

doi 10.18699/vjgb-25-22

Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530C>T


А.С. Зуева ^{1,2}, А.И. Шевченко ¹, С.П. Медведев ¹, Е.А. Елисафенко ¹, А.А. Слепцов ^{1,3}, М.С. Назаренко ^{1,3}, Н.А. Тмоян ^{1,4}, С.М. Закиян ¹, И.С. Захарова ¹ 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

 zakharova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Семейная гиперхолестеринемия является распространенным моногенным заболеванием, которое характеризуется повышенным содержанием холестерина в плазме крови, приводящим к хроническим заболеваниям сердечно-сосудистой системы с высоким риском и ранним проявлением развития патологий, вызванных атеросклеротическими поражениями кровеносных сосудов. Образование атеросклеротических бляшек при семейной гиперхолестеринемии в основном обусловлено патогенными вариантами гена рецептора липопротеинов низкой плотности *LDLR* (low-density lipoprotein receptor), играющего важную роль в метаболизме холестерина. В норме липопротеины низкой плотности, переносящие холестерин, связываются с рецептором *LDLR* на поверхности клеток печени и выводятся из кровотока путем интернализации гепатоцитами. При семейной гиперхолестеринемии происходит нарушение функционирования рецептора и значительное снижение интернализации липопротеинов низкой плотности. Это приводит к их накоплению в субэндотелиальном пространстве внутренней стенки кровеносных сосудов и вызывает атерогенез – образование атеросклеротических бляшек. На сегодняшний день не существует эффективных и универсальных подходов к диагностике и лечению семейной гиперхолестеринемии. Актуальным подходом для исследования молекулярно-генетических особенностей заболевания и разработки систем скрининга химических соединений – потенциальных лекарственных препаратов – является создание клеточных моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов. Целью нашей работы было создание изогенной генетически модифицированной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток путем коррекции патогенного аллельного варианта с.530C гена *LDLR* в линии ИПСК, полученной ранее от пациента-компаундной гетерозиготы с семейной гиперхолестеринемией. Созданная изогенная клеточная линия ИПСК отличается от исходной только одной скорректированной нуклеотидной заменой, что позволяет исследовать непосредственное влияние данного патогенного генетического варианта на физиологические изменения в релевантных дифференцированных клетках. Для коррекции однонуклеотидных замен использован CRISPR/Cas9-опосредованный метод редактирования оснований. Полученная генетически модифицированная линия ИПСК обладает свойствами плюрипотентности, имеет нормальный кариотип, идентичный исходной линии набор коротких tandemных повторов и может быть использована для формирования дифференцированных производных, необходимых при разработке релевантных клеточных моделей.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; *LDLR*; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; геномное редактирование; изогенные линии клеток

Для цитирования: Зуева А.С., Шевченко А.И., Медведев С.П., Елисафенко Е.А., Слепцов А.А., Назаренко М.С., Тмоян Н.А., Закиян С.М., Захарова И.С. Изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi036-A-1 от пациента с семейной гиперхолестеринемией, созданная путем коррекции патогенного варианта гена *LDLR* с.530C>T. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):189-199. doi 10.18699/vjgb-25-22

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 24-15-00346, <https://rscf.ru/project/24-15-00346/>.

Благодарности. Микроскопические исследования выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦИГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанном бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН FWNR-2022-0015.

Isogenic induced pluripotent stem cell line ICGi036-A-1 from a patient with familial hypercholesterolaemia, derived by correcting a pathogenic variant of the gene *LDLR* c.530C>T

A.S. Zueva ^{1,2}, A.I. Shevchenko ¹, S.P. Medvedev ¹, E.A. Elisaphenko ¹, A.A. Sleptcov ^{1,3}, M.S. Nazarenko ^{1,3},
N.A. Tmoyan ^{1,4}, S.M. Zakian ¹, I.S. Zakharova ¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁴ National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

 zakharova@bionet.nsc.ru

Abstract. Familial hypercholesterolaemia is a common monogenic disorder characterized by high plasma cholesterol levels leading to chronic cardiovascular disease with high risk and often early manifestation due to atherosclerotic lesions of the blood vessels. The atherosclerotic lesions in familial hypercholesterolaemia are mainly caused by pathogenic variants of the low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) gene, which plays an important role in cholesterol metabolism. Normally, cholesterol-laden low-density lipoproteins bind to the LDLR receptor on the surface of liver cells to be removed from the bloodstream by internalisation with hepatocytes. In familial hypercholesterolaemia, the function of the receptor is impaired and the uptake of low-density lipoproteins is significantly reduced. As a result, cholesterol accumulates in the subendothelial space on the inner wall of blood vessels, triggering atherogenesis, the formation of atherosclerotic plaques. At present, there are no effective and universal approaches to the diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. A relevant approach to study the molecular genetic mechanisms of the disease and to obtain systems for screening chemical compounds as potential drugs is the generation of cellular models based on patient-specific induced pluripotent stem cells. The aim of our work was to derive an isogenic genetically modified induced pluripotent stem cell line by correcting the pathogenic allelic variant c.530C of the *LDLR* gene in the original iPSC previously obtained from a compound heterozygote patient with familial hypercholesterolaemia. The resulting isogenic iPSC line differs from the original by only one corrected nucleotide substitution, allowing us to study the direct effect of this pathogenic genetic variant on physiological changes in relevant differentiated cells. CRISPR/Cas-mediated base editing was used to correct the single nucleotide substitution. The resulting genetically modified iPSC line has pluripotency traits, a normal karyotype, a set of short tandem repeats identical to that in the original line and can be used to obtain differentiated derivatives necessary for the elaboration of relevant cell models.

Key words: familial hypercholesterolaemia; *LDLR*; induced pluripotent stem cells; genome editing; isogenic cell lines

For citation: Zueva A.S., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Elisaphenko E.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Tmoyan N.A., Zakian S.M., Zakharova I.S. Isogenic induced pluripotent stem cell line ICGi036-A-1 from a patient with familial hypercholesterolaemia, derived by correcting a pathogenic variant of the gene *LDLR* c.530C>T. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):189-199. doi 10.18699/vjgb-25-22

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, несмотря на развитие медицинских методов и революционные открытия в области биологии, сердечно-сосудистые заболевания, в большинстве случаев вызванные атеросклеротическими поражениями, остаются ведущей причиной смерти людей во всем мире.

Одним из самых распространенных наследственных заболеваний, приводящих к атеросклерозу, является семейная гиперхолестеринемия (СГХС) (Захарова и др., 2024). Это заболевание, согласно данным Европейского общества атеросклероза, имеет высокую частоту встречаемости: один случай на 250 человек для гетерозиготной формы, один на 300 тыс.–один на 1 млн человек – для гомозиготной (Ежов и др., 2019). Тем не менее течение этого заболевания может быть латентным с затрудненной диагностикой и проявляться острыми сосудистыми катастрофами в виде инфарктов, инсультов и других ишемических поражений, нередко приводящих к летальному исходу (Hopkins et al., 2011; Talmud et al., 2014; Ference et al., 2017). В настоящее время до 70 % предполагаемых

гетерозиготных носителей остаются не диагностированными¹ (Ray et al., 2023).

Семейная гиперхолестеринемия характеризуется ауто-сомно-доминантным типом наследования, что связано с повышенным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и высоким риском ранних сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (Harada-Shiba, 2023). СГХС может проявляться в виде гетеро- и гомозиготной форм. Пациенты с гомозиготной формой данного заболевания обычно демонстрируют раннюю манифестацию ССЗ, и без применения серьезной комплексной терапии продолжительность их жизни не превышает 30 лет (Hopkins et al., 2011). Причиной СГХС являются патогенные аллельные варианты генов, кодирующих ключевые белки, участвующие в клиренсе ЛПНП, опосредованном рецептором липопротеинов низкой плотности LDLR (low-

¹ Информационный портал для больных семейной гиперхолестеринемией <https://familyheart.org/familial-hypercholesterolemia>; информационный портал биотехнологической компании по генетическому тестированию «23andMe» https://www.23andme.com/topics/health-predispositions/fh/?srsltid=AfmBOooDFqM2Usz3G0j9PZg-ng-15q_dvPbcQL6qgCzJOQodQhslil7

density lipoprotein receptor) (Gu et al., 2024). В 85 % диагностированных случаев данного заболевания патологические состояния обусловлены нарушением в работе гена *LDLR*, кодирующего рецептор липопротеинов низкой плотности на поверхности гепатоцитов (Hendricks-Sturup et al., 2020). Наличие СГХС у пациента редко связано с *de novo* возникшими патогенными аллельными вариантами (Fularski et al., 2024). По этой причине важное значение имеют каскадный генетический скрининг родственников и профилактика атеросклероза у выявленных носителей.

