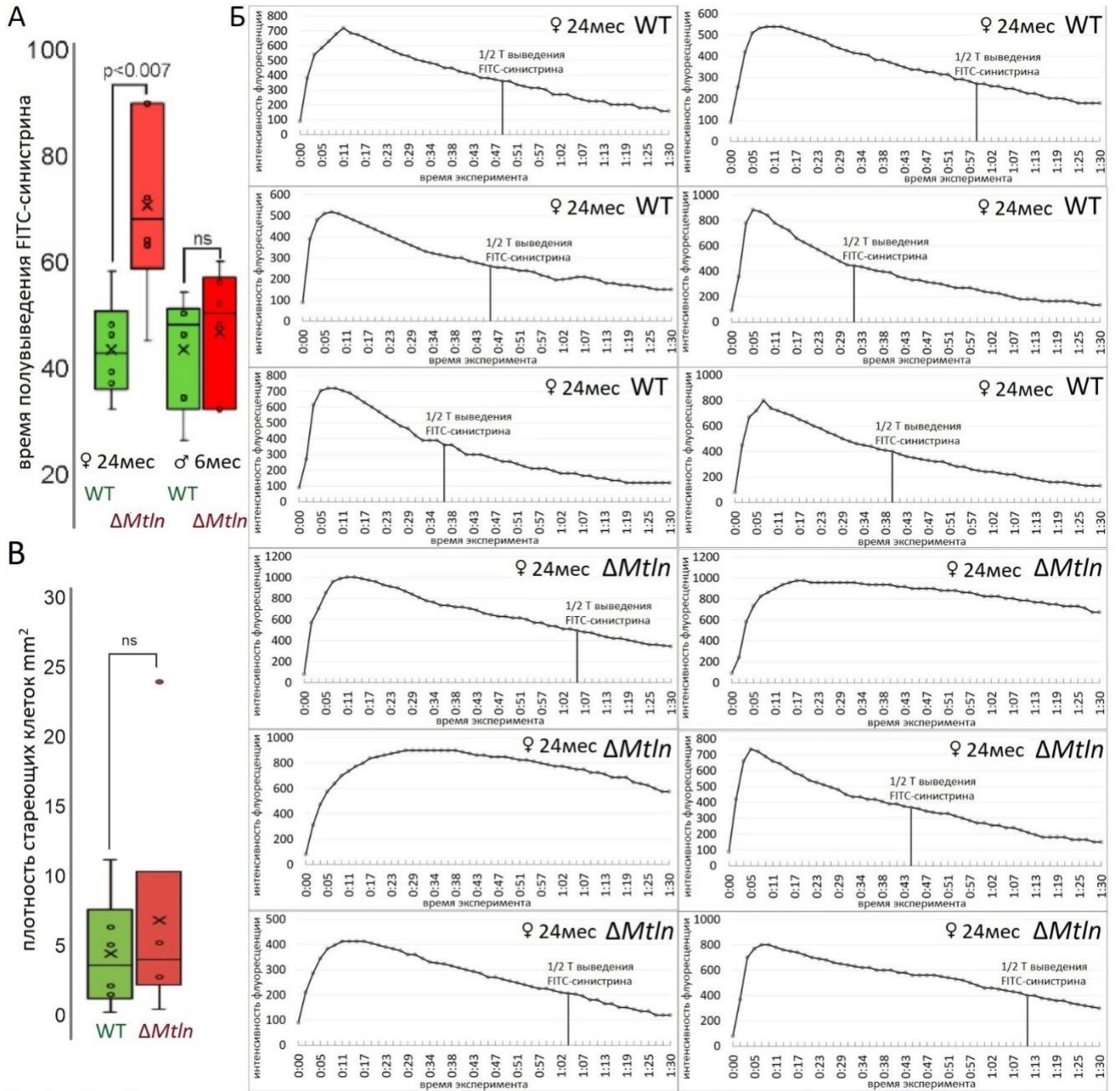


Рисунок 41. Функциональная активность почек мышей.

**А:** Скорость клубочковой фильтрации, представленная в значениях времени полувыведения FITC-синистрина из кровотока.

- зеленые столбцы – дикий тип, WT (24-мес. самки ♀, n=6; 6-мес. самцы ♂, n=6).
- красные столбцы – нокауты,  $\Delta Mtl$  (24-мес. самки ♀, n=6; 6-мес. самцы ♂, n=6).

**Б:** Индивидуальные графики интенсивности флуоресценции, скорости выведения и временной отметкой полувыведения FITC-синистрина из кровотока.

**В:** Количественное определение плотности стареющих клеток на  $\text{mm}^2$  в почках 24-месячных самок мышей.

- зеленые столбцы – дикий тип, WT (24-мес. самки ♀, n=6; 6-мес. самцы ♂, n=7).
- красные столбцы – нокауты,  $\Delta Mtl$  (24-мес. самки ♀, n=6; 6-мес. самцы ♂, n=6).

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

### Инактивация Mtlн нарушает экспрессию почечных генов

Чтобы лучше понять функциональную роль Mtlн в почках было проведено секвенирование почечного транскриптома для мышей дикого типа и нокаутных по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtlн$ ) (Рисунок 42.А). Анализ представленности групп генов (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*) [579] среди дифференциально экспрессирующихся генов в нашем опыте привел к обнаружению основных категорий, в которых преобладают гены с пониженной экспрессией: метаболизм ксенобиотиков, жирных и желчных кислот, синтез белков, мишени Мус и окислительное фосфорилирование (Рисунок 42.Б).

Иммуноблоттинг экстрактов почек  $\Delta Mtlн$  мышей (Рисунок 42.В) показал, что количество митохондрий не изменяется при инактивации Mtlн. Наблюдалось умеренное увеличение количества митофузина (Mfn2), стабильность которого контролируется PARK2/PINK1-зависимой деградацией [626], которая по-видимому нарушается при инактивации Mtlн, что может объяснить дисбаланс количества Mfn2. Также было показано резкое снижение количества Cyb5r3 при инактивации Mtlн, что дополняет наблюдения на клеточных культурах о взаимодействии Mtlн с Cyb5r3, оксидоредуктазой, участвующей в образовании ненасыщенных жирных кислот и других процессах, связанных с гидрофобными соединениями [4].

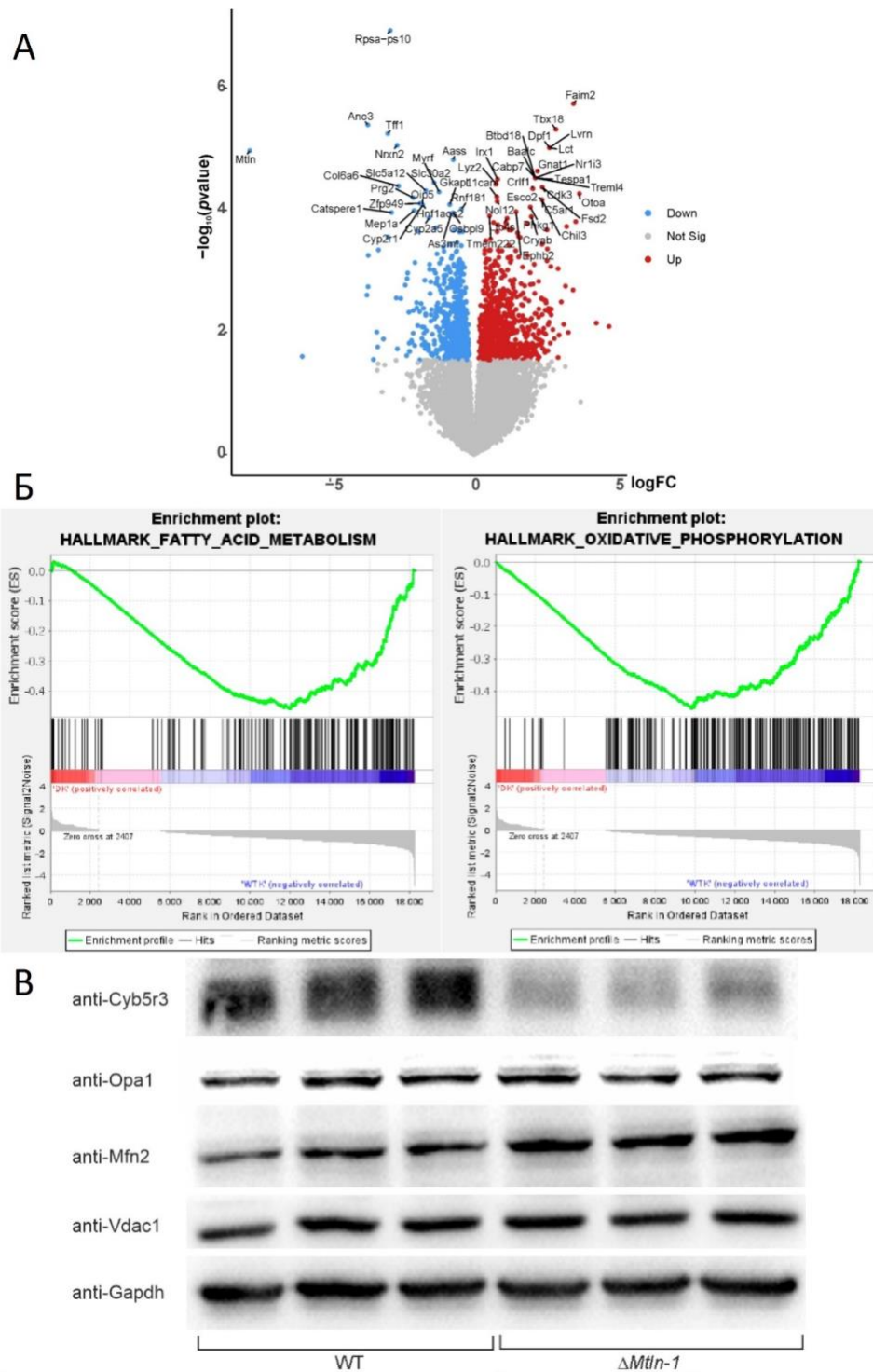


Рисунок 42. Дифференциальная экспрессия генов в почках мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену *1500011k16Rik* ( $\Delta Mtn$ )

**A:** Секвенирование почечного транскриптома мышей, представленное в формате графика рассеяния для большого массива данных (*Volcano Plot*); где ось X соответствует логарифмически кратному изменению экспрессии  $\Delta Mtn$  по сравнению с WT, а ось Y соответствует *p*-значению.

**Б:** Анализ представленности групп генов (GSEA) дифференциально экспрессируемых генов, демонстрирующий снижение активности генов из категории метаболизма жирных кислот (*левая панель*) и категории окислительного фосфорилирования (*правая панель*) в почках  $\Delta Mtn$  мышей.

**В:** Иммуноблоттинг экстрактов почек мышей WT (3 левые дорожки) и  $\Delta Mtn$  (3 дорожки справа). Антитела против митохондриальных белков Cyb5r3, Opa1, Mfn2, Vdac1 и контрольные антитела против Gapdh использовали, как указано слева на панелях.



## Обсуждение

Хотя участие митохондриального белка *Mtln*, кодируемого ядерным геном *1500011k16Rik*, в метаболизме липидов и жирных кислот было предположено несколькими независимыми исследованиями [4; 6; 7], конкретный механизм его действия остается дискуссионным. Взаимодействие *Mtln* с компонентами *HADHA* и *HADHB* трифункционального белка, ответственного за окисление длинноцепочечных и среднецепочечных жирных кислот и снижение дыхания на пальмитилкарнитине [6], позволяет предположить его положительное участие в регуляции окисления жирных кислот. Ранее было продемонстрировано взаимодействие *Mtln* с *Cyb5r3* [4], участвующим в синтезе [627] жирных кислот и образовании ненасыщенных жирных кислот [628]. Проведенный ранее клеточный анализ показал, что при инактивации *Mtln* происходит накопление триглицеридов, прежде всего содержащих длинные остатки полиненасыщенных жирных кислот, в основном незаменимой докозагексаеновой [4]. Эти данные нашли свое подтверждение в анализе мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*, для которых было показано чрезмерное увеличение массы тела за счет накопления жира при длительном содержании на высокожировой диете, а также повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови. Предыдущие подобные исследования не выявляли аналогичных результатов, вероятно, из-за более короткого времени эксперимента: 12-16 недель [7] или 10,5 недель [6] по сравнению с 19 неделями в этом исследовании. Полученные данные по ацилкарнитинам и жирным кислотам в сыворотке крови  $\Delta$ *Mtln* мышей и дикого типа позволяют предположить, что возможная роль *Mtln* в окислении жирных кислот не является специфичной для конкретной длины цепи. Известно, что клинические проявления мутации гена *HADHA* включают патологическое повышение уровня 3-гидрокси-пальмитоилкарнитина (C16OH), 3-гидрокси-олеилкарнитина (C18:1OH), тетрадецилоилкарнитина (C14:1) и 3-гидрокси-миристоилкарнитина (C14OH) [614]. Эти пациенты страдают кардиомиопатией, симптомами схожими с синдромом Рея, рецидивирующей гипокетотической гипогликемией или миоглобинурией и повышением уровня креатинкиназы. Смертность таких пациентов, зачастую ранняя, колеблется от 40 [629] до 98 % [630]. Мышиная модель этой патологической мутации, в случае гомозиготного с нокаута *HADHA*, демонстрирует 100% летальность новорожденных особей с полностью инактивированным трифункциональным белком и тяжелым фенотипом даже для гетерозиготных мутантов [631; 632]. Несмотря на то, что  $\Delta$ *Mtln* мыши не демонстрируют таких жестких фенотипов, можно судить, что повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови и избыточное накопление жировой ткани на фоне высокожировой диеты говорят в пользу влияния *Mtln* на бета-окисление жирных кислот.

Несколько источников подтверждают участие Mtn в миогенной дифференцировке и физиологическом функционировании мышц в качестве основной роли этого пептида [5; 7; 9]. Однако, данные о работе мышц при инактивации Mtn противоречивы. В текущем исследовании наблюдали снижение силы хвата у  $\Delta Mtn$  мышей, что подтверждает более ранние исследования [5; 9]. В то же время гистологический анализ выявил у нокаутов незначительную дегенерацию мышц, а митохондриальное дыхание и состояние креатинового челнока продемонстрировало значительную зависимость от активности Mtn, что может частично объяснить более низкую силу хвата.

Несмотря на то, что молекулярные механизмы, связывающие пептид Mtn с фенотипическими проявлениями нокаута кодирующего его гена, все еще остаются малоизученными, текущее исследование способствует пониманию этого процесса (*Рисунок 43.*). Ранее было показано, что Mtn взаимодействует с NADH-дегидрогеназой Cytb5r3, участвующей в метаболизме жирных кислот [633; 628; 627], а также в предотвращении окислительного повреждения липидов и усилении функционирования дыхательного комплекса [634]. Нашими зарубежными коллегами было показано, что инактивация Mtn увеличивает продукцию АФК [8]. Кардиолипин, уникальный митохондриальный липид, который практически незаменим для функции первого комплекса дыхательной цепи [623], является одной из основных мишеней для АФК-индуцированного повреждения липидов [625]. На основании результатов, представленных в данной работе, предполагается (*Рисунок 43.*), что наблюдаемое снижение концентрации кардиолипина может быть объяснено его чрезмерным окислительным повреждением, вызванным ослаблением защитной функции зависимой от Mtn Cytb5r3. Помимо Cytb5r3-опосредованной защиты кардиолипина, невозможно исключить прямую защиту кардиолипина со стороны Mtn, которая может быть обусловлена взаимодействием этих молекул, показанным Штейном и соавторами [8]. Ранее было описано взаимодействие Mtn с митохондриальным трифункциональным белком [7]. Прямое участие НАДНА-субъединицы трифункционального белка в ремоделировании кардиолипина [635] может представлять еще одну возможную связь между Mtn и гомеостазом кардиолипина.

Вышеописанные различия в концентрации свободных жирных кислот в сыворотке крови, то есть уменьшение количества насыщенных жирных кислот и увеличение количества полиненасыщенной докозагексаеновой кислоты (ДНА), наблюдаемое у  $\Delta Mtn$  мышей, соответствует изменениям ДНА-содержащих триглицеридов в лишенной Mtn клетке [4]. Известно, что насыщенные жирные кислоты мало используются в репарации кардиолипина и преимущественно включаются в состав кардиолипина во время его биогенеза [636], в то время как содержание ДНА увеличивается в кардиолипине с возрастом [637] и при проблемах с ожирением [638], что негативно влияет на дыхание. Молекулярные механизмы, связывающие

функцию *Mtl*n в защите кардиолипина и  $\beta$ -окислении жирных кислот, и наблюдаемый дисбаланс жирных кислот могут стать предметом дальнейшего изучения.

