

Форма «Т». Титульный лист заявки в Российский научный фонд
Конкурс 2021 года по мероприятию «Проведение исследований на базе
существующей научной инфраструктуры мирового уровня» Президентской
программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в
том числе молодыми учеными

Название проекта Увеличение эффективности гомологичной репарации при геномном редактировании		Номер проекта <div style="text-align: right; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">21-75-20150</div> 
		Отрасль знания: 05
		Основной код классификатора: 05-401 Дополнительные коды классификатора: 05-402 05-405
		Код ГРНТИ 34.15.23, 76.03.39
Фамилия, имя, отчество (при наличии) руководителя проекта: Лавров Александр Вячеславович		Контактные телефон и e-mail руководителя проекта: +79161139047, avlavrov@yandex.ru
Полное и сокращенное наименование организации, через которую должно осуществляться финансирование проекта: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" ФГБНУ "МГНЦ"		
Наименование ОИ: ЦКП "Геноаналитика" ЦКП «Геноаналитика»		
Объем финансирования проекта в 2021 г. 6000 тыс. руб.	Год начала проекта: 2021	Год окончания проекта: 2024
Фамилии, имена, отчества (при наличии) основных исполнителей (полностью)	Анучина Арина Артуровна Кондратьева Екатерина Владимировна <i>(руководитель проекта в данной графе не указывается)</i>	
Гарантирую, что при подготовке заявки не были нарушены авторские и иные права третьих лиц и/или имеется согласие правообладателей на представление в Фонд материалов и их использование Фондом для проведения экспертизы и для обнародования (в виде аннотаций заявок).		
Подпись руководителя проекта _____/А.В. Лавров/ Подпись руководителя организации* <i>* Либо уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа. В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации. Непредставление копии распорядительного документа или доверенности в случае подписания формы уполномоченным представителем организации, а также отсутствие расшифровки подписи, является основанием недопуска заявки к конкурсу.</i> _____/_____		Дата регистрации заявки 15.10.2020 г.

Форма 1. Сведения о проекте

1.1. Название проекта

на русском языке

Увеличение эффективности гомологичной репарации при геномном редактировании

на английском языке

Enhancement of homology repair efficacy in genome editing

Направление из Стратегии НТР РФ

НЗ Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)

Обоснование соответствия тематики проекта направлению из Стратегии НТР РФ: необходимо кратко сформулировать научную проблему (проблемы) и конкретные задачи в рамках выбранного направления, решению которых будет посвящен проект, обосновать соответствие проекта направлению

Нобелевская премия, присужденная в этом году Дженнифер Дудне и Эммануэль Шарпентье за создание методов геномного редактирования является, безусловно, одной из самых быстро выданных премий от момента сделанного открытия. Геномное редактирование стремительно перевернуло молекулярную биологию, генную инженерию и медицину. Нобелевские лауреаты предложили способ точно программируемого разрыва ДНК с использованием программируемых нуклеаз. Однако одним из серьезных препятствий для распространения нового метода в клинической практике стала низкая эффективность гомологичной репарации (ГР) - клеточного механизма восстановления двуцепочечных разрывов ДНК. Именно ГР позволяет восстановить в области разрыва нормальную последовательность ДНК в случае мутаций, вызывающих наследственные заболевания. В большинстве случаев разрывы восстанавливаются методом негомологичного соединения концов, что не может быть использовано для коррекции большинства патогенных изменений ДНК. В настоящее время остается нерешенной проблема получения клинически значимого количества клеток с корректно восстановленной областью разрыва. Цель работы: повысить эффективность гомологичной репарации для прецизионного геномного редактирования методом CRISPR/Cas9.

1.2. Приоритетное направление развития науки, технологий и техники в Российской Федерации, критическая технология

Указывается согласно перечню (Указ Президента Российской Федерации от 7 июля 2011 года №899) в случае, если тематика проекта может быть отнесена к одному из приоритетных направлений, а также может внести вклад в развитие критических технологий Российской Федерации.

4. Науки о жизни.

5. Геномные, протеомные и постгеномные технологии.

1.3. Ключевые слова (приводится не более 15 терминов)

на русском языке

CRISPR-Cas9, редактирование генома, генная терапия, гомологическая рекомбинация, негомологичное соединение концов

на английском языке

CRISPR-Cas9, genome editing, gene therapy, homologous recombination, non-homologous end-joining

1.4. Аннотация проекта (объемом не более 2 стр.; в том числе кратко – актуальность решения указанной выше научной проблемы и научная новизна)

Данная информация может быть опубликована на сайте Фонда в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