Несмотря на широкую распространенность СГХС, не существует эффективных подходов к лечению. По данным Европейского общества атеросклероза, опубликованным в 2022 г., менее 3 % пациентов в мире достигают целевых показателей по снижению уровня холестерина с помощью применяемых препаратов (Ray et al., 2022; Harada-Shiba, 2023). Отсутствие эффективного лечения связано с нерелевантностью моделей, которые используются как для испытания лекарственных средств, так и для изучения патогенеза заболевания.

Перспективным подходом для исследования молекулярно-генетических основ заболевания является создание изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с СГХС. Ранее мы получили линию ИПСК ICGi036-A от пациента-компаундной гетерозиготы с семейной гиперхолестеринемией. Линия зарегистрирована в Европейском реестре плюрипотентных стволовых клеток hPSCreg с идентификатором RRID:CVCL_B5EJ (Zakharova et al., 2022a). Исходная линия ИПСК ICGi036-A содержит два аллельных варианта гена *LDLR*, представляющих собой миссенс-мутации: с.530C>T (p.Ser177Leu) и с.1054T>C (p.Cys352Arg).

Замена с.530C>T, rs121908026 (p.Ser177Leu) расположена в экзоне 4 гена *LDLR* (Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021). Данная миссенс-мутация приводит к замене серина на лейцин в кодоне 177 в высококонсервативной последовательности SerAspGlu в лиганд-связывающем домене LDLR (Südhof et al., 1985). Эта замена замедляет транспорт белка LDLR на поверхность клетки, вследствие чего дефектные рецепторы не способны связывать ЛПНП, переносящие холестерин, что приводит к снижению захвата ЛПНП примерно до 6–31 % (Thormachlen et al., 2015). В базах данных аллельный вариант *LDLR*(NM_000527.5):с.530C>T обозначен как патогенный, вызывающий СГХС (ClinVar ID 3686; OMIM:606945.0004; UniProt variants VAR_005327; VarSome <http://varso.me/1dmA>).

Замена с.1054T>C, rs879254769 (p.Cys352Arg) локализована в экзоне 7 гена *LDLR* и кодирует цистеин вместо аргинина в кодоне 352 в домене, подобном эпидермальному фактору роста (Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021). Аллельный вариант *LDLR*(NM_000527.5):с.1054T>A упоминается в базах как патогенный/вероятно патогенный, вызывающий СГХС (ClinVar ID 251618; VarSome <http://varso.me/0J8J>).

Существуют данные, что аллельные варианты с.530C>T и с.1054T>C *LDLR* могут вызывать СГХС независимо. Например, гетерозиготная замена с.530C>T в гене *LDLR* связана с СГХС в разных странах, таких как Индия, Португалия, Испания, Польша и Чешская Республика

(Bourbon et al., 2008; Palacios et al., 2012; Tichý et al., 2012; Setia et al., 2016; Sharifi et al., 2016). Кроме того, этот аллельный вариант в компаундном гетерозиготном варианте с EX7_EX10del (с.941-?_1186+?del) гена *LDLR* зарегистрирован в Бразилии и в сочетании с с.55G>C (p.Asp19His) гена *ABCG8* – у пациентов с СГХС в Малайзии (Jannes et al., 2015; Mohd Nor et al., 2019).

Аллельный вариант с.1054T>C в гетерозиготном состоянии обнаружен у пациентов с СГХС на Тайване и в России, а в компаундном гетерозиготном варианте с.796G>A (p.Asp266Asn) – у пациента с СГХС в Западной Сибири (Meshkov et al., 2021; Shakhshneider et al., 2021; Huang et al., 2022). Также в одной из наших предыдущих работ подтверждено транс-положение между аллельными вариантами с.530C>T и с.1054T>C в ИПСК ICGi036-A (Nazarenko et al., 2023).

В настоящей работе мы описываем получение и детальную характеристику генетически модифицированной линии ИПСК ICGi036-A-1, изогенной линии ICGi036-A от пациента с СГХС, являющегося компаундной гетерозиготой по патогенному с.530C>T (p.Ser177Leu) и вероятно патогенному с.1054T>C (p.Cys352Arg) аллельным вариантам гена *LDLR*, с использованием метода редактирования оснований. Линия ИПСК со скорректированным аллельным вариантом с.530C>T (p.Ser177Leu) представляет собой модель, на основе которой могут быть получены релевантные клеточные типы для исследования СГХС и создания подходов для разработки лекарственных препаратов для данного заболевания.

Материалы и методы

Клеточные линии. В настоящей работе использованы следующие линии ИПСК человека:

- ICGi036-A (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_B5EJ) от пациента-компаундной гетерозиготы с СГХС с двумя аллельными вариантами гена *LDLR*: патогенным с.530C>T (p.Ser177Leu), rs121908026, ClinVar ID 3686, OMIM:606945.0004 и вероятно патогенным с.1054T>C (p.Cys352Arg), rs879254769, ClinVar ID 251618, полученная нами ранее (Zakharova et al., 2022a), – исходная линия ИПСК для создания изогенной генетически модифицированной линии ИПСК;
- ICGi022-A (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_ZE02) (Malakhova et al., 2020) – линия ИПСК от здорового донора для контроля маркеров плюрипотентности;
- эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) HuES9 (HVRDe009-A) (идентификатор в hPSCreg: RRID:CVCL_0057) (Cowan et al., 2004) – линия ЭСК от здорового донора для контроля маркеров плюрипотентности.

Культивирование ИПСК и ЭСК. ИПСК и ЭСК культивировали в ростовой среде DMEM/F12, содержащей 15 % заменителя сыворотки KnockOut SR (Thermo Fisher Scientific), 1 мМ глутамина GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 1 % раствора заменимых аминокислот NEAA (Thermo Fisher Scientific), 0,25 мМ 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific) и 10 нг/мл bFGF (Sci-store). Клетки росли на слое митогически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. Культивирование ИПСК

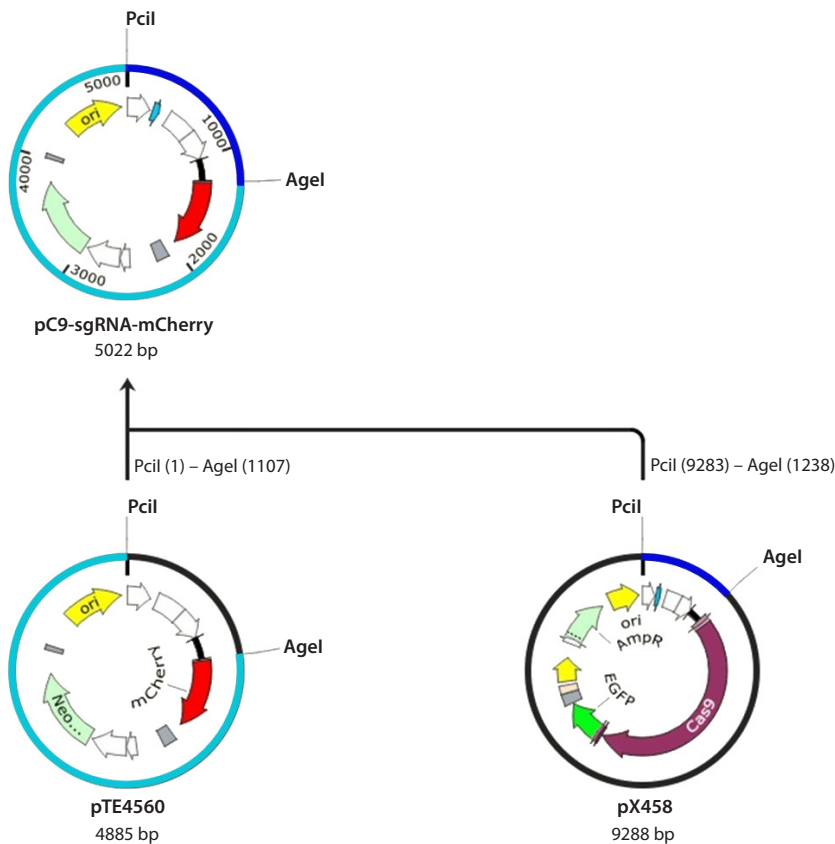


Рис. 1. Схема создания плазмиды pC9-sgRNA-mCherry из плазмид pTE4560 и pX458 в программе SnapGene.