Для восстановления функциональности окисленного кардиолипина белок тафаззин (TFZ) использует фосфатидилхолин, снижение концентрации которого на клеточной модели инактивации *Mtl*n было показано ранее [1; 2; 3]. Помимо комплекса I, кардиолипин влияет на олигомеризацию митохондриальной креатинкиназы [624]. В соответствии с этим в текущем исследовании показан распад октамера митохондриальной креатинкиназы на димеры, что приводит, в случае оксидативных мышц, к снижению активности митохондриальной креатинкиназы и эффективности креатинового челнока, что, предположительно, является следствием снижения концентрации кардиолипина (Рисунок 43.). Ранее такое сочетание наблюдаемых явлений уже было отмечено у мышей с дефицитом креатинкиназы в исследовании, где изучался эффект отсутствия генов митохондриальной или цитозольной креатинкиназы или обоих генов [575].

В то время как специфичный для мышц фенотип инактивации *Mtl*n может снижать физическую силу животных, похоже, что это не создает состояния, опасного для жизни. С другой стороны, как показано в этом исследовании, вакуолярная дегенерация проксимальных каналов почек, вызванная нокаутом гена *1500011k16Rik*, представляет угрозу для жизни. Почки являются вторым наиболее потребляющим кислород органом [639], клетки проксимальных канальцев которого потребляют основную долю кислорода для производства АТФ, подпитывающего ряд трансмембранных насосов. Многие митохондриальные заболевания характеризуются патологиями почек [640]. Симптомы  $\Delta$ *Mtl*n мышей, описанные выше, такие как повышенная концентрация лактата и триглицеридов в сыворотке крови, сопровождающиеся увеличением массы тела, связаны с диабетом II типа [641]. Митохондриальная дисфункция способствует прогрессированию и осложнениям этого заболевания [639]. Известно о роли таких митохондриальных пептидов, как Humanin и MOTS-c, в функции почек. Более того, недавние исследования сообщают о функции *Mtl*n, связанной с почками. Было обнаружено, что увеличение экспрессии *Mtl*n сопровождается хроническим заболеванием почек, приводя к отложению внеклеточного матрикса, замещающего нормальную ткань почек. Искусственное снижение экспрессии гена *1500011k16Rik* приводит к уменьшению фиброза почек при односторонней обструкции мочеточника [642]. В настоящем исследовании наблюдалось патологическое возрастное повреждение почек при инактивации *Mtl*n. Однако, эти проявления патологии и модель заболевания при сравнении с исследованиями Ли и соавторов [642] различаются. Маловероятно, что функциональность *Mtl*n сохранилась бы в ходе эволюции, если бы это было опасно для функции почек. Напротив, вполне вероятно, что увеличение экспрессии

гена *1500011k16Rik* в связи с повреждением почек является вторичным эффектом, направленным на компенсацию почечной дисфункции.

В этом исследовании показаны две зависящие от возраста и пола патологии почек, связанные с потерей функции *Mtn*: вакуолярная дегенерация проксимальных каналов почек у старых самцов и замедление клубочковой фильтрации у старых самок. У более молодых мышей эти патологии не проявляются, что вероятно, связано с возрастным накоплением деструктивного эффекта потери *Mtn* на митохондрии и общим снижением энергопродукции в почках. Специфический возрастной фенотип инактивации митохондриального пептида часто встречаем [355], также описаны гендерные различия в патологии почек, связанные с функционированием митохондрий [643]. В настоящем исследовании была выявлена разница возрастной дисфункции почек у самцов и самок мышей, лишенных *Mtn*. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы раскрыть молекулярные механизмы, ведущие к возрастной и гендерной специфичности почечных фенотипов у  $\Delta Mtn$  мышей.

## Схема модели функционирования Mtlн

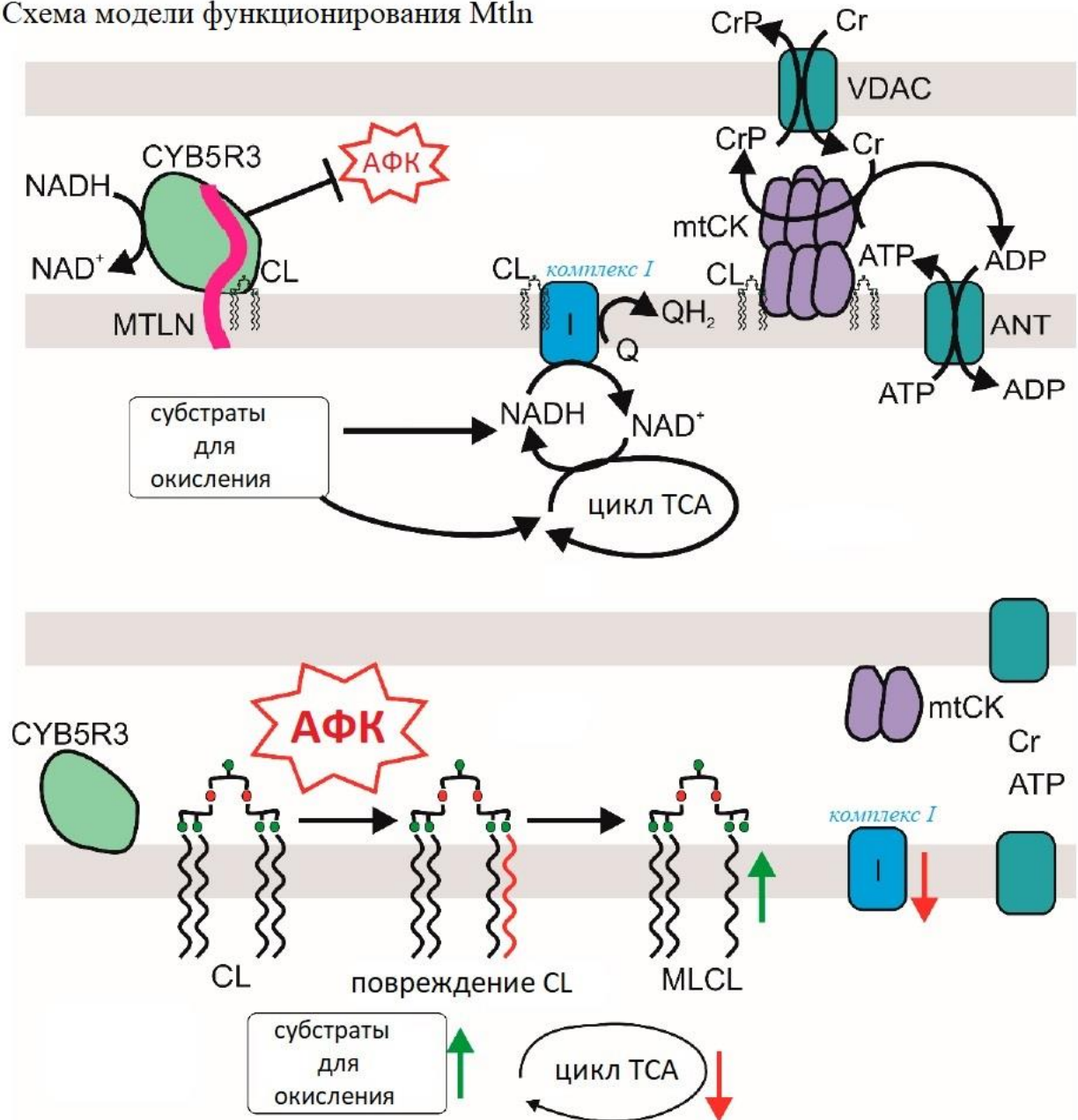


Рисунок 43. Модель функционирования Mtlн

Подробное фенотипирование нокаутных мышей по гену *1500011k16Rik* позволяет заключить, что опосредованные дисфункцией белка Mtlн патологические состояния, такие как метаболические нарушения, миопатия, почечная недостаточность связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи, приводящее к накоплению субстратов окисления или их предшественников - триглицеридов и аминокислот, и истощению интермедиатов цикла трикарбоновых кислот, таких как цитрат, сукцинат и малат, а также других продуктов окисления, в том числе бетаина (Рисунок 43.). С каждым исследованием, посвященным пептиду Mtlн, его роль становилась все более ясной. Эта работа создает основу для понимания молекулярной функции Mtlн.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ и ВЫВОДЫ

В представленной работе был произведён разносторонний анализ современных подходов оптимизации создания мышей с измененным геномом, необходимых для изучения новых белков, что является актуальной задачей как для фундаментальных, так и клинических исследований. В частности в данной работе были дополнены ранее показанные и раскрыты новые аспекты физиологии с участием митохондриального белка Миторегулина (Mtlн).

По полученным результатам исследования были сделаны следующие выводы:

1. Технология egРНК-направленного расщепления ДНК-мишени Cas9, при последующей гомологичной рекомбинации с использованием матрицы оцДНК, остается оптимальным выбором для создания мышей с целевым изменением генома.
2. При разработке протокола создания мутантных мышей необходимо учитывать оптимизацию абсолютно каждого этапа для получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом.
3. Опосредованные дисфункцией белка Mtlн патологические состояния мышей связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи.
4. Инактивация Mtlн у мышей приводит к зависящим от возраста и пола патологиям почек, представляющим угрозу жизни.
5. Митохондриальный белок Mtlн влияет на бета-окисление жирных кислот мышей.
6. Нормальное функционирование мышечной ткани у мышей зависит от активности белка Mtlн.
7. Белок Mtlн обеспечивает сохранность пула кардиолипина, необходимого для функционирования первого комплекса дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

53BP1	p53-связывающий белок 1.
A	Аденозин.
AID	Индукцированная активацией дезаминаза.
AP сайт	Апуриновый/апиримидиновый сайт.
APE1	Апуриновая эндонуклеаза.
AuНЧ	Наночастицы золота; AuNP.
AuНЧ	Наночастицы золота; AuNP; CRISPR-Gold.
BE	Редактор оснований; Base Editor.
BER	Экцизионная репарация оснований ДНК; Base Excision Repair.
BIR	Репликация, индуцированная разрывом.
BRCA1- BARD1	Комплекс белка предрасположенности к раку молочной железы 1-BRCA1-ассоциированный с доменом 1.
C	Цитидин.
Cas	CRISPR-ассоциированный; CRISPR-associated.
Cas9-CP	Вариант Cas9 с циклической перестановкой.
Cascade	CRISPR-ассоциированный комплекс противовирусной защиты.
CBE	Редактор цитидина; Cytosine Base Editor.
СК	Креатинкиназа.
CL	Кардиолипина.
Cr	Креатин.
Cr/CrP челнок	Креатин/креатинфосфатный челнок.
CRISPR	Кластеризованные регулярные промежуточные короткие палиндромные повторы; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
CRISPRa	Система активации CRISPR.
CRISPRi	Система интерференции CRISPR.
crPHK	CRISPR PHK; crRNA.
Cyb5r3	Цитохром b5-редуктазой 3.
dCas9	Каталитически мертвый Cas9.
DHA	Полиненасыщенная докозагексаеновая кислота.
DSTR	Репарация с помощью гомологичной рекомбинации с двуцепочечным ДНК-донором.
eA3A	Улучшенная цитидиндезаминаза; enhanced hA3A.

ES	Эмбриональные стволовые клетки.
EXO1	Экзонуклеаза 1.
FA	Путь анемии Фанкони.
FISH	Флуоресцентная гибридизации in situ.
G	Гуанозин.
HE	Хоуминг-эндонуклеаза; Homing Endonuclease.
HEK293T	Клетки эмбриональной почки человека. Двухнуклеотид-связывающих доменов; Higher Eukaryotes & Prokaryotes
HEPN	Nucleotide-binding.
HR или	Гомологичная рекомбинации;
HDR	Репарация с помощью гомологичной рекомбинации.
HSPC	Гемопозитические стволовые клетки.
I	Инозин.
InDel	Вставки или делеции; инсерционно-делеционные мутации.
LAHR	Гомологичная рекомбинация с помощью лигирования.
lncРНК	Длинные некодирующие РНК.
LRR	Дальняя резекции концов; Long-Range Resection.
MLCL	Монолизокардиолипид.
MMEJ	Соединение концов, опосредованное микрогомологией; altNHEJ.
M-MLV	Вирус мышинового лейкоза Молони.
MMR	Репарации ошибочно спаренных оснований ДНК; MisMatch Repair.
mtCK	Митохондриальная креатинкиназа.
Mtln	Белок Миторегулин.
nCas9	Никазный Cas9; D10A.
ncРНК	Некодирующие РНК.
NHEJ	Негомологичного соединения концов; негомологичная рекомбинация.
nick	Односторонний разрыв.
NLS	Сигналы ядерной локализации.
ORF	Открытая рамка считывания; Open ReadingFrame.
OXPPOS	Окислительное фосфорилирование.
PAM	Мотив (последовательность), примыкающий к протоспейсеру.
PBS	Сайт связывания праймера.
PE	Праймированный редактор; Prime Editor.
PTC	Преждевременный стоп кодон; Premature Termination Codons.



RPA	Репликационный белок А.
RT	Обратная транскриптаза; Reverse Transcriptase.
SDSA	Зависимый от синтеза отжиг цепей.
SEP	Микропептид; Short Encoded Peptide.
SEP	Микропептиды.
SSA	Одноцепочечный отжиг цепей.
SSTR	Репарация с помощью гомологичной рекомбинации с одноцепочечный ДНК-донором.
T	Тимидин.
TadA*	Искусственный фермент, мутантной версии аденозиндезаминазы tPHK <i>Escherichia coli</i> .
TadAwt	Аденозиндезаминаза tPHK <i>Escherichia coli</i> дикого типа.
TALEN	Эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции.
TAM	Целевой AID-опосредованный мутагенез; Targeted AID-mediated Mutagenesis.
tracrPHK	Трансактивирующая crPHK; tracrRNA.
U	Уридин.
UGI	Ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы.
UNG	Урацил-ДНК-гликозилаза; Uracil-DNA Glycosylase; UDG.
XLF	XRCC4-подобный фактор.
XRCC4	Кросс-комплементирующий белок 4 X-ray репарации.
ZFN	Нуклеаза с цинковыми пальцами.
ZFN	Нуклеаза с "цинковыми пальцами".
ΔAID	AID без сигнала ядерного экспорта.
ААВ	Аденоассоциированный вирус; AAV.
АдВ	Аденовирусы; AdV.
ВПЧ	Вирусоподобные частицы; VLP.
гPHK	Направляющая или гидовая PHK; gRNA.
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая Кислота; DNA.
ДНК-ПК	ДНК-зависимая протеинкиназа
доцДНК	Длинная одноцепочечная ДНК; lssDNA.
дцДНК	Двуцепочечная ДНК; dsDNA.
ДЦР	Двуцепочечные разрывы ДНК; DSB.
егPHK	Единая гидовая PHK; sgRNA.

КПП	Короткие пептиды (<30а.к.), проникающие через клеточные мембраны.
ЛВ	Лентивирус; LV.
ЛНЧ	Липидные наночастицы; LNP.
ЛНЧ	Липидные наночастицы; LNP.
м.п.н.	Миллион пар нуклеотидов/оснований; mb.
мРНК	Матричная РНК.
МРТ	Магнитно-резонансная томография.
мтДНК	Митохондриальная ДНК.
оцДНК	Одноцепочечная ДНК; ssDNA.
оцДНК-ААВ	Линейная одноцепочечная ДНК аденоассоциированного вируса
оцОНК	Одноцепочечный ДНК-олигонуклеотид; ssODN.
ОЦР	Одноцепочечные Разрывы ДНК; SSB.
п.н.	Пары нуклеотидов/оснований; bp.
пДНК	Плазмидная ДНК.
ПК	Протеинкиназа.
пргРНК	Гидовая РНК праймированного редактирования.
ПЦР	Полимеразная цепная реакция.
РНК	Рибонуклеиновая кислота; RNA.
РНП	Рибонуклеопротеин; RNP.
РНП	Рибонуклеопротеиновые частицы; RNP.
т.п.н.	Тысячи пар нуклеотидов/оснований; kb.
тр.ак.сгРНК	Трансактивирующую сгРНК; tracrRNA.
ядДНК	Ядерная ДНК.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Chugunova A. et al. Mining for Small Translated ORFs. // *J Proteome Res.* 2018. Vol. 17, № 1. P. 1–11.
2. Makarewich C.A., Olson E.N. Mining for Micropeptides. // *Trends Cell Biol.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 27, № 9. P. 685–696.
3. Ruiz-Orera J., Albà M.M. Translation of Small Open Reading Frames: Roles in Regulation and Evolutionary Innovation. // *Trends Genet.* England, 2019. Vol. 35, № 3. P. 186–198.
4. Chugunova A. et al. LINC00116 codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019. Vol. 116, № 11. P. 4940–4945.
5. Lin Y.F. et al. A novel mitochondrial micropeptide MPM enhances mitochondrial respiratory activity and promotes myogenic differentiation. // *Cell Death Dis.* Springer US, 2019. Vol. 10, № 7. P. 528.
6. Friesen M. et al. Mitoregulin Controls  $\beta$ -Oxidation in Human and Mouse Adipocytes. // *Stem Cell Reports.* ElsevierCompany., 2020. Vol. 14, № 4. P. 590–602.
7. Makarewich C.A. et al. MOXI Is a Mitochondrial Micropeptide That Enhances Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation. // *Cell Rep.* ElsevierCompany., 2018. Vol. 23, № 13. P. 3701–3709.
8. Stein C.S. et al. Mitoregulin: A lncRNA-Encoded Microprotein that Supports Mitochondrial Supercomplexes and Respiratory Efficiency. // *Cell Rep.* United States, 2018. Vol. 23, № 13. P. 3710-3720.e8.
9. Wang L. et al. The micropeptide LEMP plays an evolutionarily conserved role in myogenesis. // *Cell Death Dis.* Springer US, 2020. Vol. 11, № 5. P. 357.
10. Makarova K.S. et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. // *Nat Rev Microbiol.* 2020. Vol. 18, № 2. P. 67–83.
11. Liu Z. et al. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. // *Microb Cell Fact.* BioMed Central, 2020. Vol. 19, № 1. P. 1–14.
12. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // *Science.* United States, 2012. Vol. 337, № 6096. P. 816–821.
13. Filippova J. et al. Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. // *Biochimie.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 167. P. 49–60.
14. Hendel A. et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. // *Nat Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 9. P. 985–989.
15. Yin H. et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. // *Nat Biotechnol.* United States, 2017. Vol. 35, № 12. P. 1179–1187.
16. Fu Y. et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 32, № 3. P. 279–284.