на русском языке

Технологии геномного редактирования, включая использование CRISPR/Cas9 можно использовать для коррекции («редактирования») мутаций и разрабатывать этиотропную терапию неизлечимых до сих пор болезней [Смирнихина С.А., 2016; Hockemeyer D, 2016; Maeder ML, 2016; Prakash V, 2016]. Однако опубликованные ранее работы [Firth AL, 2015; Lee CM, 2012; Suzuki S, 2016; Hollywood JA, 2016; Crane AM, 2015; Bednarski C, 2016; Camarasa MV, 2016; Schwank G, 2013] демонстрируют крайне низкую эффективность успешного редактирования (<<1% клеток), что является общей проблемой технологии геномного редактирования. В большинстве случаев применения CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций требуется провести репарацию ДНК после разрыва программируемыми нуклеазами с одновременным

восстановлением нормальной копии аллеля, что достигается за счет включения клеточных механизмов гомологичной репарации (ГР). Однако, в клетке на протяжении её цикла доминирует механизм негомологичного соединения концов (НГСК), который приводит к образованию вставок и делеций (инделов) в месте разрыва ДНК. Поэтому важно сдвинуть баланс от НГСК/ГР в пользу второго механизма. Это позволит не только надеяться на разработку новых методов геномного редактирования *in vivo* с целью этиотропного лечения наследственных заболеваний, но и может существенно повысить эффективность других генноинженерных работ с использованием ГР.

В работе будут впервые изучены по отдельности и в комбинациях факторы, влияющие на эффективность гомологичной репарации (ГР) на фоне гипо- и гиперэкспрессии факторов контроля путей репарации – TIRR, MAD2L2: синхронизатор клеточного цикла винбластин, ингибитор лигазы IV, геминин, доставка CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов и новый метод праймированного редактирования (ПР).

В лаборатории уже выполнены часть работ по изучению влияния TIRR, MAD2L2, результаты которых лягут в основу предлагаемого проекта. Методики, необходимые для проведения экспериментов, связанные с получением генноинженерных конструкций, оценки эффективности CRISPR/Cas9, культивирования клеток, получения и функциональной характеристики органоидов проработаны детально и используются научным коллективом в течение нескольких лет.

Для оценки эффектов необходимо применение NGS, как и для оценки безопасности метода. Для этих задач возможности ЦКП «Геноаналитика» (полногеномное и таргетное секвенирование, транскриптомное исследование) и их большой опыт работы на разных платформах NGS будут несомненно полезны и найдут свое приложение в текущем проекте.

Поставленные задачи представляются достижимыми, запланированные результаты будут получены к концу выполнения проекта.

на английском языке

Genome editing technologies including CRISPR/Cas9 can be used for the corrections of variable mutations and development of new etiotropic approaches to successfully treat previously incurable diseases [Smirnikhina S.A., 2016; Hockemeyer D, 2016; Maeder ML, 2016; Prakash V, 2016]. However previously published data [Firth AL, 2015; Lee CM, 2012; Suzuki S, 2016; Hollywood JA, 2016; Crane AM, 2015; Bednarski C, 2016; Camarasa MV, 2016; Schwank G, 2013] demonstrate extremely low precise editing efficacy (<<1%) which is the major technological problem of modern genome editing era. In most of the cases of hereditary diseases it's necessary to restore a normal copy of the gene after targeted DNA break at the mutation locus by homologous repair. But during the cell cycle mainly NHEJ repairs the DNA breaks, inducing indel in the breaked locus and it's important to shift the balance between NHEJ/HR to HR. This will hopefully not only help to develop new *in vivo* therapies but also will improve many genetic engineering methods based on HR.

For the first time, the work will study separately and in combinations the factors affecting the efficiency of homologous repair (HR) against the background of hypo- and overexpression of the factors controlling the repair pathways - TIRR, MAD2L2: cell cycle synchronizer - vinblastine, inhibitor of ligase IV, geminin, delivery of CRISPR/Cas9 by ribonucleoprotein complexes and prime editing.

The laboratory has already completed part of the work on studying the impact of TIRR, MAD2L2, the results of which will form the basis of the proposed project. The techniques necessary for conducting experiments related to the production of genetically engineered constructs, the assessment of the CRISPR/Cas9 efficiency, cell cultivation, the production and functional characteristics of organoids have been worked out in detail and have been used by the research team for several years.

To evaluate the effects, the use of NGS is necessary, as well as to assess the safety of the method. For these tasks, the capabilities of the "Genoanalityca" Center for Collective Use (genome-wide and targeted sequencing, transcriptomic research) and their extensive experience of working on various NGS platforms will undoubtedly be useful and will find their application in the current project.

The tasks set seem to be achievable, the planned results will be obtained by the end of the project.

1.5. Ожидаемые результаты и их значимость (указываются результаты, их научная и общественная значимость (соответствие предполагаемых результатов мировому уровню исследований, возможность практического использования ожидаемых результатов проекта в экономике и социальной сфере, вклад в решение конкретных задач выбранного научного направления из Стратегии НТР РФ))

Данная информация может быть опубликована на сайте Фонда в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

на русском языке

Будет разработаны методы повышения эффективности ГР при геномном редактировании органоидов методом CRISPR/Cas9.