производили в инкубаторе при температуре 37 °C и содержании CO₂ 5%. Пересадку колоний ИПСК и ЭСК осуществляли путем ферментативной дезагрегации с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 2 мкМ ROCK-ингибитора тиазовивина (STEMCELL Technologies).

Векторы для генетической коррекции ИПСК. Для встраивания последовательности спейсера направляющей РНК мы создали универсальную плазмиду pC9-sgRNA-mCherry (рис. 1), доставку которой в клетки можно детектировать по флуоресцентному сигналу mCherry.

Для этого были проведены гидролиз эндонуклеазами *PciI* и *AciGI* (SibEnzyme) и последующее объединение при помощи ДНК-лигазы фага T4 целевых фрагментов ДНК: короткого фрагмента размером 1244 п. н., содержащего последовательность промотора U6 и сайта для клонирования спейсера из плазмиды pX458 (addgene #48138), и длинного фрагмента

размером 3778 п. н., кодирующего ген устойчивости к антибиотику канамицину и последовательность флуоресцентного белка mCherry из плазмиды pTE4560 (addgene #107526). Финальная конструкция плазмиды pC9-sgRNA-mCherry подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>).

Выбор олигонуклеотидов для направляющих РНК производили с помощью PnB Designer (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) (Siegener et al., 2021).

На 5'-конец выбранных олигонуклеотидов добавляли нуклеотид G, после чего генерировали комплементарную олигонуклеотидную последовательность. Далее на 5'-конец добавляли последовательность 5'-CACC-3', на 5'-конец комплементарной олигонуклеотидной последовательности – 5'-AAAC-3' для последующего встраивания в вектор pC9-sgRNA-mCherry по сайтам рестрикции эндонуклеазы *BpiI* (см. таблицу). Экспрессия направляющей РНК с промотора U6 усиливается при добавлении нуклеотида G сразу после последовательности 5'-CACC-3' перед последовательностью спейсера (Baueer et al., 2015).

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Биоссет» (<https://www.biosset.com/>). Одноцепочечные олигонуклеотиды подвергались фосфорилированию 5'-концов с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 (New England Biolabs) и отжигу для формирования двуцепочечных молекул. Полученные двуцепочечные молекулы с липкими концами встраивали в сайты для спейсеров направляющих РНК предварительно линейаризованной эндонуклеазой *BpiI* плазмиды pC9-sgRNA-mCherry

Последовательности олигонуклеотидов для конструирования направляющих РНК, модифицированных для клонирования в плазмидный вектор

Номер п/п	Название	5'–3' последовательность	Длина, п. н.	PAM
1	c.530C>T_1	cacc GAT CCAAGCCATCTTCG CAGT	25	CGG
2	c.530C>T_1r	aaacACTGCGAAGATGGCTTGG ATC	25	CGG
3	c.1054T>C_2	cacc GA AGATGCGAAGGTGATTT C	25	GGG
4	c.1054T>C_2r	aaacGGAAATCACCTTCG CATCTTC	25	GGG

Примечание. Прописными буквами обозначены олигонуклеотиды для направляющих РНК, подобранные с помощью PnB Designer (<https://fgcz-shiny.uzh.ch/PnBDesigner/>) (Siegener et al., 2021), жирным шрифтом – нуклеотиды, добавленные для повышения уровня экспрессии с промотора U6, строчными буквами – добавленные «липкие концы», буквой “r” – сгенерированные комплементарные олигонуклеотидные последовательности.

с помощью лигазы фага T4. Подтверждение того, что полученные плазмиды содержат встроенные целевые последовательности, производилось секвенированием по Сэнгеру.

Для коррекции целевых однонуклеотидных замен в работе использованы две двухкомпонентные системы плазмид. Система 1 для коррекции замены с.530C>T состоит из плазмидного вектора xCas9(3.7)-ABE(7.10) (addgene #108382), кодирующего аденин-дезаминазу и никазу xCas9n (редактор адениновых оснований), и плазмиды pC9-sgRNA-mCherry со встроенной последовательностью спейсера направляющей РНК. Система 2 для коррекции замены с.1054T>C состоит из плазмидного вектора xCas9(3.7)-BE4 (addgene #108381), кодирующего цитозин-дезаминазу, никазу xCas9n (редактор цитидиновых оснований), и плазмиды pC9-sgRNA-mCherry со встроенной последовательностью спейсера направляющей РНК.

Выделение плазмидной ДНК для последующей липофекции осуществляли с помощью набора HiPure Plasmid EF Midi Kit (Magen).

Доставка векторов для коррекции замен с.530C>T и с.1054T>C последовательности гена *LDLR*. Доставку плазмид, кодирующих последовательности редакторов оснований и спейсеров направляющих РНК, в ИПСК осуществляли методом липофекции с помощью набора Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя, с модификациями. За 24 ч до липофекции ИПСК, культивируемые на подложке из митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши, пересаживали на 3 лунки 12-луночного планшета, покрытые матриксом Matrigel (Corning), в среду с 15 % содержанием заменителя сыворотки koSR (Thermo Fisher Scientific) и 2 мкМ ROCK-ингибитором тиазовивинном (STEMCELL Technologies). Для увеличения эффективности предстоящей липофекции ИПСК во время пересадки дезагрегировали до одноклеточного состояния с помощью TrypLE. Через 4–5 ч после пересадки, проконтролировав, что клетки прикрепились к культуральной поверхности, проводили смену среды на бессывороточную, содержащую тиазовивин, с увеличенным в три раза содержанием bFGF (30 нг/мл). За 2 ч до липофекции производили смену среды на эквивалентную свежую, без тиазовивина.

Непосредственно липофекцию проводили в среде без koSR, без тиазовивина, с 30 нг/мл bFGF. Соотношение количества ДНК (в нг) плазмид-редакторов и плазмид с последовательностями направляющих РНК – 3:1. Перед липофекцией в пробирке 1 смешивали 150 мкл среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) и 9 мкл Lipofectamine 3000, в пробирке 2 – 150 мкл среды Opti-MEM, 6 мкл реагента Р 3000, по 125 нг ДНК плазмид pC9-1054_2-mCherry и pC9-530-mCherry, по 375 нг ДНК плазмид xCas9(3.7)-ABE(7.10) и xCas9(3.7)-BE4. Содержимое пробирок 1 и 2 смешивали, инкубировали 15 мин при комнатной температуре. 100 мкл смеси добавляли к 1×10^5 ИПСК, растущих в лунке 12-луночного планшета в 1 мл среды. Через 26 ч после липофекции убирали ростовую среду, добавляли свежую, содержащую 15 % koSR, 30 нг/мл bFGF и тиазовивин. Красный сигнал белка mCherry детектируется посредством инвертированного флуоресцент-

ного микроскопа Nikon TS100 в период с 24 по 48 ч после липофекции.