17. Liu G., Zhang Y., Zhang T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. // *Comput Struct Biotechnol J*. The Authors, 2020. Vol. 18. P. 35–44.
18. Gurumurthy C.B., Kent Lloyd K.C. Generating mouse models for biomedical research: Technological advances. // *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2019. Vol. 12, № 1.
19. Li F. et al. Efficient genetic manipulation of the NOD-Rag1<sup>-/-</sup>IL2RgammaC-null mouse by combining in vitro fertilization and CRISPR/Cas9 technology. // *Sci Rep*. 2014. Vol. 4. P. 1–7.
20. Wang H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. // *Cell*. United States, 2013. Vol. 153, № 4. P. 910–918.
21. Sunagawa G.A. et al. Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. // *Cell Rep*. United States, 2016. Vol. 14, № 3. P. 662–677.
22. Arai D., Nakao Y. Efficient biallelic knock-in in mouse embryonic stem cells by in vivo-linearization of donor and transient inhibition of DNA polymerase  $\theta$ /DNA-PK. // *Sci Rep*. Nature Research, 2021. Vol. 11, № 1.
23. Li X. et al. A high-efficiency and versatile CRISPR/Cas9-mediated HDR-based biallelic editing system. // *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022. Vol. 23, № 2. P. 141–152.
24. Shalem O. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. // *Science*. United States, 2014. Vol. 343, № 6166. P. 84–87.
25. Wang T. et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. // *Science*. United States, 2014. Vol. 343, № 6166. P. 80–84.
26. Zhou Y. et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. // *Nature*. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 509, № 7501. P. 487–491.
27. Lino C.A. et al. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. // *Drug Deliv*. Informa Healthcare USA, Inc, 2018. Vol. 25, № 1. P. 1234–1257.
28. Slaymaker I.M. et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. // *Science*. United States, 2016. Vol. 351, № 6268. P. 84–88.
29. Doench J.G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. // *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 34, № 2. P. 184–191.
30. Hsu P.D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. // *Nat Biotechnol*. 2013. Vol. 31, № 9. P. 827–832.
31. Cong L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. // *Science*. United States, 2013. Vol. 339, № 6121. P. 819–823.
32. Turchiano G. et al. Quantitative evaluation of chromosomal rearrangements in gene-edited human stem cells by CAST-Seq. // *Cell Stem Cell*. United States, 2021. Vol. 28, № 6. P. 1136-1147.e5.

33. Parikh B.A. et al. Detailed phenotypic and molecular analyses of genetically modified mice generated by CRISPR-Cas9-mediated editing. // *PLoS One*. United States, 2015. Vol. 10, № 1. P. e0116484.
34. Traxler E.A. et al. A genome-editing strategy to treat  $\beta$ -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. // *Nat Med*. United States, 2016. Vol. 22, № 9. P. 987–990.
35. Cullot G. et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. // *Nat Commun*. Springer US, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–14.
36. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. // *Nat Biotechnol*. 2018. Vol. 36, № 8. P. 765–771.
37. Xu C.L. et al. Viral delivery systems for CRISPR. // *Viruses*. 2019. Vol. 11, № 1. P. 1–12.
38. Charlesworth C.T. et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. // *Nat Med*. Springer US, 2019. Vol. 25, № 2. P. 249–254.
39. Song M., Koo T. Recent advances in CRISPR technologies for genome editing. // *Arch Pharm Res*. Korea (South), 2021. Vol. 44, № 6. P. 537–552.
40. Walton R.T. et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. // *Science*. United States, 2020. Vol. 368, № 6488. P. 290–296.
41. Wang Y. et al. Efficient Human Genome Editing Using SaCas9 Ribonucleoprotein Complexes. // *Biotechnol J*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 14, № 7. P. 1–8.
42. Yılmaz Ş.G. Genome editing technologies: Crispr, leaper, restore, arcut, sati, and rescue. // *EXCLI J*. 2021. Vol. 20. P. 19–45.
43. Kleinstiver B.P. et al. Engineered CRISPR–Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. // *Nat Biotechnol*. 2019. Vol. 37, № 3. P. 276–282.
44. Li S. et al. Expanding the Scope of CRISPR/Cpf1-Mediated Genome Editing in Rice. // *Mol Plant*. Chinese Society for Plant Biology, 2018. Vol. 11, № 7. P. 995–998.
45. Gasiunas G. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol. 109, № 39. P. 2579–2586.
46. Qi L.S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. // *Cell*. United States, 2013. Vol. 152, № 5. P. 1173–1183.
47. Gilbert L.A. et al. XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. // *Cell*. Elsevier Inc., 2013. Vol. 154, № 2. P. 442.
48. Maeder M.L. et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. // *Nat Methods*. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 10, № 10. P. 977–979.

49. Balboa D. et al. Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. // *Stem Cell Reports*. The Authors, 2015. Vol. 5, № 3. P. 448–459.
50. Gilbert L.A. et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. // *Cell*. Elsevier Inc., 2014. Vol. 159, № 3. P. 647–661.
51. Wang G. et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity. // *Nat Immunol*. United States, 2019. Vol. 20, № 11. P. 1494–1505.
52. Liu P. et al. CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. // *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 2018. Vol. 22, № 2. P. 252-261.e4.
53. Nuñez J.K. et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. // *Cell*. United States, 2021. Vol. 184, № 9. P. 2503-2519.e17.
54. Zhang F., Song G., Tian Y. Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems. // *Animal Model Exp Med*. 2019. Vol. 2, № 2. P. 69–75.
55. Malone L.M., Birkholz N., Fineran P.C. Conquering CRISPR: how phages overcome bacterial adaptive immunity. // *Curr Opin Biotechnol*. Elsevier Current Trends, 2021. Vol. 68. P. 30–36.
56. Harrington L.B. et al. A Broad-Spectrum Inhibitor of CRISPR-Cas9. // *Cell*. United States, 2017. Vol. 170, № 6. P. 1224-1233.e15.
57. Liu L. et al. Phage AcrIIA2 DNA Mimicry: Structural Basis of the CRISPR and Anti-CRISPR Arms Race. // *Mol Cell*. Elsevier Inc., 2019. Vol. 73, № 3. P. 611-620.e3.
58. Jo D.H. et al. Long-Term Effects of In Vivo Genome Editing in the Mouse Retina Using *Campylobacter jejuni* Cas9 Expressed via Adeno-Associated Virus. // *Molecular Therapy*. Elsevier Ltd., 2019. Vol. 27, № 1. P. 130–136.
59. Harrington L.B. et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. // *Science*. 2018. Vol. 362, № 6416. P. 839–842.
60. Gupta R. et al. Cas13d: A New Molecular Scissor for Transcriptome Engineering. // *Front Cell Dev Biol*. 2022. Vol. 10, № March. P. 1–22.
61. Koo T. et al. CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration. // *Nat Commun*. Springer US, 2018. Vol. 9, № 1.
62. Chen J.S. et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. // *Science*. 2018. Vol. 360, № 6387. P. 436–439.
63. Leung R.K.K. et al. CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection systems. // *Methods*. Elsevier Inc., 2022. Vol. 203, № November 2020. P. 276–281.
64. Wang Z. et al. Efficient genome editing by CRISPR-Mb3Cas12a in mice. // *J Cell Sci*. 2020. Vol. 133, № 9. P. 1–8.

65. Altae-Tran H. et al. The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2021. Vol. 374, № 6563. P. 57–65.
66. Cox D.B.T. et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. // *Science*. 2017. Vol. 358, № 6366. P. 1019–1027.
67. Abudayyeh O.O. et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 2019. Vol. 365, № 6451. P. 382–386.
68. Hoeijmakers J.H.J. DNA Damage, Aging, and Cancer. // *The New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 2009. Vol. 361, № 15. P. 1475–1485.
69. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. // *Annu Rev Biochem*. United States, 2010. Vol. 79. P. 181–211.
70. Sirbu B.M., Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. United States, 2013. Vol. 5, № 8. P. a012724.
71. Baudat F., Imai Y., De Massy B. Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation. // *Nat Rev Genet*. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 14, № 11. P. 794–806.
72. Schatz D.G., Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. // *Nat Rev Immunol*. England, 2011. Vol. 11, № 4. P. 251–263.
73. van de Kooij B., van Attikum H. Genomic Reporter Constructs to Monitor Pathway-Specific Repair of DNA Double-Strand Breaks. // *Front Genet*. Switzerland, 2021. Vol. 12. P. 809832.
74. Cannan W.J., Pederson D.S. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. // *J Cell Physiol*. 2016. Vol. 231, № 1. P. 3–14.
75. Zhang X. et al. Homology-based repair induced by CRISPR-Cas nucleases in mammalian embryo genome editing. // *Protein Cell*. Higher Education Press, 2022. Vol. 13, № 5. P. 316–335.
76. Denes C.E. et al. Approaches to enhance precise CRISPR/Cas9-mediated genome editing. // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 16.
77. Yang H. et al. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, № 18. P. 1–20.
78. Sun W. et al. Strategies for Enhancing the Homology-Directed Repair Efficiency of CRISPR-Cas Systems. // *CRISPR J*. United States, 2022. Vol. 5, № 1. P. 7–18.
79. Ma J. et al. TRABID overexpression enables synthetic lethality to PARP inhibitor via prolonging 53BP1 retention at double-strand breaks. // *Nat Commun*. 2023. Vol. 14, № 1. P. 1810.
80. Li G. et al. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 99. P. 154–160.
81. Pawelczak K.S. et al. Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. // *ACS Chem Biol*. United States, 2018. Vol. 13, № 2. P. 389–396.

82. Gavande N.S. et al. Discovery and development of novel DNA-PK inhibitors by targeting the unique Ku-DNA interaction. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2020. Vol. 48, № 20. P. 11536–11550.
83. Chu V.T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. // *Nat Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 5. P. 543–548.
84. LI G. ling et al. Inhibition of KU70 and KU80 by CRISPR interference, not NgAgo interference, increases the efficiency of homologous recombination in pig fetal fibroblasts. // *J Integr Agric. CAAS.* Published by Elsevier Ltd., 2019. Vol. 18, № 2. P. 438–448.
85. Shy B.R. et al. Co-incident insertion enables high efficiency genome engineering in mouse embryonic stem cells. // *Nucleic Acids Res.* England, 2016. Vol. 44, № 16. P. 7997–8010.
86. Yu W. et al. KU70 Inhibition Impairs Both Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination DNA Damage Repair Through SHP-1 Induced Dephosphorylation of SIRT1 in Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma Cells. // *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018. Vol. 49, № 6. P. 2111–2123.
87. Weterings E. et al. A novel small molecule inhibitor of the DNA repair protein Ku70/80. // *DNA Repair (Amst).* Elsevier B.V., 2016. Vol. 43. P. 98–106.
88. Riesenbergs S., Maricic T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. // *Nat Commun.* England, 2018. Vol. 9, № 1. P. 2164.
89. Mohiuddin I.S., Kang M.H. DNA-PK as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. // *Front Oncol.* Switzerland, 2019. Vol. 9. P. 635.
90. Robert F. et al. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. // *Genome Med.* England, 2015. Vol. 7, № 1. P. 93.
91. Aksoy Y.A. et al. Chemical reprogramming enhances homology-directed genome editing in zebrafish embryos. // *Commun Biol.* Nature Research, 2019. Vol. 2, № 1. P. 198.
92. Riesenbergs S. et al. Simultaneous precise editing of multiple genes in human cells. // *Nucleic Acids Res.* England, 2019. Vol. 47, № 19. P. e116.
93. Fu Y.W. et al. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2021. Vol. 49, № 2. P. 969–985.
94. Ray U., Raghavan S.C. Modulation of DNA double-strand break repair as a strategy to improve precise genome editing. // *Oncogene.* England, 2020. Vol. 39, № 41. P. 6393–6405.
95. Ray U., Vartak S. V, Raghavan S.C. NHEJ inhibitor SCR7 and its different forms: Promising CRISPR tools for genome engineering. // *Gene.* Netherlands, 2020. Vol. 763. P. 144997.
96. Shao S. et al. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. // *Int J Biochem Cell Biol.* Netherlands, 2017. Vol. 92. P. 43–52.



97. Maruyama T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. // *Nat Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 5. P. 538–542.
98. Aird E.J. et al. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. // *Commun Biol. Nature Research*, 2018. Vol. 1, № 1. P. 54.
99. Song J. et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. // *Nat Commun. England*, 2016. Vol. 7. P. 10548.
100. Gutschner T. et al. Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair. // *Cell Rep. Elsevier Ltd*, 2016. Vol. 14, № 6. P. 1555–1566.
101. Xie Z. et al. Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated Knock-in Strategy at the Porcine Rosa26 Locus in Porcine Foetal Fibroblasts. // *Sci Rep. Springer US*, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–12.
102. Yang D. et al. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. // *Sci Rep. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 6, № 18. P. 21264.
103. Canny M.D. et al. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency. // *Nat Biotechnol. Nature Publishing Group*, 2018. Vol. 36, № 1. P. 95–102.
104. Jayavaradhan R., Pillis D.M., Malik P. A Versatile Tool for the Quantification of CRISPR/Cas9-Induced Genome Editing Events in Human Hematopoietic Cell Lines and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. // *J Mol Biol. Elsevier Ltd*, 2019. Vol. 431, № 1. P. 102–110.
105. Wienert B. et al. Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair. // *Nat Commun. Springer US*, 2020. Vol. 11, № 1.
106. Ma X. et al. Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. // *Nat Commun. Springer US*, 2018. Vol. 9, № 1. P. 1–7.
107. Vartak S. V et al. Autocyclized and oxidized forms of SCR7 induce cancer cell death by inhibiting nonhomologous DNA end joining in a Ligase IV dependent manner. // *FEBS J. England*, 2018. Vol. 285, № 21. P. 3959–3976.
108. Killian T. et al. Disruption of diphthamide synthesis genes and resulting toxin resistance as a robust technology for quantifying and optimizing CRISPR/Cas9-mediated gene editing. // *Sci Rep. Springer US*, 2017. Vol. 7, № 1. P. 13–17.
109. Aslan Y. et al. High-efficiency non-mosaic CRISPR-mediated knock-in and indel mutation in F0 *Xenopus*. // *Development (Cambridge). Company of Biologists Ltd*, 2017. Vol. 144, № 15. P. 2852–2858.
110. Ray U. et al. Identification and characterization of novel SCR7-based small-molecule inhibitor of DNA end-joining, SCR130 and its relevance in cancer therapeutics. // *Mol Carcinog. United States*, 2020. Vol. 59, № 6. P. 618–628.
111. Scully R. et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. // *Nat Rev Mol Cell Biol. England*, 2019. Vol. 20, № 11. P. 698–714.

112. Yeh C.D., Richardson C.D., Corn J.E. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. // *Nat Cell Biol.* Springer US, 2019. Vol. 21, № 12. P. 1468–1478.
113. Richardson C.D. et al. CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. // *Nat Genet.* United States, 2018. Vol. 50, № 8. P. 1132–1139.
114. Syed A., Tainer J.A. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. // *Annu Rev Biochem.* United States, 2018. Vol. 87. P. 263–294.
115. Reuven N. et al. Recruitment of DNA Repair MRN Complex by Intrinsically Disordered Protein Domain Fused to Cas9 Improves Efficiency of CRISPR-Mediated Genome Editing. // *Biomolecules.* Switzerland, 2019. Vol. 9, № 10. P. 584.
116. Lee K.J. et al. Phosphorylation of Ku dictates DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice in S phase. // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 44, № 4. P. 1732–1745.
117. Caron M.-C.C. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. // *Nat Commun.* England: Springer US, 2019. Vol. 10, № 1. P. 2954.
118. Huertas P., Jackason S.P. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. // *Journal of Biological Chemistry.* 2009. Vol. 284, № 14. P. 9558–9565.
119. Anand R. et al. Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. // *Mol Cell.* Cell Press, 2016. Vol. 64, № 5. P. 940–950.
120. Charpentier M. et al. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. // *Nat Commun.* Springer US, 2018. Vol. 9, № 1. P. 1–11.
121. Nimonkar A. V et al. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. // *Genes Dev.* United States, 2011. Vol. 25, № 4. P. 350–362.
122. Myler L.R. et al. Single-molecule imaging reveals the mechanism of Exo1 regulation by single-stranded DNA binding proteins. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States, 2016. Vol. 113, № 9. P. E1170-9.
123. Symington L.S. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* England, 2016. Vol. 51, № 3. P. 195–212.
124. Daley J.M. et al. Enhancement of BLM-DNA2-Mediated Long-Range DNA End Resection by CtIP. // *Cell Rep.* ElsevierCompany., 2017. Vol. 21, № 2. P. 324–332.
125. Tarsounas M., Sung P. The antitumorigenic roles of BRCA1-BARD1 in DNA repair and replication. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* England, 2020. Vol. 21, № 5. P. 284–299.
126. Becker J.R. et al. BARD1 reads H2A lysine 15 ubiquitination to direct homologous recombination. // *Nature.* 2021. Vol 596, № 7872. P. 433–437.
127. Nambiar T.S. et al. Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. // *Nat Commun.* England, 2019. Vol. 10, № 1. P. 3395.

128. Xue C., Greene E.C. DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. // *Trends Genet.* England, 2021. Vol. 37, № 7. P. 639–656.
129. Yu C. et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. // *Cell Stem Cell.* United States, 2015. Vol. 16, № 2. P. 142–147.
130. Dhingra N., Zhao X. Intricate SUMO-based control of the homologous recombination machinery. // *Genes Dev.* 2019. Vol. 33, № 19–20. P. 1346–1354.
131. Soria-Bretones I. et al. DNA end resection requires constitutive sumoylation of CtIP by CBX4. // *Nat Commun.* England, 2017. Vol. 8, № 1. P. 113.
132. Bologna S. et al. Sumoylation regulates EXO1 stability and processing of DNA damage. // *Cell Cycle.* 2015. Vol. 14, № 15. P. 2439–2450.
133. Lin S. et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. // *Elife.* 2014. Vol. 3. P. e04766.
134. Vassilev L.T. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. // *Cell Cycle.* United States, 2006. Vol. 5, № 22. P. 2555–2556.
135. Lomova A. et al. Improving Gene Editing Outcomes in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Temporal Control of DNA Repair. // *Stem Cells.* 2019. Vol. 37, № 2. P. 284–294.
136. Gerlach M. et al. Efficient knock-in of a point mutation in porcine fibroblasts using the CRISPR/Cas9-GMNN fusion gene. // *Genes (Basel).* 2018. Vol. 9, № 6.
137. Howden S.E. et al. A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells. // *Stem Cell Reports.* The Author(s), 2016. Vol. 7, № 3. P. 508–517.
138. Schep R. et al. Impact of chromatin context on Cas9-induced DNA double-strand break repair pathway balance. // *Mol Cell.* United States, 2021. Vol. 81, № 10. P. 2216-2230.e10.
139. Chen Z., Tyler J.K. The Chromatin Landscape Channels DNA Double-Strand Breaks to Distinct Repair Pathways. // *Front Cell Dev Biol.* 2022. Vol. 10, № June. P. 1–18.
140. Clouaire T. et al. Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures. // *Mol Cell.* United States, 2018. Vol. 72, № 2. P. 250-262.e6.
141. Yilmaz D. et al. Activation of homologous recombination in G1 preserves centromeric integrity. // *Nature.* England, 2021. Vol. 600, № 7890. P. 748–753.
142. Chen X. et al. Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools. // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № 13. P. 6482–6492.
143. Janssen J.M. et al. The Chromatin Structure of CRISPR-Cas9 Target DNA Controls the Balance between Mutagenic and Homology-Directed Gene-Editing Events. // *Mol Ther Nucleic Acids.* Elsevier Ltd., 2019. Vol. 16, № June. P. 141–154.

144. Liu B. et al. Inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 enhances CRISPR/Cas9 genome editing. // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, № 2. P. 517–532.
145. Takayama K. et al. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. // *Nucleic Acids Res. England*, 2017. Vol. 45, № 9. P. 5198–5207.
146. Knight S.C. et al. Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. // *Science*. 2015. Vol. 350, № 6262. P. 823–826.
147. Caron P., Pobega E., Polo S.E. DNA Double-Strand Break Repair: All Roads Lead to HeterochROMatin Marks. // *Front Genet.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 730696.
148. Chechik L., Martin O., Soutoglou E. Genome Editing Fidelity in the Context of DNA Sequence and Chromatin Structure. // *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8, № 8. P. 1–8.
149. Song F., Stieger K. Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. // *Mol Ther Nucleic Acids.* United States, 2017. Vol. 7. P. 53–60.
150. Renaud J.-B. et al. Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. // *Cell Rep.* United States, 2016. Vol. 14, № 9. P. 2263–2272.
151. Lim D. et al. Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform. // *Nat Commun. Springer US*, 2020. Vol. 11, № 1.
152. Shola D.T.N. et al. Generation of Mouse Model (KI and CKO) via Easi-CRISPR. // *Methods Mol Biol.* United States, 2021. Vol. 2224. P. 1–27.
153. Yoon Y. et al. Streamlined ex vivo and in vivo genome editing in mouse embryos using recombinant adenoassociated viruses. // *Nat Commun. Springer US*, 2018. Vol. 9, № 1. P. 1–12.
154. Chen S. et al. CRISPR-READI: Efficient Generation of Knockin Mice by CRISPR RNP Electroporation and AAV Donor Infection. // *Cell Rep. ElsevierCompany.*, 2019. Vol. 27, № 13. P. 3780-3789.e4.
155. Bak R.O., Porteus M.H. CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. // *Cell Rep. ElsevierCompany.*, 2017. Vol. 20, № 3. P. 750–756.
156. Yao X. et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. // *Cell Res. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 27, № 6. P. 801–814.
157. Yao X. et al. Tild-CRISPR Allows for Efficient and Precise Gene Knockin in Mouse and Human Cells. // *Dev Cell. Elsevier Inc.*, 2018. Vol. 45, № 4. P. 526-536.e5.
158. Sakuma T. et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. // *Nat Protoc. England*, 2016. Vol. 11, № 1. P. 118–133.
159. Artegiani B. et al. Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR–Cas9 precision genome editing. // *Nat Cell Biol. Nature Research*, 2020. Vol. 22, № 3. P. 321–331.

160. Lau C.-H., Tin C., Suh Y. CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction. // *Fac Rev.* 2020. Vol. 9, № 20.
161. Zetsche B. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. // *Cell.* United States, 2015. Vol. 163, № 3. P. 759–771.
162. Zhao Z. et al. Ligation-assisted homologous recombination enables precise genome editing by deploying both MMEJ and HDR. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2022. Vol. 50, № 11. P. E62.
163. Cruz-Becerra G., Kadonaga J.T. Enhancement of homology-directed repair with chromatin donor templates in cells. // *Elife.* 2020. Vol. 9. P. 1–12.
164. Carlson-Stevermer J. et al. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. // *Nat Commun.* Springer US, 2017. Vol. 8, № 1.
165. Ma M. et al. Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxp alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. // *Cell Res.* 2017. Vol. 27, № 4. P. 578–581.
166. Savic N. et al. Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. // *Elife.* England, 2018. Vol. 7. № 29. P. e33761.
167. Reardon S. Step aside CRISPR, RNA editing is taking off. // *Nature.* England, 2020. Vol. 578, № 7793. P. 24–27.
168. Lada A.G. et al. Mutator effects and mutation signatures of editing deaminases produced in bacteria and yeast. // *Biochemistry (Moscow).* 2011. Vol. 76, № 1. P. 131–146.
169. Kohli R.M. et al. Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. // *Journal of Biological Chemistry.* 2010. Vol. 285, № 52. P. 40956–40964.
170. Conticello S.G. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. // *Genome Biol.* 2008. Vol. 9, № 6.
171. Komor A.C. et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. // *Nature.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 533, № 7603. P. 420–424.
172. Hou S. et al. Structural basis of substrate specificity in human cytidine deaminase family APOBEC3s. // *Journal of Biological Chemistry.* Elsevier B.V, 2021. Vol. 297, № 2. P. 100909.
173. Ziegler S.J. et al. Insights into DNA substrate selection by APOBEC3G from structural, biochemical, and functional studies. // *PLoS One.* 2018. Vol. 13, № 3. P. 1–18.
174. Lee S. et al. Single C-to-T substitution using engineered APOBEC3G-nCas9 base editors with minimum genome- And transcriptome-wide off-target effects. // *Sci Adv.* 2020. Vol. 6, № 29.
175. Wang X. et al. Efficient base editing in methylated regions with a human apobec3a-cas9 fusion. // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 36, № 10. P. 946.

176. Gehrke J.M. et al. An apobec3a-cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 36, № 10. P. 977.
177. Tan J. et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes. // *Trends Genet.* England, 2022. Vol. 38, № 11. P. 1147–1169.
178. Nishida K. et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. // *Science.* United States, 2016. Vol. 353, № 6305. P. aaf8729.
179. Ma Y. et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. // *Nat Methods.* 2016. Vol. 13, № 12. P. 1029–1035.
180. Jeong Y.K., Song B., Bae S. Current Status and Challenges of DNA Base Editing Tools. // *Molecular Therapy.* Elsevier Ltd., 2020. Vol. 28, № 9. P. 1938–1952.
181. Pearl L.H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. // *Mutat Res.* Netherlands, 2000. Vol. 460, № 3–4. P. 165–181.
182. Nambiar T.S. et al. CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. // *Mol Cell.* United States, 2022. Vol. 82, № 2. P. 348–388.
183. Komor A.C. et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. // *Sci Adv.* 2017. Vol. 3, № 8. P. 1–10.
184. Koblan L.W. et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 36, № 9. P. 843–848.
185. Yu S.-Y. et al. Increasing the Targeting Scope of CRISPR Base Editing System Beyond NGG. // *CRISPR J.* United States, 2022. Vol. 5, № 2. P. 187–202.
186. Kim Y.B. et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. // *Nat Biotechnol.* United States, 2017. Vol. 35, № 4. P. 371–376.
187. Nishimasu H. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. // *Science.* United States, 2018. Vol. 361, № 6408. P. 1259–1262.
188. Miller S.M. et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. // *Nat Biotechnol.* United States, 2020. Vol. 38, № 4. P. 471–481.
189. Kleinstiver B.P. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. // *Nature.* 2015. Vol. 523, № 7561. P. 481–485.
190. Ran F.A. et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. // *Nature.* England, 2015. Vol. 520, № 7546. P. 186–191.
191. Kleinstiver B.P. et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 33, № 12. P. 1293–1298.

192. Hu J.H. et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. // *Nature*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 556, № 7699. P. 57–63.
193. Liu Z. et al. Efficient base editing with expanded targeting scope using an engineered Spy-mac Cas9 variant. // *Cell Discov*. Springer US, 2019. Vol. 5, № 1. P. 3.
194. Huang T.P. et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2019. Vol. 37, № 6. P. 626–631.
195. Li X. et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. // *Nat Biotechnol*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 36, № 4. P. 324–327.
196. Xu X. et al. Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing. // *Mol Cell*. Elsevier Inc., 2021. Vol. 81, № 20. P. 4333-4345.e4.
197. Rees H.A. et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. // *Sci Adv*. United States, 2019. Vol. 5, № 5. P. eaax5717.
198. Gaudelli N.M. et al. Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. // *Nat Biotechnol*. 2020. Vol. 38, № 7. P. 892–900.
199. Kim D. et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. // *Nat Biotechnol*. 2017. Vol. 35, № 5. P. 475–480.
200. Liang P. et al. Genome-wide profiling of adenine base editor specificity by EndoV-seq. // *Nat Commun*. 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–9.
201. Yu Y. et al. Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity. // *Nat Commun*. England, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–10.
202. Doman J.L. et al. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2020. Vol. 38, № 5. P. 620–628.
203. Chu S.H. et al. Rationally Designed Base Editors for Precise Editing of the Sickle Cell Disease Mutation. // <https://home.liebertpub.com/crispr>. Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2021. Vol. 4, № 2. P. 169–177.
204. Liu Y. et al. A Cas-embedding strategy for minimizing off-target effects of DNA base editors. // *Nat Commun*. Springer US, 2020. Vol. 11, № 1. P. 6073.
205. Liu Z. et al. Efficient base editing with high precision in rabbits using YFE-BE4max. // *Cell Death Dis*. Springer US, 2020. Vol. 11, № 1.
206. Zhang X. et al. Increasing the efficiency and targeting range of cytidine base editors through fusion of a single-stranded DNA-binding protein domain. // *Nat Cell Biol*. Springer US, 2020. Vol. 22, № 6. P. 740–750.
207. Jiang W. et al. BE-PLUS: A new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. // *Cell Res*. Springer US, 2018. Vol. 28, № 8. P. 855–861.
208. Liu Z. et al. Precise base editing with CC context-specificity using engineered human APOBEC3G-nCas9 fusions. // *BMC Biol*. BMC Biology, 2020. Vol. 18, № 1. P. 1–14.

209. Tan J. et al. Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. // *Nat Commun. England*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 629.
210. Li A. et al. Cytosine base editing systems with minimized off-target effect and molecular size. // *Nat Commun. Springer US*, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–8.
211. Liu Z. et al. Improved base editor for efficient editing in GC contexts in rabbits with an optimized AID-Cas9 fusion. // *FASEB Journal*. 2019. Vol. 33, № 8. P. 9210–9219.
212. Tan J. et al. Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. // *Nat Commun. England*, 2019. Vol. 10, № 1. P. 439.
213. Cheng T.L. et al. Expanding C–T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. // *Nat Commun. Springer US*, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–10.
214. Halperin S.O. et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window. // *Nature. England*, 2018. Vol. 560, № 7717. P. 248–252.
215. Tou C.J., Schaffer D. V, Dueber J.E. Targeted Diversification in the *S. cerevisiae* Genome with CRISPR-Guided DNA Polymerase I. // *ACS Synth Biol. United States*, 2020. Vol. 9, № 7. P. 1911–1916.
216. Hess G.T. et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. // *Nat Methods*. 2016. Vol. 13, № 12. P. 1036–1042.
217. Devilder M.C. et al. Ex vivo evolution of human antibodies by CRISPR-X: From a naive B cell repertoire to affinity matured antibodies. // *BMC Biotechnol. BMC Biotechnology*, 2019. Vol. 19, № 1. P. 1–13.
218. McCann J.L. et al. MagnEdit-interacting factors that recruit DNA-editing enzymes to single base targets. // *Life Sci Alliance*. 2020. Vol. 3, № 4. P. 1–9.
219. Gaudelli N.M. et al. Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. // *Nature. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 551, № 7681. P. 464–471.
220. Ryu S.-M. et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. // *Nat Biotechnol. United States*, 2018. Vol. 36, № 6. P. 536–539.
221. Zhou C. et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. // *Nature. Springer US*, 2019. Vol. 571, № 7764. P. 275–278.
222. Chatterjee P., Jakimo N., Jacobson J.M. Minimal PAM specificity of a highly similar SpCas9 ortholog. // *Sci Adv*. 2018. Vol. 4, № 10. P. 1–11.
223. Yang L. et al. Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. // *Protein Cell*. 2018. Vol. 9, № 9. P. 814–819.
224. Richter M.F. et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. // *Nat Biotechnol. United States*, 2020. Vol. 38, № 7. P. 883–891.
225. Grünewald J. et al. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. // *Nat Biotechnol*. 2019. Vol. 37, № 9. P. 1041–1048.