Отбор и субклонирование полученных клонов ИПСК. Через 48 ч после внесения системы редакторов оснований в ИПСК проводили отбор клонов методом проточной цитометрии по красному сигналу флуоресцентного белка mCherry на приборе Sony MA900. Полученную одноклеточную суспензию ИПСК высаживали на культуральные поверхности с митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши для последующего субклонирования. Колонии ИПСК, образовавшиеся из отдельных отсортированных клеток, для индивидуального анализа снимали механическим способом, используя стеклянные капилляры, и переносили в отдельные ячейки культурального планшета с предварительно посаженными на них митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши для культивирования и дальнейшего анализа.

Анализ результатов редактирования замен в последовательности гена *LDLR* в отобранных клонах ИПСК. Результаты коррекции замен с.530C>T и с.1054T>C последовательности гена *LDLR* в отобранных клонах ИПСК анализировали методом ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру. Геномную ДНК выделяли из ИПСК с помощью реагента QuickExtract DNA Extraction Solution (Lucigen) согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с использованием набора BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (Biolabmix) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Параметры программы: 98 °C – 30 с; 98 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 30 с, 35 циклов; 72 °C – 5 мин. Последовательности праймеров приведены в табл. S1 Приложения².

Синтез олигонуклеотидов осуществляли в компании «Биоссет» (<https://www.biosset.com/>). Реакции секвенирования по Сэнгеру выполняли с использованием Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали в ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequest>) на генетическом анализаторе ABI3130XL.

Детекция микоплазмы и эписом. Выявление контаминации микоплазмой и эписомами проводили с помощью ПЦР, как описано ранее (Chopra et al., 1998; Okita et al., 2013). Последовательности праймеров приведены в табл. S1. Параметры программы для детекции эписом: 95 °C – 5 мин; 95 °C – 15 с, 58 °C – 15 с, 72 °C – 20 с, 35 циклов; 72 °C – 5 мин; для детекции микоплазмы: 95 °C – 3 мин; 95 °C – 15 с, 67 °C – 15 с, 72 °C – 20 с, 35 циклов; 72 °C – 5 мин.

Кариотипирование. Анализ кариотипа генетически модифицированных ИПСК проводили на 15-м пассаже по протоколу, описанному ранее, используя DAPI-бэндинг, согласно Международной системе цитогенетической номенклатуры человека (Григорьева и др., 2024).

STR-анализ. Анализ коротких tandemных повторов (STR) выполнен компанией «Геноаналитика» (<https://www.genoanalytica.ru>). Генотипирование исследуемых образцов ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции с применением набора ПЦР реагентов для

² Таблицы S1–S4 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx8.pdf>

прямой амплификации COrDIS ЭКСПЕРТ 26 (Россия) согласно протоколу фирмы-производителя, с последующим разделением продуктов амплификации на приборе для проведения капиллярного электрофореза 3130 Genetic Analyzer (HITACHI, Applied Biosystems Group of The Applied Corporation, Япония, США, регистр. удостоверение № ФСЗ 2004/1586). Электрофореграммы продуктов полимеразной цепной реакции можно получить по запросу у авторов.

Количественная ОТ-ПЦР. Для анализа экспрессии генов плюрипотентности РНК выделяли из клеток при помощи реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Для обработки ДНКазой I использовали набор DNA-free (Thermo Fisher Scientific). Обратную транскрипцию РНК осуществляли с использованием набора с обратной транскриптазой M-MuLV (Биолабмикс) и гексамерных праймеров (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя.

Методом ПЦР в режиме реального времени анализировали экспрессию генов плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*) в генетически модифицированной и исходной изогенной линиях ИПСК с нормировкой на два гена домашнего хозяйства: *ACTB* и *B2M*. Последовательности праймеров приведены в табл. S1. Реакции проводили с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Biolabmix) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Параметры программы: 98 °C – 30 с; 98 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 30 с, 35 циклов; 72 °C – 5 мин. Для каждого образца проанализированы три биологические и две технические повторности.

Результаты анализировали в программе qBase+ (CellCarta, <https://cellcarta.com/genomic-data-analysis/>) обобщенным методом $\Delta\Delta C_t$ с учетом эффективности реакции, рассчитанной по результатам построения калибровочной кривой по шести точкам.

Иммуофлуоресцентное окрашивание. Подготовку клеток и окрашивание антителами выполняли по протоколу, описанному ранее (Vaskova et al., 2015). Клетки фиксировали в 4 % растворе формальдегида в течение 10 мин, затем пермеабелизовали 0.5 % раствором тритона X-100 в течение 30 мин (для поверхностных антигенов данную стадию пропускали) и блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина в 1X PBS. Все процедуры осуществляли при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами производили в течение ночи при 4 °C. Со вторичными антителами клетки инкубировали в темноте при комнатной температуре 1 ч. Ядра клеток окрашивали DAPI. Снимки препаратов визуализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Ti-E (Nikon) с использованием программного обеспечения NIS Advanced Research. Список первичных и вторичных антител представлен в табл. S2.

Спонтанная дифференцировка *in vitro*. Для подтверждения сохранения свойств плюрипотентности генетически модифицированных ИПСК проводили спонтанную дифференцировку путем формирования эмбрионидных тел в течение 14 дней. Сформировавшиеся эмбрионидные тельца пересаживались на обработанные плашки Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific) с матригелем (Corning) и культивировались до достижения 21 дня.

Результаты

В настоящей работе получена генетически модифицированная линия ИПСК ICGi036-A-1 со скорректированным патогенным аллельным вариантом с.530C>T гена *LDLR* от пациента-компаундной гетерозиготы, ассоциированной с СГХС. Для генетической коррекции данного патогенного варианта был использован метод редактирования оснований, для реализации которого сконструирован эписомный вектор pC9-sgRNA-mCherry, содержащий универсальный сайт для клонирования любых спейсеров направляющей РНК CRISPR/Cas-систем и последовательность гена красного флуоресцентного белка mCherry. Использование полученной плазмиды для доставки систем редактирования в клетку позволяет на ранних этапах (24–48 ч) визуализировать результаты трансфекции и, в случае успеха, проводить отбор клеток методом проточной цитометрии.

В полученный универсальный вектор встроены последовательности спейсеров направляющих РНК, выбранные в рамках данной работы. В результате созданы две плазмиды: pC9-530-mCherry – для коррекции патогенной замены с.530C>T гена *LDLR*, и pC9-1054_2-mCherry – для коррекции вероятно патогенной замены с.1054T>C. Полученные плазмиды вместе с плазмидами, кодирующими последовательности аденинового и цитозинового редакторов оснований, доставлены посредством липофекции в ИПСК линии ICGi036-A (Zakharova et al., 2022a). Через 24 и 48 ч в культуре трансфицированных ИПСК детектировались клетки, имеющие красное свечение белка mCherry, что свидетельствует об успешной доставке и функционировании плазмид, кодирующих последовательности спейсеров и флуоресцентного белка в результате липофекции (рис. 2, а).

В результате анализа 96 полученных субклонов методом секвенирования по Сэнгеру выявлен один субклон 130S5, в котором произошла коррекция позиции с.530C>T патогенного аллельного варианта гена *LDLR* до позиции с.530C, соответствующей референсной последовательности гена (см. рис. 2, в). Скорректировать замену с.1054T>C не удалось.

Анализ коротких tandemных повторов (STR) продемонстрировал соответствие полученной линии ИПСК ICGi036-A-1 исходной изогенной линии ICGi036-A и мононуклеарным клеткам пациента по 26 полиморфным локусам (Zakharova et al., 2022a) (табл. S3).

Для того чтобы подтвердить, что полученные генетически модифицированные ИПСК ICGi036-A-1 сохранили свойства самообновления и плюрипотентности, были проанализированы маркеры плюрипотентности и способность ИПСК образовывать производные трех зародышевых листков. В результате иммуофлуоресцентного окрашивания антителами к транскрипционным факторам *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* и поверхностному антигену SSEA4 продемонстрировано, что все колонии ИПСК 130S5 позитивны по данным маркерам (см. рис. 2, з). Исследование относительной экспрессии генов плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени подтвердило, что уровень их экспрессии достоверно не отличается от изогенного контроля – исходной линии ICGi036-A (см. рис. 2, д). При этом генетически модифицированная линия ИПСК

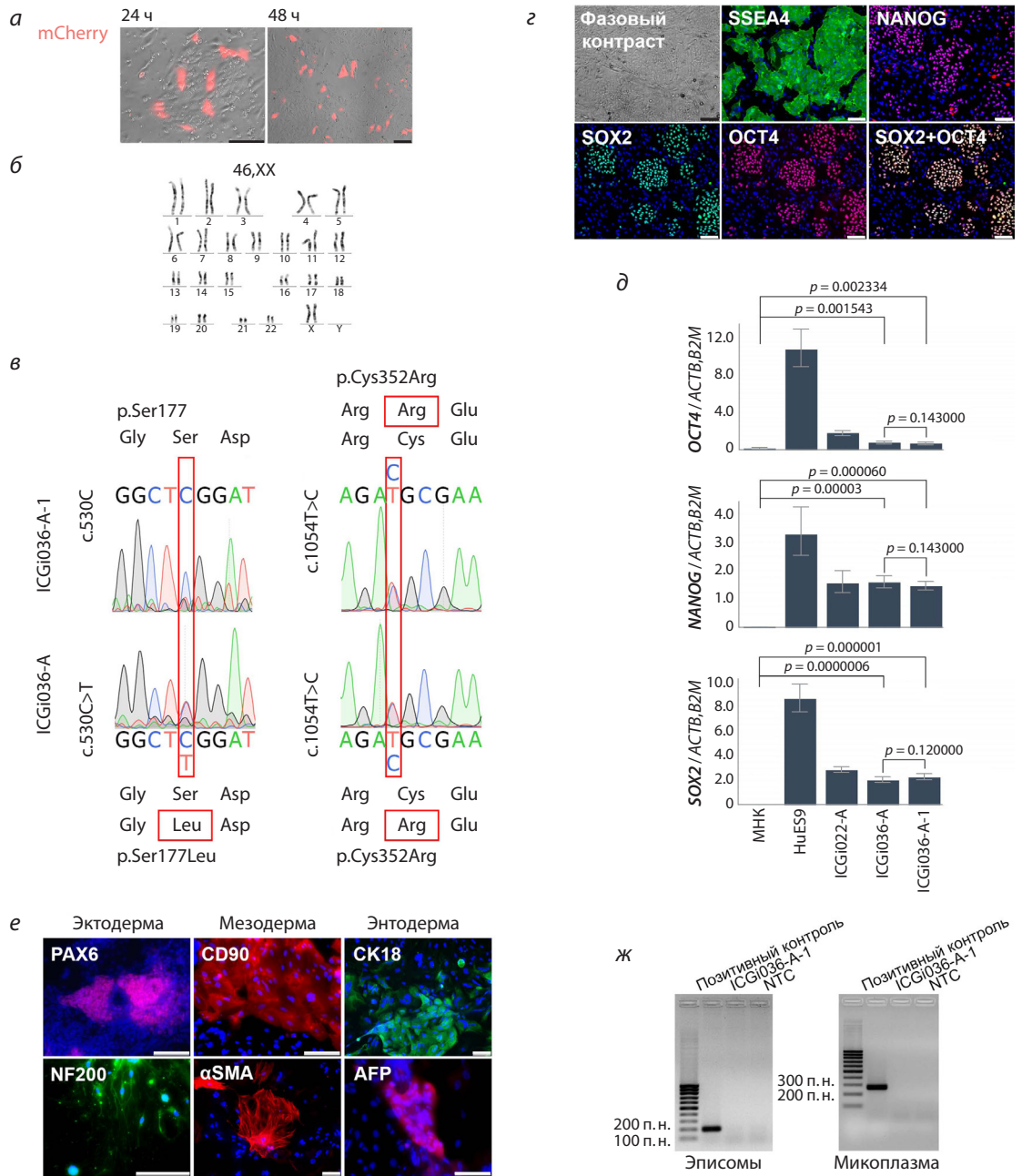


Рис. 2. Характеристика изогенной генетически модифицированной линии ИПСК ICGi036-A-1 со скорректированным патогенным аллельным вариантом с.530С>Т.

а – свечение флуоресцентного белка mCherry в ИПСК через 24 и 48 ч после трансфекции; *б* – кариотип полученной линии ИПСК; *в* – хроматограммы, подтверждающие наличие скорректированной до с.530С позиции в линии ICGi036-A-1; *г* – морфология колоний и окраска антителами к маркерам плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2, SSEA4 в полученной линии ICGi036-A-1; *д* – анализ экспрессии генов плюрипотентности OCT4, NANOG, SOX2 методом ПЦР в реальном времени; *е* – подтверждение способности линии ICGi036-A-1 дифференцироваться в производные трех зародышевых листков; *ж* – подтверждение отсутствия эписомных векторов и контаминации микоплазмой в линии ICGi036-A-1. NTC (no template control) – негативный контроль без матрицы. Масштабная линейка на всех изображениях – 100 мкм.

ICGi036-A-1 демонстрирует достоверно более высокий уровень экспрессии генов плюрипотентности по сравнению с мононуклеарными клетками (МНК), из которых получена исходная изогенная линия ИПСК ICGi036-A. Анализ спонтанной дифференцировки линии ICGi036-A-1 выявил наличие гетерогенной популяции клеток, среди которых с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания обнаружены производные, позитивные по характерным

маркерам экто- (PAX6, NF200), мезо- (CD90, αSMA) и энтодермы (CK18, AFP) (см. рис. 2, *е*). Таким образом, полученная генетически модифицированная линия ИПСК проявляет способность давать производные трех первичных зародышевых листков, что является ключевым свойством плюрипотентных стволовых клеток.

Генетически модифицированные ИПСК ICGi036-A-1 имеют нормальный диплоидный кариотип 46,XX (см.

рис. 2, б). Исследование 23 полиморфных локусов коротких tandemных повторов подтвердило идентичность между ИПСК ICGi036-A-1 и исходными изогенными ИПСК ICGi036-A. В полученных ИПСК отсутствуют эпизомные векторы на 10-м пассаже и контаминация микоплазмой на 25-м пассаже (см. рис. 2, ж).

Паспорт полученной клеточной линии приведен в табл. S4.

Обсуждение

Развитие технологий, связанных с получением и применением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, принесло новые возможности в биологические исследования и биомедицинские разработки. Благодаря доступному малоинвазивному способу получения, неограниченному пролиферативному потенциалу и способности к направленной дифференцировке во все типы клеток взрослого организма, ИПСК используются для разработки релевантных моделей заболеваний человека, высокопроизводительного скрининга лекарственных препаратов и создания высокотехнологичных биомедицинских клеточных продуктов (Cerneckis et al., 2024).

Пациент-специфические клеточные модели на основе дифференцированных производных ИПСК способствуют расширению понимания молекулярно-генетических основ заболеваний и разработке более эффективной таргетной терапии (Brooks et al., 2022). Так, например, ранее нашей группой созданы ИПСК пациентов с семейной гиперхолестеринемией, несущие патогенные аллельные варианты гена рецепторов липопротеинов низкой плотности *LDLR* (Zakharova et al., 2022a–c). С помощью направленной дифференцировки ИПСК мы впервые получили и исследовали эндотелиальные клетки пациентов с СГХС (Zakharova et al., 2024). Оказалось, что эндотелиоциты пациентов, дифференцированные из ИПСК и не подвергавшиеся воздействию окислительного стресса, демонстрируют нарушение функционирования рецепторов *LDLR* и имеют признаки эндотелиальной дисфункции. Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов развития атеросклероза при СГХС.