226. Grünewald J. et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. // *Nature*. Springer US, 2019. Vol. 569, № 7756. P. 433–437.
227. Xu L. et al. Efficient precise in vivo base editing in adult dystrophic mice. // *Nat Commun*. 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–14.
228. Zhao D. et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. // *Nat Biotechnol*. 2021. Vol. 39, № 1. P. 35–40.
229. Kurt I.C. et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. // *Nat Biotechnol*. 2021. Vol. 39, № 1. P. 41–46.
230. Chen L. et al. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins. // *Nat Commun*. Springer US, 2021. Vol. 12, № 1. P. 1384.
231. Koblan L.W. et al. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2021. Vol. 39, № 11. P. 1414–1425.
232. Zeman M.K., Cimprich K.A. Causes and consequences of replication stress. // *Nat Cell Biol*. England, 2014. Vol. 16, № 1. P. 2–9.
233. de Moraes M.H. et al. An interbacterial dna deaminase toxin directly mutagenizes surviving target populations. // *Elife*. 2021. Vol. 10. P. 1–78.
234. Mok B.Y. et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. // *Nature*. England, 2020. Vol. 583, № 7817. P. 631–637.
235. Guo J. et al. DdCBE mediates efficient and inheritable modifications in mouse mitochondrial genome. // *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022. Vol. 27, № March. P. 73–80.
236. URL: <https://www.mitomap.org/MITOMAP> [Electronic resource].
237. Gammage P.A., Moraes C.T., Minczuk M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-Ized. // *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 2018. Vol. 34, № 2. P. 101–110.
238. Cho S.I. et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. // *Cell*. The Authors, 2022. Vol. 185, № 10. P. 1764-1776.e12.
239. Fu J. et al. Human cell based directed evolution of adenine base editors with improved efficiency. // *Nat Commun*. Springer US, 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–11.
240. Jeong Y.K. et al. Adenine base editor engineering reduces editing of bystander cytosines. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2021. Vol. 39, № 11. P. 1426–1433.
241. Wang L. et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations. // *Nat Cell Biol*. Springer US, 2021. Vol. 23, № 5. P. 552–563.
242. Zhang X. et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2020. Vol. 38, № 7. P. 856–860.
243. Li C. et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. // *Nat Biotechnol*. Springer US, 2020. Vol. 38, № 7. P. 875–882.

244. Grünewald J. et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing. // *Nat Biotechnol.* 2020. Vol. 38, № 7. P. 861–864.
245. Sakata R.C. et al. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations. // *Nat Biotechnol.* United States, 2020. Vol. 38, № 7. P. 865–869.
246. Xie J. et al. ACBE, a new base editor for simultaneous C-to-T and A-to-G substitutions in mammalian systems. // *BMC Biol.* England: BMC Biology, 2020. Vol. 18, № 1. P. 1–14.
247. Liang Y. et al. AGBE: A dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2022. Vol. 50, № 9. P. 5384–5399.
248. Kuscu C. et al. CRISPR-STOP: Gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. // *Nat Methods.* 2017. Vol. 14, № 7. P. 710–712.
249. Billon P. et al. CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. // *Mol Cell.* Elsevier Inc., 2017. Vol. 67, № 6. P. 1068-1079.e4.
250. Wang X. et al. Efficient Gene Silencing by Adenine Base Editor-Mediated Start Codon Mutation. // *Molecular Therapy.* 2020. Vol. 28, № 2. P. 431–440.
251. Lee C. et al. CRISPR-Pass: Gene Rescue of Nonsense Mutations Using Adenine Base Editors. // *Molecular Therapy.* Elsevier Ltd., 2019. Vol. 27, № 8. P. 1364–1371.
252. Gapinske M. et al. CRISPR-SKIP: Programmable gene splicing with single base editors. // *Genome Biol.* Genome Biology, 2018. Vol. 19, № 1. P. 1–11.
253. Anzalone A. V et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. // *Nature.* England, 2019. Vol. 576, № 7785. P. 149–157.
254. Landrum M.J. et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, № D1. P. D862–D868.
255. Anzalone A. V., Koblan L.W., Liu D.R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. // *Nature Biotechnology.* Nature Research, 2020. Vol. 38, № 7. P. 824–844.
256. Marzec M., Brąszewska-Zalewska A., Hensel G. Prime Editing: A New Way for Genome Editing. // *Trends Cell Biol.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 30, № 4. P. 257–259.
257. Jiang Y.Y. et al. Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. // *Genome Biol.* Genome Biology, 2020. Vol. 21, № 1. P. 1–10.
258. Jang H. et al. Application of prime editing to the correction of mutations and phenotypes in adult mice with liver and eye diseases. // *Nat Biomed Eng.* Springer US, 2022. Vol. 6, № 2. P. 181–194.
259. Schene I.F. et al. Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. // *Nat Commun.* England, 2020. Vol. 11, № 1. P. 5352.

260. Petri K. et al. CRISPR prime editing with ribonucleoprotein complexes in zebrafish and primary human cells. // *Nat Biotechnol.* United States, 2022. Vol. 40, № 2. P. 189–193.
261. Bosch J.A., Birchak G., Perrimon N. Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020. Vol. 118, № 1. P. 1–9.
262. Qian Y. et al. Efficient and precise generation of Tay-Sachs disease model in rabbit by prime editing system. // *Cell discovery.* England, 2021. Vol. 7, № 1. P. 50.
263. Lin Q. et al. Prime genome editing in rice and wheat. // *Nat Biotechnol.* Springer US, 2020. Vol. 38, № 5. P. 582–585.
264. Lu Y. et al. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. // *Plant Biotechnol J.* 2021. Vol. 19, № 3. P. 415–417.
265. Ferreira da Silva J. et al. Prime editing efficiency and fidelity are enhanced in the absence of mismatch repair. // *Nat Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–11.
266. Chen P.J. et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. // *Cell.* Cell Press, 2021. Vol. 184, № 22. P. 5635-5652.e29.
267. Aida T. et al. Prime editing primarily induces undesired outcomes in mice. // *bioRxiv.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.08.06.239723.
268. Averina O.A. et al. Comparative analysis of genome editors efficiency on a model of mice zygotes microinjection. // *Int J Mol Sci.* MDPI, 2021. Vol. 22, № 19. P. 10221.
269. Park S.-J. et al. Targeted mutagenesis in mouse cells and embryos using an enhanced prime editor. // *Genome Biol.* England, 2021. Vol. 22, № 1. P. 170.
270. Nelson J.W. et al. Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. // *Nat Biotechnol.* United States, 2022. Vol. 40, № 3. P. 402–410.
271. Velimirovic M. et al. Peptide fusion improves prime editing efficiency. // *Nat Commun.* England, 2022. Vol. 13, № 1. P. 3512.
272. Song M. et al. Generation of a more efficient prime editor 2 by addition of the Rad51 DNA-binding domain. // *Nat Commun.* England, 2021. Vol. 12, № 1. P. 5617.
273. Kweon J. et al. Engineered prime editors with PAM flexibility. // *Molecular Therapy.* Elsevier Ltd., 2021. Vol. 29, № 6. P. 2001–2007.
274. Li X. et al. Highly efficient prime editing by introducing same-sense mutations in pegRNA or stabilizing its structure. // *Nat Commun.* Springer US, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–9.
275. Liu Y. et al. Enhancing prime editing by Csy4-mediated processing of pegRNA. // *Cell Res.* 2021. Vol. 31, № 10. P. 1134–1136.
276. Zhang G. et al. Enhancement of prime editing via xrRNA motif-joined pegRNA. // *Nat Commun.* Springer US, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1856.
277. Li X. et al. Enhancing prime editing efficiency by modified pegRNA with RNA G-quadruplexes. // *J Mol Cell Biol.* 2022. Vol. 14, № 4. P. 12–15.

278. Anzalone A. V. et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. // *Nat Biotechnol. Nature Research*, 2022. Vol. 40, № 5. P. 731–740.
279. Yuan Q., Gao X. Multiplex base- and prime-editing with drive-and-process CRISPR arrays. // *Nat Commun. England: Springer US*, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–13.
280. Taha E.A., Lee J., Hotta A. Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: Trends and challenges. // *J Control Release. Netherlands*, 2022. Vol. 342. P. 345–361.
281. Yang W. et al. Progress of delivery methods for CRISPR-Cas9. // *Expert Opin Drug Deliv. England*, 2022. Vol. 19, № 8. P. 913–926.
282. Sato M. et al. Recent Advances and Future Perspectives of In Vivo Targeted Delivery of Genome-Editing Reagents to Germ Cells, Embryos, and Fetuses in Mice. // *Cells. Switzerland*, 2020. Vol. 9, № 4. P. 799.
283. Hasanzadeh A. et al. Smart Strategies for Precise Delivery of CRISPR/Cas9 in Genome Editing. // *ACS Appl Bio Mater. American Chemical Society*, 2022. Vol. 5, № 2. P. 413–437.
284. Fajrial A.K. et al. A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. // *Theranostics*. 2020. Vol. 10, № 12. P. 5532–5549.
285. Alapati D. et al. In utero gene editing for monogenic lung disease. // *Sci Transl Med. American Association for the Advancement of Science*, 2019. Vol. 11, № 488. P. eaav8375.
286. Lyu P., Wang L., Lu B. Virus-like particle mediated crispr/cas9 delivery for efficient and safe genome editing. // *Life*. 2020. Vol. 10, № 12. P. 1–16.
287. Averina O.A. et al. Simple recommendations for improving efficiency in generating genome-edited mice. // *Acta Naturae*. 2020. Vol. 12, № 1. P. 42–50.
288. Kaneko T. et al. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. // *Sci Rep*. 2014. Vol. 4. P. 1–5.
289. Namba M. et al. GONAD: A new method for germline genome editing in mice and rats. // *Dev Growth Differ. Japan*, 2021. Vol. 63, № 8. P. 439–447.
290. Gurusurthy C.B. et al. Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. // *Nature Protocols. Springer US*, 2019. Vol. 14, № 8. P. 2452–2482.
291. Chang L. et al. 3D nanochannel electroporation for high-throughput cell transfection with high uniformity and dosage control. // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, № 1. P. 243–252.
292. Nakamura S. et al. Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses. // *IUBMB Life. England*, 2019. Vol. 71, № 7. P. 835–844.
293. Sharei A. et al. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. // *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*, 2013. Vol. 110, № 6. P. 2082–2087.

294. Han X. et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. // *Sci Adv*. 2015. Vol. 1, № 7. P. 1–9.
295. Ma Y. et al. Highly efficient genome editing of human hematopoietic stem cells via a nano-silicon-blade delivery approach. // *Integr Biol (Camb)*. England, 2017. Vol. 9, № 6. P. 548–554.
296. Yen J. et al. TRIAMF: A New Method for Delivery of Cas9 Ribonucleoprotein Complex to Human Hematopoietic Stem Cells. // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
297. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. // *Nature*. England, 2004. Vol. 431, № 7011. P. 931–945.
298. Omenn G.S. Reflections on the HUPO Human Proteome Project, the Flagship Project of the Human Proteome Organization, at 10 Years. // *Mol Cell Proteomics*. United States, 2021. Vol. 20. P. 100062.
299. Choi S.W., Kim H.W., Nam J.W. The small peptide world in long noncoding RNAs. // *Brief Bioinform*. 2019. Vol. 20, № 5. P. 1853–1864.
300. Ruiz-Orera J., Villanueva-Cañas J.L., Albà M.M. Evolution of new proteins from translated sORFs in long non-coding RNAs. // *Exp Cell Res*. United States, 2020. Vol. 391, № 1. P. 111940.
301. Yin X., Jing Y., Xu H. Mining for missed sORF-encoded peptides. // *Expert Rev Proteomics*. Taylor & Francis, 2019. Vol. 16, № 3. P. 257–266.
302. Plaza S., Menschaert G., Payre F. In Search of Lost Small Peptides. // *Annu Rev Cell Dev Biol*. United States, 2017. Vol. 33. P. 391–416.
303. Dragomir M.P. et al. FuncPEP: A Database of Functional Peptides Encoded by Non-Coding RNAs. // *Noncoding RNA*. 2020. Vol. 6, № 4. P. 41.
304. Zhao Y. et al. NONCODE 2016: An informative and valuable data source of long non-coding RNAs. // *Nucleic Acids Res*. 2016. Vol. 44, № D1. P. D203–D208.
305. Kopp F., Mendell J.T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. // *Cell*. Elsevier Inc., 2018. Vol. 172, № 3. P. 393–407.
306. Zhang X. et al. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. // *Int J Mol Sci*. Switzerland, 2019. Vol. 20, № 22. P. 5573.
307. Statello L. et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. England, 2021. Vol. 22, № 2. P. 96–118.
308. Quinn J.J., Chang H.Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. // *Nat Rev Genet*. England, 2016. Vol. 17, № 1. P. 47–62.
309. Ruiz-Orera J. et al. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. // *Elife*. England, 2014. Vol. 3. P. e03523.
310. Ji Z. et al. Many lncRNAs, 5'UTRs, and pseudogenes are translated and some are likely to express functional proteins. // *Elife*. 2015. Vol. 4, № DECEMBER2015. P. 1–21.
311. Wery M. et al. Nonsense-Mediated Decay Restricts LncRNA Levels in Yeast Unless Blocked by Double-Stranded RNA Structure. // *Mol Cell*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 61, № 3. P. 379–392.

312. Tan L. et al. Positive natural selection of N6-methyladenosine on the RNAs of processed pseudogenes. // *Genome Biol.* England, 2021. Vol. 22, № 1. P. 180.
313. Min K.-W. et al. eIF4E phosphorylation by MST1 reduces translation of a subset of mRNAs, but increases lncRNA translation. // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* Netherlands, 2017. Vol. 1860, № 7. P. 761–772.
314. Ross-Kaschitzka D., Altmann M. eIF4E and Interactors from Unicellular Eukaryotes. // *Int J Mol Sci.* Switzerland, 2020. Vol. 21, № 6. P. 2170.
315. Mercer T.R., Mattick J.S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. // *Nat Struct Mol Biol.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 20, № 3. P. 300–307.
316. Fatica A., Bozzoni I. Long non-coding RNAs: New players in cell differentiation and development. // *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 1. P. 7–21.
317. Zhao Y. et al. The effects of mitochondria-associated long noncoding RNAs in cancer mitochondria: New players in an old arena. // *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018. Vol. 131. P. 76–82.
318. van Heesch S. et al. The Translational Landscape of the Human Heart. // *Cell.* United States, 2019. Vol. 178, № 1. P. 242-260.e29.
319. Orr M.W. et al. Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome. // *Nucleic Acids Res.* England, 2020. Vol. 48, № 3. P. 1029–1042.
320. Kearse M.G., Wilusz J.E. Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. // *Genes Dev.* United States, 2017. Vol. 31, № 17. P. 1717–1731.
321. Ivanov I.P. et al. Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences. // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39, № 10. P. 4220–4234.
322. Cao X., Slavoff S.A. Non-AUG start codons: Expanding and regulating the small and alternative ORFeome. // *Exp Cell Res.* Elsevier Inc., 2020. Vol. 391, № 1. P. 111973.
323. Cridge A.G. et al. Eukaryotic translational termination efficiency is influenced by the 3' nucleotides within the ribosomal mRNA channel. // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2018. Vol. 46, № 4. P. 1927–1944.
324. Zacharias D.G. et al. Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic [corrected] plaques in humans. // *PLoS One.* United States, 2012. Vol. 7, № 2. P. e31065.
325. Zhang M. et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. // *Oncogene.* Springer US, 2018. Vol. 37, № 13. P. 1805–1814.
326. Qin Q. et al. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. // *Int J Cardiol.* Netherlands, 2018. Vol. 254. P. 23–27.
327. Zheng X. et al. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer via Hippo-YAP signaling. // *Mol Cancer.* Molecular Cancer, 2019. Vol. 18, № 1. P. 1–13.

328. Calvo S.E., Pagliarini D.J., Mootha V.K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Vol. 106, № 18. P. 7507–7512.
329. Kute P.M. et al. Small Open Reading Frames, How to Find Them and Determine Their Function. // *Front Genet*. 2022. Vol. 12, № January. P. 1–15.
330. Ma J. et al. Discovery of human sORF-encoded polypeptides (SEPs) in cell lines and tissue. // *J Proteome Res*. 2014. Vol. 13, № 3. P. 1757–1765.
331. Zhang S. et al. Mitochondrial peptide BRAWNIN is essential for vertebrate respiratory complex III assembly. // *Nat Commun*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 1312.
332. Aspden J.L. et al. xtensive translation of small Open Reading Frames revealed by Poly-Ribo-Seq. // *Elife*. eLife Sciences Publications Ltd, 2014. Vol. 3, № 21. P. e03528.
333. Sergiev P. V, Rubtsova M.P. Little but Loud. The Diversity of Functions of Small Proteins and Peptides - Translational Products of Short Reading Frames. // *Biochemistry (Mosc)*. United States, 2021. Vol. 86, № 9. P. 1139–1150.
334. Makarewich C.A. The hidden world of membrane microproteins. // *Exp Cell Res*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 388, № 2. P. 111853.
335. Sousa M.E., Farkas M.H. Micropeptide. // *PLoS Genet*. United States, 2018. Vol. 14, № 12. P. e1007764.
336. Vitorino R. et al. The role of micropeptides in biology. // *Cell Mol Life Sci*. Switzerland, 2021. Vol. 78, № 7. P. 3285–3298.
337. Herberg S. et al. The Ly6/uPAR protein Bouncer is necessary and sufficient for species-specific fertilization. // *Science*. 2018. Vol. 361, № 6406. P. 1029–1033.
338. Ray S. et al. The mlpt/Ubr3/Svb module comprises an ancient developmental switch for embryonic patterning. // *Elife*. England, 2019. Vol. 8.
339. Fu H. et al. A Nodal enhanced micropeptide NEMEP regulates glucose uptake during mesendoderm differentiation of embryonic stem cells. // *Nat Commun*. Springer US, 2022. Vol. 13, № 1. P. 1–17.
340. Jackson R. et al. The translation of non-canonical open reading frames controls mucosal immunity. // *Nature*. Springer US, 2018. Vol. 564, № 7736. P. 434–438.
341. Chng S.C. et al. ELABELA: A hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. // *Dev Cell*. Elsevier Inc., 2013. Vol. 27, № 6. P. 672–680.
342. Qurashi A. et al. HSPC300 and its role in neuronal connectivity. // *Neural Dev*. England, 2007. Vol. 2. P. 18.
343. Magny E.G. et al. Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. // *Science*. Science, 2013. Vol. 341, № 6150. P. 1116–1120.

344. Anderson D.M. et al. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. // *Sci Signal*. American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 9, № 457.
345. Nelson B.R. et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. // *Science*. United States, 2016. Vol. 351, № 6270. P. 271–275.
346. Rion N., Rüegg M.A. LncRNA-encoded peptides: More than translational noise? // *Cell Res*. England, 2017. Vol. 27, № 5. P. 604–605.
347. Tajbakhsh S. lncRNA-Encoded Polypeptide SPAR(s) with mTORC1 to Regulate Skeletal Muscle Regeneration. // *Cell Stem Cell*. United States, 2017. Vol. 20, № 4. P. 428–430.
348. Zhang Q. et al. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. // *Nat Commun*. 2017. Vol. 8. P. 15664.
349. Yang Y. et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine. // *Cell Res*. England, 2017. Vol. 27, № 5. P. 626–641.
350. Khitun A., Ness T.J., Slavoff S.A. Small open reading frames and cellular stress responses. // *Mol Omics*. Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 15, № 2. P. 108–116.
351. Bhatta A. et al. A Mitochondrial Micropeptide Is Required for Activation of the Nlrp3 Inflammasome. // *The Journal of Immunology*. 2020. Vol. 204, № 2. P. 428–437.
352. Niu L. et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. // *Sci Adv*. United States, 2020. Vol. 6, № 21. P. eaaz2059.
353. Mehta H.H. et al. Metabolomic profile of diet-induced obesity mice in response to humanin and small humanin-like peptide 2 treatment. // *Metabolomics*. Springer US, 2019. Vol. 15, № 6. P. 1–12.
354. Merry T.L. et al. Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020. Vol. 319, № 4. P. E659–E666.
355. Miller B. et al. Mitochondria-derived peptides in aging and healthspan. // *Journal of Clinical Investigation*. 2022. Vol. 132, № 9. P. 1–9.
356. Svendsen J.S.M. et al. Very Short and Stable Lactoferricin-Derived Antimicrobial Peptides: Design Principles and Potential Uses. // *Acc Chem Res*. United States, 2019. Vol. 52, № 3. P. 749–759.
357. Guo B. et al. Micropeptide CIP2A-BP encoded by LINC00665 inhibits triple-negative breast cancer progression. // *EMBO J*. England, 2020. Vol. 39, № 1. P. e102190.
358. Ye M. et al. Emerging role of long noncoding RNA-encoded micropeptides in cancer. // *Cancer Cell Int*. BioMed Central, 2020. Vol. 20. P. 506.
359. Wu S. et al. A novel micropeptide encoded by y-linked LINC00278 links cigarette smoking and ar signaling in male esophageal squamous cell carcinoma. // *Cancer Res*. 2020. Vol. 80, № 13. P. 2790–2803.



360. Nashine S., Kenney M.C. Effects of Mitochondrial-Derived Peptides (MDPs) on Mitochondrial and Cellular Health in AMD. // *Cells*. Switzerland, 2020. Vol. 9, № 5. P. 1102.
361. Thiankhaw K. et al. Roles of humanin and derivatives on the pathology of neurodegenerative diseases and cognition. // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. Netherlands, 2022. Vol. 1866, № 4. P. 130097.
362. Dabravolski S.A. et al. The role of mitochondria-derived peptides in cardiovascular diseases and their potential as therapeutic targets. // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 16. P. 8770.
363. Rochette L. et al. Mitochondrial-derived peptides: New markers for cardiometabolic dysfunction. // *Arch Cardiovasc Dis*. Netherlands, 2022. Vol. 115, № 1. P. 48–56.
364. Wu Y. et al. Mitochondrial-Derived Peptides in Diabetes and Its Complications. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. Vol. 12, № 3. P. 808120.
365. Li S. et al. MOTS-c and Exercise Restore Cardiac Function by Activating of NRG1-ErbB Signaling in Diabetic Rats. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. Vol. 13, № 17. P. 812032.
366. Kaorop W. et al. Mitochondrial-derived peptides as a novel intervention for obesity and cardiac diseases: bench evidence for potential bedside application. // *J Clin Pathol*. BMJ Publishing Group, 2022. Vol. 75, № 11. P. 724–730.
367. Woodhead J.S.T., Merry T.L. Mitochondrial-derived peptides and exercise. // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. Elsevier B.V., 2021. Vol. 1865, № 12. P. 130011.
368. Zhu S. et al. The Molecular Structure and Role of Humanin in Neural and Skeletal Diseases, and in Tissue Regeneration. // *Front Cell Dev Biol*. 2022. Vol. 10, № March. P. 1–11.
369. El Kattawy H.A., Abozaid E.R., Abdullah D.M. Humanin Ameliorates Late-onset Hypogonadism in Aged Male Rats. // *Curr Mol Pharmacol*. Bentham Science Publishers Ltd., 2022. Vol. 15, № 7. P. 996–1008.
370. Mercer T.R. et al. The human mitochondrial transcriptome. // *Cell*. 2011. Vol. 100, № 2. P. 130–134.
371. Rath S. et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. // *Nucleic Acids Res*. England, 2021. Vol. 49, № D1. P. D1541–D1547.
372. Zheng X., Xiang M. Mitochondrion-located peptides and their pleiotropic physiological functions. // *FEBS J*. England, 2022. Vol. 289, № 22. P. 6919–6935.
373. Mottis A., Herzig S., Auwerx J. Mitocellular communication: Shaping health and disease. // *Science*. United States, 2019. Vol. 366, № 6467. P. 827–832.
374. Backes S., Herrmann J.M. Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: Mechanisms and driving forces. // *Front Mol Biosci*. 2017. Vol. 4, № 7. P. 83.
375. Rissler M. et al. The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. // *J Mol Biol*. Netherlands, 2005. Vol. 353, № 3. P. 485–492.

376. Hashimoto Y. et al. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. // *Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21, № 23. P. 9235–9245.
377. Hashimoto Y. et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A $\beta$ . // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. Vol. 98, № 11. P. 6336–6341.
378. Guo B. et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. // *Nature*. 2003. Vol. 423, № 6938. P. 456–461.
379. Ikonen M. et al. Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Vol. 100, № 22. P. 13042–13047.
380. Hashimoto Y. et al. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. // *Mol Biol Cell*. United States, 2009. Vol. 20, № 12. P. 2864–2873.
381. Kim S.-J. et al. The mitochondrial-derived peptide humanin activates the ERK1/2, AKT, and STAT3 signaling pathways and has age-dependent signaling differences in the hippocampus. // *Oncotarget*. United States, 2016. Vol. 7, № 30. P. 46899–46912.
382. Cobb L.J. et al. Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. // *Aging*. United States, 2016. Vol. 8, № 4. P. 796–809.
383. Lee C. et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. // *Cell Metab*. Elsevier Inc., 2015. Vol. 21, № 3. P. 443–454.
384. Kim K.H. et al. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. // *Cell Metab*. 2018. Vol. 28, № 3. P. 516-524.e7.
385. Benayoun B.A., Lee C. MOTS-c: A Mitochondrial-Encoded Regulator of the Nucleus. // *Bioessays*. United States, 2019. Vol. 41, № 9. P. e1900046.
386. Chu Q. et al. Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein. // *Nat Commun*. Springer US, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–13.
387. Rathore A. et al. MIEF1 Microprotein Regulates Mitochondrial Translation. // *Biochemistry*. United States, 2018. Vol. 57, № 38. P. 5564–5575.
388. Do V.D. et al. The novel conserved NAD<sup>+</sup>-binding micropeptide SGHRT regulates mitochondrial function and metabolism in human cardiomyocytes. // *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2021.10.24.465637.
389. Zaheed O. et al. Exploring Evidence of Non-coding RNA Translation With Trips-Viz and GWIPS-Viz Browsers. // *Front Cell Dev Biol*. 2021. Vol. 9, № 12. P. 703374.

390. Austin S., St-Pierre J. PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. // *J Cell Sci.* England, 2012. Vol. 125, № Pt 21. P. 4963–4971.
391. Sun L. et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States, 2013. Vol. 110, № 9. P. 3387–3392.
392. Fain J.N., Shepherd R.E. Free fatty acids as feedback regulators of adenylate cyclase and cyclic 3':5' AMP accumulation in rat fat cells. // *Journal of Biological Chemistry.* © 1975 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 1975. Vol. 250, № 16. P. 6586–6592.
393. Jiang L., Li Z., Wang R. Long non-coding rnas in lung cancer: Regulation patterns, biologic function and diagnosis implications (review). // *Int J Oncol.* 2019. Vol. 55, № 3. P. 585–596.
394. Yang J. et al. LncRNAs in tumor metabolic reprogramming and immune microenvironment remodeling. // *Cancer Lett.* Ireland, 2022. Vol. 543. P. 215798.
395. Huang Q. et al. LYRM2 directly regulates complex I activity to support tumor growth in colorectal cancer by oxidative phosphorylation. // *Cancer Lett.* Elsevier, 2019. Vol. 455, № January. P. 36–47.
396. Polycarpou-Schwarz M. et al. The cancer-associated microprotein CASIMO1 controls cell proliferation and interacts with squalene epoxidase modulating lipid droplet formation. // *Oncogene.* England, 2018. Vol. 37, № 34. P. 4750–4768.
397. Lai Y. et al. LINC00116 enhances cervical cancer tumorigenesis through miR-106a/c-Jun pathway. // *J Cell Biochem.* 2020. Vol. 121, № 3. P. 2247–2257.
398. Chen S. et al. LINC00116 Is a Novel Prognostic Biomarker of Nonsmall Cell Lung Cancer. // *Genet Test Mol Biomarkers.* 2022. Vol. 26, № 6. P. 340–347.
399. Xiao M.H. et al. Downregulation of a mitochondrial micropeptide, MPM, promotes hepatoma metastasis by enhancing mitochondrial complex I activity. // *Molecular Therapy.* The American Society of Gene and Cell Therapy, 2022. Vol. 30, № 2. P. 714–725.
400. Shi C. et al. Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization via governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways. // *Redox Biol.* Netherlands, 2018. Vol. 14. P. 59–71.
401. Jin T. et al. Mitochondrial metabolic reprogramming: An important player in liver cancer progression. // *Cancer Lett.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 470. P. 197–203.
402. Rambani V. et al. Mitochondria and mitochondrial disorders: an overview update. // *Endocr Regul.* Germany, 2022. Vol. 56, № 3. P. 232–248.
403. Khotina V.A. et al. Creation of Mitochondrial Disease Models Using Mitochondrial DNA Editing. // *Biomedicines.* 2023. Vol. 11, № 2. P. 532.
404. Dogan S.A., Trifunovic A. Modelling mitochondrial dysfunction in mice. // *Physiol Res.* 2011. Vol. 60, № Suppl 1. P. S61-70.

405. Mayr J.A. et al. Spectrum of combined respiratory chain defects. // *J Inherit Metab Dis*. 2015. Vol. 38, № 4. P. 629–640.
406. Martin A.R. et al. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. // *Nat Genet*. Springer US, 2019. Vol. 51, № 11. P. 1560–1565.
407. Torraco A. et al. Mitochondrial Diseases Part I: mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. // *Mitochondrion*. Netherlands, 2015. Vol. 21. P. 76–91.
408. Rodenburg R.J. Mitochondrial complex I-linked disease. // *Biochim Biophys Acta*. Netherlands, 2016. Vol. 1857, № 7. P. 938–945.
409. Fernandez-Vizarra E., Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. // *FEBS Lett*. 2021. Vol. 595, № 8. P. 1062–1106.
410. Loeffen J. et al. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. // *Am J Hum Genet*. 1998. Vol. 63, № 6. P. 1598–1608.
411. Chang X. et al. A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations. // *Medicine*. 2020. Vol. 99, № 5. P. e18634.
412. Lee J.S. et al. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome: Highlighting treatable and novel genetic causes. // *Clin Genet*. 2020. Vol. 97, № 4. P. 586–594.
413. Distelmaier F. et al. Mitochondrial complex I deficiency: From organelle dysfunction to clinical disease. // *Brain*. 2009. Vol. 132, № 4. P. 833–842.
414. Ghezzi D., Zeviani M. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. // *Essays Biochem*. 2018. Vol. 62, № 3. P. 271–286.
415. van Rahden V.A. et al. Mutations in NDUFB11, encoding a complex I component of the mitochondrial respiratory chain, cause microphthalmia with linear skin defects syndrome. // *Am J Hum Genet*. United States, 2015. Vol. 96, № 4. P. 640–650.
416. Koene S. et al. Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: What we learned from 130 cases. // *J Inherit Metab Dis*. 2012. Vol. 35, № 5. P. 737–747.
417. Kumar S. et al. TimeTree 5: An Expanded Resource for Species Divergence Times. // *Mol Biol Evol*. Oxford University Press, 2022. Vol. 39, № 8. P. 6.
418. Eppig J.T. et al. Mouse Genome Database: From sequence to phenotypes and disease models. // *Genesis*. 2015. Vol. 53, № 8. P. 458–473.
419. Law M., Shaw D.R. Mouse Genome Informatics (MGI) Is the International Resource for Information on the Laboratory Mouse. // *Methods Mol Biol*. United States, 2018. Vol. 1757. P. 141–161.
420. Pennacchio L.A. Insights from human/mouse genome comparisons. // *Mamm Genome*. United States, 2003. Vol. 14, № 7. P. 429–436.

421. Amberger J.S., Hamosh A. Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes. // *Curr Protoc Bioinformatics*. John Wiley and Sons Inc., 2017. Vol. 2017. P. 1.2.1-1.2.12.
422. Amberger J.S. et al. OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. // *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press, 2019. Vol. 47, № D1. P. D1038–D1043.
423. Hughes B.G., Hekimi S. A mild impairment of mitochondrial electron transport has sex-specific effects on lifespan and aging in mice. // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 10. P. e26116.
424. Larsson N.G. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. // *Nat Genet*. United States, 1998. Vol. 18, № 3. P. 231–236.
425. Zurita Rendón O. et al. The arginine methyltransferase NDUFAF7 is essential for complex I assembly and early vertebrate embryogenesis. // *Hum Mol Genet*. 2014. Vol. 23, № 19. P. 5159–5170.
426. Taylor M.R. et al. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, 2004. Vol. 101, № 13. P. 4584–4589.
427. Nenni M.J. et al. Xenbase: Facilitating the Use of *Xenopus* to Model Human Disease. // *Front Physiol*. Switzerland, 2019. Vol. 10. P. 154.
428. Naert T., Vleminckx K. CRISPR/Cas9 disease models in zebrafish and *Xenopus*: The genetic renaissance of fish and frogs. // *Drug Discov Today Technol*. England, 2018. Vol. 28. P. 41–52.
429. Menegola E. et al. Advantages and disadvantages of the use of *Xenopus laevis* embryos and zebra fish as alternative methods to assess teratogens. // *Curr Opin Toxicol*. 2023. Vol. 34. P. 100387.
430. Zeng S.L., Sudlow L.C., Berezin M.Y. Using *Xenopus* oocytes in neurological disease drug discovery. // *Expert Opin Drug Discov*. 2020. Vol. 15, № 1. P. 39–52.
431. Langova V. et al. The Role of Zebrafish and Laboratory Rodents in Schizophrenia Research. // *Front Psychiatry*. 2020. Vol. 11, № August. P. 1–22.
432. Thiagarajan S.K. et al. Receptor-Mediated AKT/PI3K Signalling and Behavioural Alterations in Zebrafish Larvae Reveal Association between Schizophrenia and Opioid Use Disorder. // *Int J Mol Sci*. Switzerland, 2022. Vol. 23, № 9. P. 4715.
433. Tayanloo-Beik A. et al. Zebrafish Modeling of Autism Spectrum Disorders, Current Status and Future Prospective. // *Front Psychiatry*. Switzerland, 2022. Vol. 13. P. 911770.
434. Ruzzenente B., Rötig A., Metodiev M.D. Mouse models for mitochondrial diseases. // *Hum Mol Genet*. England, 2016. Vol. 25, № R2. P. R115–R122.
435. Wallace D.C. Mouse models for mitochondrial disease. // *Am J Med Genet*. United States, 2001. Vol. 106, № 1. P. 71–93.