Одним из важнейших направлений биомедицины является сочетание технологий ИПСК и методов редактирования генома. Этот подход позволяет создавать изогенные клеточные модели для нивелирования влияния генетического фона и корректного исследования физиологических изменений, происходящих в релевантных дифференцированных клетках (Niemitz, 2014; Omer et al., 2017; Kawatani et al., 2021; Liang et al., 2022; Wang et al., 2022; Chai et al., 2023; Bonnycastle et al., 2024). Изогенные системы ИПСК могут быть получены как путем внесения изменения в последовательность ДНК клеток здорового донора, так и путем исправления патогенного аллельного варианта в ИПСК пациента с заболеванием (Nandy et al., 2023; Pavlova et al., 2023). В данной работе с использованием CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования оснований создана генетически модифицированная линия ICGi036-A-1, изогенная ранее полученной нами линии ИПСК ICGi036-A от пациента-компаундной гетерозиготы по патогенному и вероятно патогенному аллельным вариантам гена *LDLR* с СГХС (Zakharova et al., 2022a).

В генетически модифицированной линии ICGi036-A-1 произошла коррекция патогенного аллельного варианта с.530C>T до референсного с.530C. Линия ИПСК демонстрирует сохранение плюрипотентности, имеет нормальный кариотип и по набору коротких tandemных повторов идентична исходной изогенной линии ИПСК ICGi036-A.

В полученной изогенной линии ИПСК ICGi036-A-1 осталась нескорректированной вторая позиция – с.1054T>C. В настоящее время статус данного аллельного варианта определяется как «патогенный/вероятно патогенный». Исследование дифференцированных производных ИПСК пациента-компаундной гетерозиготы со скорректированной одной позицией с.530C позволит внести вклад в уточнение статуса позиции с.1054T>C.

Для таргетной коррекции однонуклеотидных последовательностей в гене *LDLR* мы применили метод редактирования оснований, обладающий более высокой точностью по сравнению с классической технологией CRISPR-Cas9 и позволяющий генерировать целевые точечные замены последовательности ДНК посредством гидролитического дезаминирования без формирования двуцепочечных разрывов (Hu et al., 2018; Porto et al., 2020). Этот метод ранее успешно применялся для создания изогенных клеточных линий при моделировании ряда заболеваний: болезни Альцгеймера (коррекция последовательности гена *APOE4*), серповидно-клеточной анемии (ген β-глобина), прогерии Хатчинсона–Гилфорда (ген ламина А), наследственного гемохроматоза (*HFE*), некоторых видов рака (ген *TP53*) (Komor et al., 2016; Gaudelli et al., 2017; Koblan et al., 2021; Newby et al., 2021).

С 2022 г. компанией Verve Therapeutics проводится первое клиническое исследование по редактированию оснований в терапевтических целях для лечения СГХС препаратом VERVE-101 (ClinicalTrials.gov ID NCT05398029). В качестве таргетного гена в тестируемом препарате VERVE-101 используется *PCSK9*. Вносимая в этот ген посредством редактирования оснований замена нарушает синтез белка *PCSK9*, что, в свою очередь, нарушает деградацию рецепторов *LDLR* и приводит к снижению концентрации ЛПНП в плазме крови (Rothgangl et al., 2021). Однако в случае патогенных аллельных вариантов *LDLR*, нарушающих синтез рецептора или его выход на клеточную поверхность, таких как с.530C>T и с.1054T>C, данный препарат не будет эффективен для пациентов с СГХС. В этой связи разработка новых клеточных моделей СГХС с применением более безопасных систем редактирования генома клеток остается актуальной задачей.

Полученная нами система изогенных клеточных линий ИПСК пациента с СГХС может быть полезна для исследования особенностей функционирования релевантных дифференцированных производных, например, эндотелиоцитов и гепатоцитов, вовлеченных в проявление данного заболевания, а также для разработки подходов скрининга фармакологических соединений – потенциальных лекарственных препаратов для эффективной терапии семейной гиперхолестеринемии.

В настоящее время имеются примеры клинических исследований ряда препаратов, выбранных с помощью клеточных моделей на основе ИПСК: бокового амиотрофического склероза, прогрессирующей оссифицирующей

фибродисплазии, синдрома Пендредда, болезни Альцгеймера (Okano, Morimoto, 2022). Такой подход экономически разумен, поскольку позволяет проводить первую линию скрининга химических соединений без использования менее релевантных и более дорогих животных моделей.

Несмотря на многочисленные преимущества ИПСК для моделирования заболеваний, существует ряд ограничений и проблем, которые необходимо преодолеть в ходе дальнейших исследований. Один из основных недостатков – функциональная незрелость многих получаемых из ИПСК дифференцированных производных (Brooks et al., 2022). В качестве решения данной проблемы развиваются подходы транскриптомного профилирования стадий дифференцированных производных ИПСК и разработки рабочих критериев для оценки зрелости клеточных моделей (Subramanian et al., 2019; Kannan et al., 2021). Другой проблемой является создание воспроизводимых релевантных моделей на основе интеграции нескольких клеточных типов производных ИПСК, отражающих патогенез заболевания в условиях клеточного взаимодействия. Преодоление этой проблемы предполагает использование клеточных органоидов или ассамблеидов (Brooks et al., 2022). Однако это не решает проблему эффективности и воспроизводимости из-за флуктуаций, обусловленных самоорганизацией органоидных систем. В качестве перспективного подхода для повышения воспроизводимости сложных интегрированных клеточных моделей в настоящее время рассматривается технология биопечати с заданным числом жизнеспособных клеток и паттерном их взаимодействия (Renner et al., 2020; Hofer, Lutolf, 2021; Lawlor et al., 2021).

Мы надеемся, что использование полученных нами клеточных моделей на основе изогенных линий ИПСК пациентов с СГХС внесет вклад в более полное понимание механизмов развития заболевания и приблизит возможность разработки более эффективных лекарственных препаратов, повысив результативность лечения, улучшив качество и продолжительность жизни пациентов.

Заключение

В представленной работе мы получили и детально охарактеризовали генетически модифицированную линию ИПСК ICGi036-A-1, изогенную линии пациента с СГХС – компаундной гетерозиготы по патогенному и вероятно патогенному аллельным вариантам гена *LDLR*: с.530C>T (p.Ser177Leu) и с.1054T>C (p.Cys352Arg) соответственно. В полученной линии произошла коррекция позиции с.530C>T до референсной с.530C. Новая линия ИПСК будет использована для создания релевантных клеточных моделей на основе дифференцированных производных, необходимых для исследования проявлений заболевания на отдельных клеточных типах и разработки подходов таргетной терапии семейной гиперхолестеринемии.

Список литературы / References

Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Д.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной демен-

цией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76 [Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadtochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant с.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76]

Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., Воевода М.И., Сергиенко И.В., Шахтштейнер Е.В., Покровский С.Н., Коновалов Г.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербаклова М.Ю., Захарова И.Н., Балахоннова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз*. 2019;15(1):58-98 [Ezhov M.V., Bazhan S.S., Ershova A.I., Meshkov A.N., Sokolov A.A., Kukharchuk V.V., Gurevich V.S., Voevoda M.I., Sergienko I.V., Shakhshneider E.V., Pokrovsky S.N., Konovalov G.A., Leontyeva I.V., Konstantinov V.O., Sheherbakova M.Yu., Zakharova I.N., Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedzhanov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetsky B.M. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerоз*. 2019;15(1):58-98 (in Russian)]

Захарова И.С., Шевченко А.И., Закиян С.М. Семейная гиперхолестеринемия: современные сведения и проблемы моделирования. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024; 10(1):5-14. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-2

[Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Zakian S.M. Familial hypercholesterolemia: current insight and challenges in its modelling. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(1):5-14. doi 10.18699/letvjgb-2024-10-2 (in Russian)]

Bauer D.E., Canver M.C., Orkin S.H. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp*. 2015; 95:e52118. doi 10.3791/52118

Bonnycastle L.L., Swift A.J., Mansell E.C., Lee A., Winnicki E., Li E.S., Robertson C.C., Parsons V.A., Huynh T., Krilow C., Mohlke K.L., Erdos M.R., Narisu N., Collins F.S. Generation of human isogenic induced pluripotent stem cell lines with CRISPR prime editing. *Cris J*. 2024;7(1):53-67. doi 10.1089/crispr.2023.0066