436. Ishikawa K., Nakada K. Attempts to understand the mechanisms of mitochondrial diseases: The reverse genetics of mouse models for mitochondrial disease. // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021. Vol. 1865, № 3. P. 129835.
437. Quadalti C. et al. SURF1 knockout cloned pigs: Early onset of a severe lethal phenotype. // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. Netherlands, 2018. Vol. 1864, № 6 Pt A. P. 2131–2142.
438. Steele S.L., Prykhozhiy S. V, Berman J.N. Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases. // *Transl Res*. United States, 2014. Vol. 163, № 2. P. 79–98.
439. do Amaral M.A. et al. Mitochondrial connections with immune system in Zebrafish. // *Fish and Shellfish Immunology Reports*. 2021. Vol. 2. P. 100019.
440. Maglioni S., Ventura N. C. *elegans* as a model organism for human mitochondrial associated disorders. // *Mitochondrion*. Elsevier, 2016. Vol. 30. P. 117–125.
441. Sen A., Cox R.T. Fly Models of Human Diseases: *Drosophila* as a Model for Understanding Human Mitochondrial Mutations and Disease. // *Curr Top Dev Biol*. United States, 2017. Vol. 121. P. 1–27.
442. Baile M.G., Claypool S.M. The power of yeast to model diseases of the powerhouse of the cell. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. Singapore, 2013. Vol. 18, № 1. P. 241–278.
443. Garrido-Maraver J. et al. Screening of effective pharmacological treatments for MELAS syndrome using yeasts, fibroblasts and cybrid models of the disease. // *Br J Pharmacol*. 2012. Vol. 167, № 6. P. 1311–1328.
444. Sinsheimer A. et al. Development and characterization of a mouse model for Acad9 deficiency. // *Mol Genet Metab*. United States, 2021. Vol. 134, № 1–2. P. 156–163.
445. Dickinson M.E. et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. // *Nature*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 537, № 7621. P. 508–514.
446. Kruse S.E. et al. Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy. // *Cell Metab*. 2008. Vol. 7, № 4. P. 312–320.
447. Leong D.W. et al. Proteomic and metabolomic analyses of mitochondrial complex I-deficient mouse model generated by spontaneous B2 short interspersed nuclear element (SINE) insertion into NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) gene. // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, № 24. P. 20652–20663.
448. van de Wal M.A.E. et al. Ndufs4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention. // *Brain*. England, 2022. Vol. 145, № 1. P. 45–63.
449. Quintana A. et al. Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. // *J Clin Invest*. United States, 2012. Vol. 122, № 7. P. 2359–2368.
450. Sterky F.H. et al. Altered dopamine metabolism and increased vulnerability to MPTP in mice with partial deficiency of mitochondrial complex I in dopamine neurons. // *Hum Mol Genet*. England, 2012. Vol. 21, № 5. P. 1078–1089.

451. Karamanlidis G. et al. Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. // *Cell Metab.* Elsevier Inc., 2013. Vol. 18, № 2. P. 239–250.
452. Ingraham C.A. et al. NDUFS4: Creation of a mouse model mimicking a Complex I disorder. // *Mitochondrion.* Mitochondria Research Society, 2009. Vol. 9, № 3. P. 204–210.
453. Ke B.X. et al. Tissue-specific splicing of an Ndufs6 gene-trap insertion generates a mitochondrial complex I deficiency-specific cardiomyopathy. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. Vol. 109, № 16. P. 6165–6170.
454. Forbes J.M. et al. Deficiency in mitochondrial complex I Activity Due to Ndufs6 gene trap insertion induces renal disease. // *Antioxid Redox Signal.* 2013. Vol. 19, № 4. P. 331–343.
455. Grad L.I., Lemire B.D. Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. // *Hum Mol Genet.* 2004. Vol. 13, № 3. P. 303–314.
456. Qi X. et al. SOD2 gene transfer protects against optic neuropathy induced by deficiency of complex I. // *Ann Neurol.* United States, 2004. Vol. 56, № 2. P. 182–191.
457. Huang G. et al. GRIM-19, a Cell Death Regulatory Protein, Is Essential for Assembly and Function of Mitochondrial Complex I. // *Mol Cell Biol.* 2004. Vol. 24, № 19. P. 8447–8456.
458. Kohda M. et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. // *PLoS Genet.* United States, 2016. Vol. 12, № 1. P. e1005679.
459. Arsenijevic D. et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. // *Nat Genet.* United States, 2000. Vol. 26, № 4. P. 435–439.
460. Zhang C.Y. et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity,  $\beta$  cell dysfunction, and type 2 diabetes. // *Cell.* 2001. Vol. 105, № 6. P. 745–755.
461. Conti B. et al. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. // *Science.* 2006. Vol. 314, № 5800. P. 825–828.
462. Enerbäck S et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. // *Nature.* 1997. Vol. 387. P. 90.
463. Vidal-Puig A.J. et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. // *J Biol Chem.* United States, 2000. Vol. 275, № 21. P. 16258–16266.
464. Johnson M.T. et al. Inactivation of the Murine Pyruvate Dehydrogenase (Pdha1) Gene and Its Effect on Early Embryonic Development. // *Mol Genet Metab.* Academic Press, 2001. Vol. 74, № 3. P. 293–302.
465. Peng M. et al. Primary coenzyme Q deficiency in Pdss2 mutant mice causes isolated renal disease. // *PLoS Genet.* United States, 2008. Vol. 4, № 4. P. e1000061.

466. Quinzii C.M. et al. Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. // *FASEB J. United States*, 2013. Vol. 27, № 2. P. 612–621.
467. García-Corzo L. et al. Dysfunctional coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. // *Hum Mol Genet*. 2013. Vol. 22, № 6. P. 1233–1248.
468. Li K. et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. // *Cell*. 2000. Vol. 101, № 4. P. 389–399.
469. Hao Z. et al. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome c reveals a differential requirement for cytochrome c and Apaf-1 in apoptosis. // *Cell*. 2005. Vol. 121, № 4. P. 579–591.
470. Piruat J.I. et al. The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. // *Mol Cell Biol. United States*, 2004. Vol. 24, № 24. P. 10933–10940.
471. Bayley J.P. et al. Sdhb and Sdhb/H19 knockout mice do not develop paraganglioma or pheochromocytoma. // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 11. P. 1–7.
472. Levéen P. et al. The GRACILE mutation introduced into Bcs1l causes postnatal complex III deficiency: A viable mouse model for mitochondrial hepatopathy. // *Hepatology*. 2011. Vol. 53, № 2. P. 437–447.
473. Diaz F. et al. A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. // *Hum Mol Genet*. 2012. Vol. 21, № 23. P. 5066–5077.
474. Weinberg S.E. et al. Mitochondrial complex III is essential for suppressive function of regulatory T cells. // *Nature*. 2019. Vol. 565, № 7740. P. 495–499.
475. Hüttemann M. et al. Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2-knockout mice show reduced enzyme activity, airway hyporeactivity, and lung pathology. // *The FASEB Journal*. 2012. Vol. 26, № 9. P. 3916–3930.
476. Quintens R. et al. Mice deficient in the respiratory chain gene Cox6a2 are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. // *PLoS One. United States*, 2013. Vol. 8, № 2. P. e56719.
477. Diaz F. et al. Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. // *Hum Mol Genet*. 2005. Vol. 14, № 18. P. 2737–2748.
478. Fukui H. et al. Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, № 35. P. 14163–14168.
479. Diaz F. et al. Pathophysiology and fate of hepatocytes in a mouse model of mitochondrial hepatopathies. // *Gut*. 2008. Vol. 57, № 2. P. 232–242.
480. Fünfschilling U. et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. // *Nature*. 2012. Vol. 485, № 7399. P. 517–521.



481. Agostino A. et al. Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. // *Human Molecular Genetics*. 2003. Vol. 12, № 4. P. 399–413.
482. Dell’Agnello C. et al. Increased longevity and refractoriness to Ca<sup>2+</sup>-dependent neurodegeneration in Surf1 knockout mice. // *Hum Mol Genet*. 2007. Vol. 16, № 4. P. 431–444.
483. Quadalti C. et al. SURF1 knockout cloned pigs: Early onset of a severe lethal phenotype. // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. Vol. 1864, № 6 Pt A. P. 2131–2142.
484. Yang H. et al. Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in Sco2. // *Hum Mol Genet*. 2009. Vol. 19, № 1. P. 170–180.
485. Viscomi C. et al. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  axis. // *Cell Metab*. United States, 2011. Vol. 14, № 1. P. 80–90.
486. Vrbacký M. et al. Knockout of Tmem70 alters biogenesis of ATP synthase and leads to embryonal lethality in mice. // *Hum Mol Genet*. England, 2016. Vol. 25, № 21. P. 4674–4685.
487. Marković A. et al. Genetic Complementation of ATP Synthase Deficiency Due to Dysfunction of TMEM70 Assembly Factor in Rat. // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, № 2. P. 276.
488. Haraguchi M. et al. Targeted Deletion of Both Thymidine Phosphorylase and Uridine Phosphorylase and Consequent Disorders in Mice. // *Mol Cell Biol*. 2002. Vol. 22, № 14. P. 5212–5221.
489. López L.C. et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. // *Hum Mol Genet*. 2009. Vol. 18, № 4. P. 714–722.
490. Graham B.H. et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. // *Nat Genet*. United States, 1997. Vol. 16, № 3. P. 226–234.
491. Esposito L.A. et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. Vol. 96, № 9. P. 4820–4825.
492. Brower J. V. et al. Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis. // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 40. P. 29658–29666.
493. Kokoszka J.E. et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. // *Nature*. 2004. Vol. 427, № 6973. P. 461–465.
494. Tyynismaa H. et al. Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. // *Hum Mol Genet*. England, 2004. Vol. 13, № 24. P. 3219–3227.
495. Tyynismaa H. et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, 2005. Vol. 102, № 49. P. 17687–17692.

496. Tyynismaa H. et al. Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. // *Hum Mol Genet.* England, 2010. Vol. 19, № 20. P. 3948–3958.
497. Trifunovic A. et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. // *Nature.* England, 2004. Vol. 429, № 6990. P. 417–423.
498. Kujoth C.C. et al. Medicine: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. // *Science.* American Association for the Advancement of Science, 2005. Vol. 309, № 5733. P. 481–484.
499. Miller R.A. Evaluating Evidence for Aging. // *Science.* 2005. Vol. 310, № 5747. P. 441–443.
500. Hance N., Ekstrand M.I., Trifunovic A. Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. // *Hum Mol Genet.* 2005. Vol. 14, № 13. P. 1775–1783.
501. Vermulst M. et al. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. // *Nat Genet.* United States, 2008. Vol. 40, № 4. P. 392–394.
502. Ross J.M. et al. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. // *Nature.* England, 2013. Vol. 501, № 7467. P. 412–415.
503. Akman H.O. et al. Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. // *Hum Mol Genet.* 2008. Vol. 17, № 16. P. 2433–2440.
504. Bartesaghi S. et al. Loss of thymidine kinase 2 alters neuronal bioenergetics and leads to neurodegeneration. // *Hum Mol Genet.* 2010. Vol. 19, № 9. P. 1669–1677.
505. Zhou X. et al. Severe mtDNA depletion and dependency on catabolic lipid metabolism in DGUOK knockout mice. // *Hum Mol Genet.* 2019. Vol. 28, № 17. P. 2874–2884.
506. Viscomi C. et al. Early-onset liver mtDNA depletion and late-onset proteinuric nephropathy in Mpv17 knockout mice. // *Hum Mol Genet.* England, 2009. Vol. 18, № 1. P. 12–26.
507. Wang J. et al. Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. // *Nat Genet.* 1999. Vol. 21, № 1. P. 133–137.
508. Wredenberg A. et al. Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. Vol. 99, № 23. P. 15066–15071.
509. Aydin J. et al. Increased mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and decreased sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> in mitochondrial myopathy. // *Hum Mol Genet.* 2009. Vol. 18, № 2. P. 278–288.
510. Ekstrand M.I. et al. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. Vol. 104, № 4. P. 1325–1330.
511. Desdín-Micó G. et al. T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. // *Science.* 2020. Vol. 368, № 6497. P. 1371–1376.
512. Silva J.P. et al. Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. // *Nat Genet.* United States, 2000. Vol. 26, № 3. P. 336–340.

513. Sörensen L. et al. Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. // *J Neurosci*. United States, 2001. Vol. 21, № 20. P. 8082–8090.
514. Ekstrand M.I. et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. // *Hum Mol Genet*. 2004. Vol. 13, № 9. P. 935–944.
515. Pondarré C. et al. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. // *Hum Mol Genet*. England, 2006. Vol. 15, № 6. P. 953–964.
516. Cossée M. et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. // *Hum Mol Genet*. England, 2000. Vol. 9, № 8. P. 1219–1226.
517. Puccio H. et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. // *Nat Genet*. United States, 2001. Vol. 27, № 2. P. 181–186.
518. Seznec H. et al. Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. // *Hum Mol Genet*. England, 2004. Vol. 13, № 10. P. 1017–1024.
519. Thierbach R. et al. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. // *Hum Mol Genet*. England, 2005. Vol. 14, № 24. P. 3857–3864.
520. Miranda C.J. et al. Frataxin knockin mouse. // *FEBS Lett*. England, 2002. Vol. 512, № 1–3. P. 291–297.
521. Clark R.M. et al. The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. // *Hum Genet*. 2007. Vol. 120, № 5. P. 633–640.
522. Coppola G. et al. Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR $\gamma$  pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. // *Hum Mol Genet*. 2009. Vol. 18, № 13. P. 2452–2461.
523. Anderson P.R. et al. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. // *Hum Mol Genet*. 2005. Vol. 14, № 22. P. 3397–3405.
524. Anderson P.R. et al. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, 2008. Vol. 105, № 2. P. 611–616.
525. Swarup V., Julien J.-P. ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. England, 2011. Vol. 35, № 2. P. 363–369.

526. Kreilau F. et al. Novel behavioural characteristics of the superoxide dismutase 1 G93A (SOD1G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis include sex-dependent phenotypes. // *Genes Brain Behav.* 2020. Vol. 19, № 2. P. 1–14.
527. Riboldi G. et al. ALS genetic modifiers that increase survival of SOD1 mice and are suitable for therapeutic development. // *Prog Neurobiol.* England, 2011. Vol. 95, № 2. P. 133–148.
528. Elchuri S. et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. // *Oncogene.* 2005. Vol. 24, № 3. P. 367–380.
529. Hashizume K. et al. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. // *American Journal of Pathology.* American Society for Investigative Pathology, 2008. Vol. 172, № 5. P. 1325–1331.
530. Lebovitz R.M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996. Vol. 93, № 18. P. 9782–9787.
531. Li Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. // *Nat Genet.* 1995. Vol. 11, № 4. P. 376–381.
532. Melov S. et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. Vol. 96, № 3. P. 846–851.
533. Kokoszka J.E. et al. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. Vol. 98, № 5. P. 2278–2283.
534. Gene T.H.E.G.P.- et al. Mitochondrial Oxidative Stress in Mice Lacking. // *Science.* 2000. Vol. 28, № 5. P. 754–766.
535. Reddy V.N. et al. Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* United States, 2001. Vol. 42, № 13. P. 3247–3255.
536. De Haan J.B. et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. // *Journal of Biological Chemistry.* 1998. Vol. 273, № 35. P. 22528–22536.
537. Shiomi T. et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. // *Circulation.* United States, 2004. Vol. 109, № 4. P. 544–549.
538. Chen H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. // *Journal of Cell Biology.* 2003. Vol. 160, № 2. P. 189–200.
539. Chen H., McCaffery J.M., Chan D.C. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. // *Cell.* 2007. Vol. 130, № 3. P. 548–562.

540. Detmer S.A. et al. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot - Marie - Tooth type 2A. // *Hum Mol Genet*. 2008. Vol. 17, № 3. P. 367–375.
541. Alavi M. V. et al. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. // *Brain*. 2007. Vol. 130, № 4. P. 1029–1042.
542. Davies V.J. et al. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. // *Hum Mol Genet*. 2007. Vol. 16, № 11. P. 1307–1318.
543. Ishihara N. et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. // *Nat Cell Biol*. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 11, № 8. P. 958–966.
544. Gerber S. et al. Mutations in DNM1L, as in OPA1, result in dominant optic atrophy despite opposite effects on mitochondrial fusion and fission. // *Brain*. 2017. Vol. 140, № 10. P. 2586–2596.
545. Oishi K. et al. Targeted disruption of Slc19a2, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter Thtr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. // *Hum Mol Genet*. England, 2002. Vol. 11, № 23. P. 2951–2960.
546. Liberman M.C. et al. Deletion of SLC19A2, the high affinity thiamine transporter, causes selective inner hair cell loss and an auditory neuropathy phenotype. // *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2006. Vol. 7, № 3. P. 211–217.
547. Ran F.A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. // *Nat Protoc*. 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
548. Gu B., Posfai E., Rossant J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. // *Nat Biotechnol*. United States, 2018. Vol. 36, № 7. P. 632–637.
549. Behringer R. et al. Selecting Female Mice in Estrus and Checking Plugs. // *Cold Spring Harb Protoc*. United States, 2016. Vol. 2016, № 8. P. 10.1101/pdb.prot092387.
550. Cho A., Haruyama N., Kulkarni A.B. Generation of transgenic mice. // *Curr Protoc Cell Biol*. United States, 2009. Vol. Chapter 19. P. Unit 19.11.
551. Bonaparte D. et al. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group. // *Lab Anim*. England, 2013. Vol. 47, № 3. P. 134–145.
552. Scarfe L. et al. Transdermal Measurement of Glomerular Filtration Rate in Mice. // *J Vis Exp*. United States, 2018. № 140. P. 58520.
553. Crowther G.J. et al. A “functional biopsy” of muscle properties in sprinters and distance runners. // *Med Sci Sports Exerc*. United States, 2002. Vol. 34, № 11. P. 1719–1724.

554. Delfaut E.M. et al. Fat suppression in MR imaging: techniques and pitfalls. // Radiographics. United States, 1999. Vol. 19, № 2. P. 373–382.
555. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. // Nat Methods. United States, 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
556. Osadebey M.E. et al. Standardized quality metric system for structural brain magnetic resonance images in multi-center neuroimaging study. // BMC Med Imaging. England, 2018. Vol. 18, № 1. P. 31.
557. Dennis M.B.J. Humane endpoints for genetically engineered animal models. // ILAR J. England, 2000. Vol. 41, № 2. P. 94–98.
558. Brown M.J., Murray K.A. Phenotyping of genetically engineered mice: humane, ethical, environmental, and husbandry issues. // ILAR J. England, 2006. Vol. 47, № 2. P. 118–123.
559. Crawley J.N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. // Brain Res. Netherlands, 1999. Vol. 835, № 1. P. 18–26.
560. Dennis M.B.J. Welfare issues of genetically modified animals. // ILAR J. England, 2002. Vol. 43, № 2. P. 100–109.
561. Wells D.J. et al. Assessing the welfare of genetically altered mice. // Lab Anim. England, 2006. Vol. 40, № 2. P. 111–114.
562. Wang C., Yue F., Kuang S. Muscle Histology Characterization Using H&E Staining and Muscle Fiber Type Classification Using Immunofluorescence Staining. // Bio Protoc. United States, 2017. Vol. 7, № 10. P. e2279.
563. Pasut A., Jones A.E., Rudnicki M.A. Isolation and culture of individual myofibers and their satellite cells from adult skeletal muscle. // J Vis Exp. United States, 2013. № 73. P. e50074.
564. Shinin V., Gayraud-Morel B., Tajbakhsh S. Template DNA-strand co-segregation and asymmetric cell division in skeletal muscle stem cells. // Methods Mol Biol. United States, 2009. Vol. 482. P. 295–317.
565. Maronpot R.R., Boorman G.A., Gaul B.W. Book Reviews. Pathology of the Mouse: Reference and Atlas. // Toxicol Pathol. 1999. Vol. 27, № 6. P. 689.
566. Hard G.C., et al. Non-proliferative lesions of the kidney and lower urinary tract in rats. // Guides for Toxicologic Pathology. Washington, D.C.: STP/ARP/AFIP, 1999. P. 1–32.
567. Suvarna S.K., Layton C., Bancroft J.D. Bancroft's theory and practice of histological techniques. // Isevier health sciences. 8th ed. Elsevier Ltd., 2018. P. 672.
568. Averina O.A. et al. Mitochondrial rRNA Methylation by Mettl15 Contributes to the Exercise and Learning Capability in Mice. // Int J Mol Sci. Switzerland, 2022. Vol. 23, № 11. P. 6056.
569. Luna L. Histopathological methods and color atlas of special stains and artifacts. American Histolabs. // Inc., Gaithersburg, Maryland. Inc., Gaithersburg, Maryland., 1992. P. 767.

570. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. *Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual.* // Springer Berlin, Heidelberg. 1st ed. Berlin: Springer Berlin, Heidelberg, 1979. P. 344.
571. Debacq-Chainiaux F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. // *Nat Protoc.* England, 2009. Vol. 4, № 12. P. 1798–1806.
572. NIST Chemistry WebBook. NIST Standard Reference Database Number 69 [Electronic resource]. URL: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>.
573. Vyssokikh M.Y. et al. Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States, 2020. Vol. 117, № 12. P. 6491–6501.
574. Bücher T., Luh W., Pette D. Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden. // *Enzyme: Teil A* / ed. Abraham R. et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1964. P. 292–339.
575. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. // *Amino Acids.* Austria, 2011. Vol. 40, № 5. P. 1271–1296.
576. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. // *Can J Biochem Physiol.* Canada, 1959. Vol. 37, № 8. P. 911–917.
577. Pinault M. et al. A 1D High Performance Thin Layer Chromatography Method Validated to Quantify Phospholipids Including Cardiolipin and Monolysocardiolipin from Biological Samples. // *European Journal of Lipid Science and Technology.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 122, № 2. P. 1900240.
578. Dobin A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. // *Bioinformatics.* England, 2013. Vol. 29, № 1. P. 15–21.
579. Subramanian A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States, 2005. Vol. 102, № 43. P. 15545–15550.
580. Brinster R.L. et al. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. 1982. // *Biotechnology.* 1992. Vol. 24, № November. P. 411–419.
581. Palmiter R.D. et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. // *Nature.* England, 1982. Vol. 300, № 5893. P. 611–615.
582. Brinster R.L. et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985. Vol. 82, № 13. P. 4438–4442.
583. Olsen R.K.J. et al. Riboflavin-Responsive and -Non-responsive Mutations in FAD Synthase Cause Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase and Combined Respiratory-Chain Deficiency. // *Am J Hum Genet.* United States, 2016. Vol. 98, № 6. P. 1130–1145.

584. Sugiana C. et al. Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. // *Am J Hum Genet.* United States, 2008. Vol. 83, № 4. P. 468–478.
585. Khosronezhad N., Hosseinzadeh Colagar A., Mortazavi S.M. The Nsun7 (A11337)-deletion mutation, causes reduction of its protein rate and associated with sperm motility defect in infertile men. // *J Assist Reprod Genet.* 2015. Vol. 32, № 5. P. 807–815.
586. Eren K., Taktakoğlu N., Pirim I. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. // *Eurasian Journal of Medicine.* 2022. Vol. 54, № January. P. S47–S56.
587. San Filippo J., Sung P., Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. // *Annu Rev Biochem.* United States, 2008. Vol. 77. P. 229–257.
588. Luo C. et al. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2011. Vol. 50, № 4. P. 471–478.
589. Takeo T., Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. // *PLoS One.* United States, 2015. Vol. 10, № 5. P. e0128330.
590. Yan L., Li H., Shi Z. Immunization against inhibin improves in vivo and in vitro embryo production. // *Anim Reprod Sci.* Elsevier B.V., 2015. Vol. 163. P. 1–9.
591. Makanji Y. et al. Inhibin at 90: From discovery to clinical application, a historical review. // *Endocr Rev.* 2014. Vol. 35, № 5. P. 747–794.
592. Kishi H. et al. Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin through the increase in the secretion of follicle-stimulating hormone in the cyclic golden hamster. // *Journal of Endocrinology.* 1996. Vol. 151, № 1. P. 65–75.
593. Lambert R. *Breeding Strategies Manual.* // The Jackson Laboratory. 2007. P. 7.
594. Pinkert C.A. *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook.* // Elsevier. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. P. 714.
595. Ekambaram G., Kumar S.K.S., Joseph L.D. Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. // *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2017. Vol. 11, № 1. P. AC05–AC07.
596. TASQ - Biological Resources - University of Queensland [Electronic resource]. URL: <https://biological-resources.uq.edu.au/tasq/pronuclear-injection>.
597. Kumar T.R. et al. Transgenic mouse technology: principles and methods. // *Methods Mol Biol.* 2009. Vol. 590, № 2. P. 335–362.
598. Redina O.E., SYa A., Maksimovsky L.F. Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle. // *J Reprod Fertil.* England, 1994. Vol. 102, № 2. P. 263–267.
599. Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. // *Toxicol Pathol.* 2015. Vol. 43, № 6. P. 776–793.



600. Keskin-tepe L. et al. Use of cryopreserved pronuclear embryos for the production of transgenic mice. // *Biol Reprod*. 2001. Vol. 65, № 2. P. 407–411.
601. DePamphilis M.L. et al. Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. // *Biotechniques*. 1988. Vol. 6, № 7. P. 662–680.
602. Lin T.P. Microinjection of Mouse Eggs. // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 1966. Vol. 151, № 3708. P. 333–337.
603. Munné S. et al. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. // *Fertil Steril*. United States, 1995. Vol. 64, № 2. P. 382–391.
604. Behringer R. et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition*. // Cold Harbor Laboratory Press. 2014. P. 237–460.
605. Rose C. et al. Pregnancy rates, prenatal and postnatal survival of offspring, and litter sizes after reciprocal embryo transfer in DBA/2JHd, C3H/HeNCrl and NMRI mice. // *Theriogenology*. United States, 2012. Vol. 77, № 9. P. 1883–1893.
606. Byers S.L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 4. P. 1–5.
607. Murphy D. Production of transgenic rodents by the microinjection of cloned DNA into fertilized one-celled eggs. // *Methods Mol Biol*. United States, 2008. Vol. 461. P. 71–109.
608. Modzelewski A.J. et al. Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. // *Nat Protoc*. England, 2018. Vol. 13, № 6. P. 1253–1274.
609. Mahabir E. et al. Reproductive Performance after Unilateral or Bilateral Oviduct Transfer of 2-Cell Embryos in Mice. // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. United States, 2018. Vol. 57, № 2. P. 110–114.
610. CD-1® IGS Mouse | Charles River [Electronic resource]. URL: <https://www.criver.com/products-services/find-model/cd-1r-igs-mouse?region=3616>.
611. Mendl M. How should parents respond to a reduction in litter size: Abandonment or extra care?. // *Behavioural Processes*. Elsevier, 1994. Vol. 31, № 2–3. P. 285–291.
612. Brajon S. et al. All the pups we cannot see: Cannibalism masks perinatal death in laboratory mouse breeding but infanticide is rare. // *Animals*. 2021. Vol. 11, № 8. P. 1–18.
613. Knottnerus S.J.G. et al. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle. // *Rev Endocr Metab Disord*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2018. Vol. 19, № 1. P. 93–106.
614. Sander J. et al. Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. // *Mol Genet Metab*. United States, 2005. Vol. 85, № 2. P. 108–114.
615. Beletić A. et al. The markers of the organic acidemias and their ratios in healthy neonates in Serbian population. // *Drug Metab Pers Ther*. De Gruyter Open Ltd, 2022. Vol. 37, № 3. P. 271–275.

616. Van Hove J.L. et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. // *Am J Hum Genet.* United States, 1993. Vol. 52, № 5. P. 958–966.
617. Chinsky J.M. et al. Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations. // *Genetics in Medicine.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 19, № 12. P. 1380–1395.
618. Picard M., Hepple R.T., Buelle Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. // *Am J Physiol Cell Physiol.* United States, 2012. Vol. 302, № 4. P. 629-41.
619. Qin W. et al. Oxidative myocytes of heart and skeletal muscle express abundant sarcomeric mitochondrial creatine kinase. // *Histochem J.* Netherlands, 1999. Vol. 31, № 6. P. 357–365.
620. Schlattner U., Wallimann T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. // *J Biol Chem.* United States, 2000. Vol. 275, № 23. P. 17314–17320.
621. Afzal N. et al. Effect of crista morphology on mitochondrial ATP output: A computational study. // *Curr Res Physiol.* Elsevier B.V., 2021. Vol. 4. P. 163–176.
622. Paradies G. et al. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. // *Cells.* Switzerland, 2019. Vol. 8, № 7. P. 728.
623. Jussupow A., Di Luca A., Kaila V.R.I. How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I. // *Sci Adv.* 2019. Vol. 5, № 3. P. 1–8.
624. Schlattner U., Kay L., Tokarska-Schlattner M. Mitochondrial Proteolipid Complexes of Creatine Kinase. // *Subcell Biochem.* United States, 2018. Vol. 87. P. 365–408.
625. Dudek J. Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. // *Front Cell Dev Biol.* 2017. Vol. 5, № 29. P. 90.
626. Leboucher G.P. et al. Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis. // *Mol Cell.* Elsevier, 2012. Vol. 47, № 4. P. 547–557.
627. Takeshita M. et al. Palmitoyl-CoA elongation in brain microsomes: dependence on cytochrome b5 and NADH-cytochrome b5 reductase. // *J Neurochem.* England, 1985. Vol. 45, № 5. P. 1390–1395.
628. Oshino N., Imai Y., Sato R. A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. // *J Biochem.* England, 1971. Vol. 69, № 1. P. 155–167.
629. den Boer M.E.J. et al. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. // *Pediatrics.* United States, 2002. Vol. 109, № 1. P. 99–104.

630. Wanders R.J. et al. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. // *J Inherit Metab Dis.* United States, 1999. Vol. 22, № 4. P. 442–487.
631. Ibdah J.A. et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. // *Journal of Clinical Investigation.* 2001. Vol. 107, № 11. P. 1403–1409.
632. Ibdah J.A. et al. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. // *Gastroenterology.* 2005. Vol. 128, № 5. P. 1381–1390.
633. Keyes S.R., Cinti D.L. Biochemical properties of cytochrome b5-dependent microsomal fatty acid elongation and identification of products. // *Journal of Biological Chemistry.* ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 1980. Vol. 255, № 23. P. 11357–11364.
634. Martin-Montalvo A. et al. Cytochrome b(5) reductase and the control of lipid metabolism and healthspan. // *NPJ Aging Mech Dis.* England, 2016. Vol. 2. P. 16006.
635. Taylor W.A. et al. Human trifunctional protein alpha links cardiolipin remodeling to beta-oxidation. // *PLoS One.* United States, 2012. Vol. 7, № 11. P. e48628.
636. Wahjudi P.N. et al. Turnover of nonessential fatty acids in cardiolipin from the rat heart. // *J Lipid Res.* United States, 2011. Vol. 52, № 12. P. 2226–2233.
637. Lee H.J. et al. Selective remodeling of cardiolipin fatty acids in the aged rat heart. // *Lipids Health Dis.* 2006. Vol. 5. P. 1–4.
638. Sullivan E.M. et al. Docosahexaenoic acid lowers cardiac mitochondrial enzyme activity by replacing linoleic acid in the phospholipidome. // *J Biol Chem.* United States, 2018. Vol. 293, № 2. P. 466–483.
639. Forbes J.M., Thorburn D.R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. // *Nat Rev Nephrol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 14, № 5. P. 291–312.
640. Galvan D.L., Green N.H., Danesh F.R. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. // *Kidney Int.* Elsevier Inc, 2017. Vol. 92, № 5. P. 1051–1057.
641. Crawford S.O. et al. Association of blood lactate with type 2 diabetes: The atherosclerosis risk in communities carotid MRI study. // *Int J Epidemiol.* 2010. Vol. 39, № 6. P. 1647–1655.
642. Li J. et al. Mitochondrial micropeptide MOXI promotes fibrotic gene transcription by translocation to the nucleus and bridging N-acetyltransferase 14 with transcription factor c-Jun. // *Kidney Int.* Elsevier B.V., 2023. Vol. 103, № 5. P. 886–902.
643. Sultanova R.F. et al. Sex differences in renal mitochondrial function: a hormone-gous opportunity for research. // *Am J Physiol Renal Physiol.* United States, 2020. Vol. 319, № 6. P. F1117–F1124.
644. Averina O.A. et al. Kidney-Related Function of Mitochondrial Protein Mitoregulin. // *Int J Mol Sci.*, 2023. Vol. 24, № 10. P. 9106.

645. Averina O.A. et al. Mitoregulin Contributes to Creatine Shuttling and Cardiolipin Protection in Mice Muscle. // *Int J Mol Sci.*, 2023. Vol. 24, № 8. P. 7589.
646. Averina O.A. et al. Mitochondrial peptide Mtl $\alpha$ n contributes to oxidative metabolism in mice. // *Biochimie*, 2023. Vol. 204. P. 136-139.