Bourbon M., Alves A.C., Medeiros A.M., Silva S., Soutar A.K. Familial hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis*. 2008; 196(2):633-642. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.019

Brooks I.R., Garrone C.M., Kerins C., Kiar C.S., Syntaka S., Xu J.Z., Spagnoli F.M., Watt F.M. Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling. *Stem Cell Rep*. 2022;17(5):1033-1047. doi 10.1016/j.stemcr.2022.03.019

Cerneckis J., Cai H., Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):112. doi 10.1038/s41392-024-01809-0

Chai A.C., Cui M., Chemello F., Li H., Chen K., Tan W., Atmanli A., McAnally J.R., Zhang Y., Xu L., Liu N., Bassel-Duby R., Olson E.N. Base editing correction of hypertrophic cardiomyopathy in human cardiomyocytes and humanized mice. *Nat Med*. 2023;29(2):401-411. doi 10.1038/s41591-022-02176-5

Choppa P.C., Vojdani A., Tagle C., Andrin R., Magtoto L. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol Cell Probes*. 1998;12(5):301-308. doi 10.1006/mcpr.1998.0186

Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-1356. doi 10.1056/nejmsr040330

- Ference B.A., Ginsberg H.N., Graham I., Ray K.K., Packard C.J., Bruckert E., Hegele R.A., Krauss R.M., Raal F.J., Schunkert H., Watt G.F., Borén J., Fazio S., Horton J.D., Masana L., Nicholls S.J., Nordestgaard B.G., Van De Sluis B., Taskinen M.R., Tokgözoğlu L., Landmesser U., Laufs U., Wiklund O., Stock J.K., Chapman M.J., Catapano A.L. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-2472. doi 10.1093/eurheartj/ehx144
- Fularski P., Hajdys J., Majchrowicz G., Stabrawa M., Młynarska E., Rysz J., Franczyk B. Unveiling familial hypercholesterolemia – review, cardiovascular complications, lipid-lowering treatment and its efficacy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1637. doi 10.3390/ijms25031637
- Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 2017;551(7681):464-471. doi 10.1038/nature24644
- Gu J., Gupta R.N., Cheng H.K., Xu Y., Raal F.J. Current treatments for the management of homozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and commentary. *Eur J Prev Cardiol.* 2024; 31(15):1833-1849. doi 10.1093/eurjpc/zwae144
- Harada-Shiba M. Impact of familial hypercholesterolemia diagnosis in real-world data. *J Atheroscler Thromb.* 2023;30(10):1303. doi 10.5551/jat.ED241
- Hendricks-Sturup R.M., Clark-Locascio J., Lu C.Y. A global review on the utility of genetic testing for familial hypercholesterolemia. *J Pers Med.* 2020;10(2):23. doi 10.3390/jpm10020023
- Hofer M., Lutolf M.P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater.* 2021; 6(5):402-420. doi 10.1038/s41578-021-00279-y
- Hopkins P.N., Toth P.P., Ballantyne C.M., Rader D.J. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the national lipid association expert panel on familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2011;5(3):S9. doi 10.1016/j.jacl.2011.03.452
- Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature.* 2018;556(7699):57-63. doi 10.1038/nature26155
- Huang C.C., Niu D.M., Chang M.J. Genetic analysis in a Taiwanese cohort of 750 index patients with clinically diagnosed familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2022;29(5):639-653. doi 10.5551/jat.62773
- Jannes C.E., Santos R.D., de Souza Silva P.R., Turolla L., Gagliardi A.C.M., Marsiglia J.D.C., Chacra A.P., Miname M.H., Rocha V.Z., Filho W.S., Krieger J.E., Pereira A.C. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis.* 2015;238(1):101-107. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.009
- Kannan S., Farid M., Lin B.L., Miyamoto M., Kwon C. Transcriptomic entropy benchmarks stem cell-derived cardiomyocyte maturation against endogenous tissue at single cell level. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(9):e1009305. doi 10.1371/journal.pcbi.1009305
- Kawatani K., Nambara T., Nawa N., Yoshimatsu H., Kusakabe H., Hirata K., Tanave A., Sumiyama K., Banno K., Taniguchi H., Arahori H., Ozono K., Kitabatake Y. A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome. *Commun Biol.* 2021;4(1):730. doi 10.1038/s42003-021-02242-7
- Koblan L.W., Erdos M.R., Wilson C., Cabral W.A., Levy J.M., Xiong Z.M., Tavarez U.L., Davison L.M., Gete Y.G., Mao X., Newby G.A., Doherty S.P., Narisu N., Sheng Q., Krilow C., Lin C.Y., Gordon L.B., Cao K., Collins F.S., Brown J.D., Liu D.R. *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature.* 2021;589(7843):608-614. doi 10.1038/s41586-020-03086-7
- Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533(7603):420-424. doi 10.1038/nature17946
- Lawlor K.T., Vanslambrouck J.M., Higgins J.W., Chambon A., Bishard K., Arndt D., Er P.X., Wilson S.B., Howden S.E., Tan K.S., Li F., Hale L.J., Shepherd B., Pentoney S., Presnell S.C., Chen A.E., Little M.H. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater.* 2021;20(2):260-271. doi 10.1038/s41563-020-00853-9
- Liang Y., Sun X., Duan C., Zhou Y., Cui Z., Ding C., Gu J., Mao S., Ji S., Chan H.F., Tang S., Chen J. Generation of a gene-corrected human iPSC line (CSUASOi004-A-1) from a retinitis pigmentosa patient with heterozygous c.2699G>A mutation in the *PRPF6* gene. *Stem Cell Res.* 2022;64:103572. doi 10.1016/j.scr.2022.102911
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.* 2020;48:101952. doi 10.1016/j.scr.2020.101952
- Meshkov A., Ershova A., Kiseleva A., Zotova E., Sotnikova E., Petukhova A., Zharikova A., Malyshev P., Rozhkova T., Blokhina A., Limonova A., Ramensky V., Divashuk M., Khasanova Z., Bukaeva A., Kurilova O., Skirko O., Pokrovskaya M., Mikova V., Snigir E., Akinshina A., Mitrofanov S., Kashtanova D., Makarov V., Kukhar-chuk V., Boytsov S., Yudin S., Drapkina O. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes.* 2021;12(1):66. doi 10.3390/genes12010066
- Mohd Nor N.S., Al-Khateeb A.M., Chua Y.A., Mohd Kasim N.A., Mohd Nawawi H. Heterozygous familial hypercholesterolaemia in a pair of identical twins: a case report and updated review. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):106. doi 10.1186/s12887-019-1474-y/tables/2
- Nandy K., Babu D., Rani S., Joshi G., Ijee S., George A., Palani D., Premkumar C., Rajesh P., Vijayanand S., David E., Murugesan M., Velayudhan S.R. Efficient gene editing in induced pluripotent stem cells enabled by an inducible adenine base editor with tunable expression. *Sci Rep.* 2023;13(1):21953. doi 10.1038/s41598-023-42174-2
- Nazarenko M.S., Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Salakhov R.R., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Zheltysheva N.V., Ezhov M.V., Kukhar-chuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M., Zakharova I.S. Calling and phasing of single-nucleotide and structural variants of the *LDLR* gene using Oxford Nanopore MinION. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4471. doi 10.3390/ijms24054471
- Newby G.A., Yen J.S., Woodard K.J., Mayuranathan T., Lazzarotto C.R., Li Y., Sheppard-Tillman H., Porter S.N., Yao Y., Mayberry K., Everette K.A., Jang Y., Podracky C.J., Thaman E., Lechavue C., Sharma A., Henderson J.M., Richter M.F., Zhao K.T., Miller S.M., Wang T., Koblan L.W., McCaffrey A.P., Tisdale J.F., Kalfa T.A., Pruett-Miller S.M., Tsai S.Q., Weiss M.J., Liu D.R. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature.* 2021;595(7866):295-302. doi 10.1038/s41586-021-03609-w
- Niemitz E. Isogenic iPSC-derived models of disease. *Nat Genet.* 2014;46(1):7. doi 10.1038/ng.2864
- Okano H., Morimoto S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell.* 2022; 29(2):189-208. doi 10.1016/j.stem.2022.01.007
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells.* 2013;31(3):458-466. doi 10.1002/stem.1293
- Omer L., Hudson E.A., Zheng S., Hoying J.B., Shan Y., Boyd N.L. CRISPR correction of a homozygous low-density lipoprotein receptor mutation in familial hypercholesterolemia induced pluripotent stem cells. *Hepatol Commun.* 2017;1(9):886-898. doi 10.1002/hep4.1110

- Palacios L., Grandoso L., Cuevas N., Olano-Martín E., Martínez A., Tejedor D., Stef M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):137-142. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.021
- Pavlova S.V., Shayakhmetova L.S., Pronyaeva K.A., Shulgina A.E., Zakian S.M., Demytyeva E.V. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi022-A-3, ICGi022-A-4, and ICGi022-A-5 with p.Asn515del mutation introduced in *MYBPC3* using CRISPR/Cas9. *Russ J Dev Biol*. 2023;54:96-103. doi 10.1134/S1062360423010113
- Porto E.M., Komor A.C., Slaymaker I.M., Yeo G.W. Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19(12):839-859. doi 10.1038/s41573-020-0084-6
- Ray K.K., Ference B.A., Séverin T., Blom D., Nicholls S.J., Shiba M.H., Almahmeed W., Alonso R., Daccor M., Ezhov M., Olmo R.F., Jankowski P., Lanas F., Mehta R., Puri R., Wong N.D., Wood D., Zhao D., Gidding S.S., Virani S.S., Lloyd-Jones D., Pinto F., Perrel P., Santos R.D. World Heart Federation Cholesterol Roadmap 2022. *Glob Heart*. 2022;17(1):75. doi 10.5334/gh.1154
- Ray K.K., Pillas D., Hadjiphilippou S., Khunti K., Seshasai S.R.K., Vallejo-Vaz A.J., Neasham D., Addison J. Premature morbidity and mortality associated with potentially undiagnosed familial hypercholesterolemia in the general population. *Am J Prev Cardiol*. 2023; 15:100580. doi 10.1016/j.ajpc.2023.100580
- Renner H., Grabos M., Becker K.J., Kagermeier T.E., Wu J., Otto M., Peischard S., Zeuschner D., Tsytysura Y., Disse P., Klingauf J., Leidel S.A., Seebohm G., Schöler H.R., Bruder J.M. A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *eLife*. 2020;9:e52904. doi 10.7554/eLife.52904
- Rothgangl T., Dennis M.K., Lin P.J.C., Oka R., Witzigmann D., Villiger L., Qi W., Hruzova M., Kissling L., Lenggenger D., Borrelli C., Egli S., Frey N., Bakker N., Walker J.A., Kadina A.P., Victorov D.V., Pacesa M., Kreutzer S., Kontarakis Z., Moor A., Jinek M., Weissman D., Stoffel M., van Boxtel R., Holden K., Pardi N., Thöny B., Häberle J., Tam Y.K., Semple S.C., Schwank G. *In vivo* adenine base editing of *PCSK9* in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol*. 2021;39(8):949-957. doi 10.1038/s41587-021-00933-4
- Semenova A.E., Sergienko I.V., García-Giustiniani D., Monserrat L., Popova A.B., Nozadze D.N., Ezhov M.V. Verification of underlying genetic cause in a cohort of Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted next generation sequencing. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020;7(2):16. doi 10.3390/jcdd7020016
- Setia N., Saxena R., Arora A., Verma I.C. Spectrum of mutations in homozygous familial hypercholesterolemia in India, with four novel mutations. *Atherosclerosis*. 2016;255:31-36. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.028
- Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Timoshchenko O., Orlov P., Semaev S., Valeev E., Goonko A., Ladygina N., Voevoda M. Analysis of rare variants in genes related to lipid metabolism in patients with familial hypercholesterolemia in Western Siberia (Russia). *J Pers Med*. 2021;11(11):1232. doi 10.3390/jpm11111232
- Sharifi M., Walus-Miarka M., Idziór-Waluś B., Malecki M.T., Sanak M., Whittall R., Li K.W., Futema M., Humphries S.E. The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in south-eastern Poland. *Metabolism*. 2016;65(3):48-53. doi 10.1016/j.metabol.2015.10.018
- Siegner S.M., Karasu M.E., Schröder M.S., Kontarakis Z., Corn J.E. PnB Designer: a web application to design prime and base editor guide RNAs for animals and plants. *BMC Bioinformatics*. 2021; 22(1):101. doi 10.1186/s12859-021-04034-6
- Subramanian A., Sidhom E.H., Emani M., Vernon K., Sahakian N., Zhou Y., Kost-Alimova M., Slyper M., Waldman J., Dionne D., Nguyen L.T., Weins A., Marshall J.L., Rosenblatt-Rosen O., Regev A., Greka A. Single cell census of human kidney organoids shows reproducibility and diminished off-target cells after transplantation. *Nat Commun*. 2019;10(1):5462. doi 10.1038/S41467-019-13382-0
- Südhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 1985;228(4701):815-822. doi 10.1126/science.2988123
- Talmud P.J., Futema M., Humphries S.E. The genetic architecture of the familial hyperlipidaemia syndromes: rare mutations and common variants in multiple genes. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(4):274-281. doi 10.1097/MOL.000000000000090
- Thormaehlen A.S., Schuberth C., Won H.H., Blattmann P., Joggerst-Thomalla B., Theiss S., Asselta R., Duga S., Merlini P.A., Ardisino D., Lander E.S., Gabriel S., Rader D.J., Peloso G.M., Peperkoc R., Kathiresan S., Runz H. Systematic cell-based phenotyping of missense alleles empowers rare variant association studies: a case for *LDLR* and myocardial infarction. *PLoS Genet*. 2015; 11(2):e1004855. doi 10.1371/journal.pgen.1004855
- Tichý L., Freiberger T., Zapletalová P., Soška V., Ravčuková B., Fajkusová L. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Czech Republic: spectrum of *LDLR* mutations and genotype-phenotype correlations. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):401-408. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.014
- Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E., Nemudryy A.A., Elisaphenko E.A., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Evshin I.S., Sharipov R.N., Minina J.M., Zhdanova N.S., Khegay I.I., Kolpakov F.A., Sukhikh G.T., Pokushalov E.A., Karasov A.M., Vlasov V.V., Ivanova L.N., Zakian S.M. Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2015;24(24):2912-2924. doi 10.1089/scd.2015.0204
- Wang H., Luo Y., Li J., Guan J., Yang S., Wang Q. Generation of a gene corrected human isogenic iPSC line (CPGHi001-A-1) from a hearing loss patient with the TMC1 p.M418K mutation using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res*. 2022;60:102736. doi 10.1016/j.scr.2022.102736
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi036-A generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia caused due to compound heterozygous p.Ser177Leu/p.Cys352Arg mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022a;59:102653. doi 10.1016/j.scr.2022.102653
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Kalinin A.P., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi037-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to heterozygous p.Trp443Arg mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022b;60:102703. doi 10.1016/j.scr.2022.102703
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C>T/c.940+3_940+6del mutations in *LDLR*. *Stem Cell Res*. 2022c;60:102702. doi 10.1016/j.scr.2022.102702
- Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Arssan M.A., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Zarubin A.A., Zhelytsheva N.V., Shevchenko V.A., Tmoyan N.A., Saaya S.B., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. iPSC-derived endothelial cells reveal *LDLR* dysfunction and dysregulated gene expression profiles in familial hypercholesterolemia. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):689. doi 10.3390/ijms25020689

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.11.2024. После доработки 04.12.2024. Принята к публикации 09.12.2024.