Будут получены культуры органоидов из ИПСК больного муковисцидозом.

Впервые будут разработаны протоколы и получены результаты использования синхронизаторов клеточного цикла для синхронизации в фазе G2/M клеток, входящих в состав органоидов; трансфекции RNP в органоиды; ингибирования MAD2L2 и TIRR в органоидах с помощью малых интерферирующих РНК, сверхэкспрессии TIRR; применения ингибиторов лигазы IV, а также геминина, блокирующего активность CRISPR/Cas9 в фазы клеточного цикла, когда ГР невозможна или маловероятна.

Будут изучены эффекты и возможности комбинаций вышеперечисленных воздействий совместно с изменением экспрессии генов-регуляторов репарации разрывов ДНК для повышения уровня ГР.

Будет применено праймированное редактирование в клетках и в органоидах для исправления мутации F508del в гене CFTR и показан функциональный эффект такого редактирования, а также его безопасность с точки зрения возможных нецелевых воздействий на геном.

на английском языке

Methods will be developed to increase the efficiency of HR in genomic editing of organoids by the CRISPR/Cas9 method. Organoid cultures will be obtained from iPSCs of a patient with cystic fibrosis.

For the first time, protocols will be developed and the results of using cell cycle synchronizers for synchronization in the G2/M phase of cells of organoids will be obtained; transfection of RNP into organoids; inhibition of MAD2L2 and TIRR in organoids using small interfering RNAs, overexpression of TIRR; the use of inhibitors of ligase IV, as well as geminin, which blocks the activity of CRISPR/Cas9 in the phases of the cell cycle, when HR is impossible or unlikely.

The effects and possibilities of combinations of the above effects together with changes in the expression of genes regulating DNA breaks repair to increase the level of HR will be studied.

Prime editing in cells and organoids will be applied to correct the F508del mutation in the CFTR gene, and the functional effect of such editing, as well as its safety in terms of possible non-targeted effects on the genome, will be shown.

1.6. В состав научного коллектива будут входить:

Несоответствие состава научного коллектива (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) требованиям пункта 17 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу.

8 исполнителей проекта (включая руководителя),

В соответствии с требованиями пункта 17 конкурсной документации от 4 до 10 человек. Вне зависимости от того, в трудовых или гражданско-правовых отношениях исполнители состоят с организацией.

в том числе

7 исполнителей в возрасте до 39 лет включительно,

из них:

2 очных аспирантов, адъюнктов, интернов, ординаторов, студентов.

1.7. Планируемый состав научного коллектива с указанием фамилий, имен, отчеств (при наличии) членов коллектива, их возраста на момент подачи заявки, ученых степеней, должностей и основных мест работы, формы отношений с организацией (трудовой договор, гражданско-правовой договор) в период реализации проекта

на русском языке

1. Лавров Александр Вячеславович, 42 года, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор

2. Анучина Арина Артуровна, 25 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор, аспирант

3. Кондратьева Екатерина Владимировна, 36 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор

4. Демченко Анна Гасымовна, 24 года, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», аспирант, трудовой договор

5. Слесаренко Яна Сергеевна, 28 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор

6. Зайнитдинова Миляуша Иршатовна, 25 лет, научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор

7. Иванова Алиса Владимировна, 26 лет, младший научный сотрудник лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», трудовой договор

8. Ясиновский Матвей Ильич, 21 год, лаборант-исследователь лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ», студент, трудовой договор

на английском языке

1. Lavrov Alexander Vyacheslavovich, 42 years old, PhD, Leading Researcher of the Genome Editing Laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract
2. Anuchina Arina Arturovna, 25 years old, Researcher of the Genome Editing Laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract, resident student
3. Kondrateva Ekaterina Vladimirovna, 36 years old, researcher of the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract
4. Demchenko Anna Gasymovna, 24 years old, researcher of the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", graduate student, employment contract
5. Slesarenko Yana Sergeevna, 28 years old, researcher of the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract
6. Zainitdinova Milyausha Irshatovna, 25 years old, researcher at the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract
7. Ivanova Alisa Vladimirovna, 26 years old, junior researcher of the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", employment contract
8. Yasinovsky Matvey Ilyich, 21 years old, laboratory assistant-researcher of the genome editing laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution "RCMG", student, employment contract

Соответствие профессионального уровня членов научного коллектива задачам проекта

на русском языке

Основной тематикой лаборатории редактирования генома ФГБНУ «МГНЦ» является разработка эффективных методов коррекции мутаций, приводящих к моногенным наследственным заболеваниям (работы проводятся в рамках государственного задания Минобрнауки России, Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» 2018-2020 гг. и в рамках завершенного недавно гранта РФФИ). Начиная с 2016 года коллективом авторов опубликовано 14 статей в российских и зарубежных журналах в области редактирования генома, в том числе 2 в журнале Q1. Коллектив авторов сделал 34 доклада на научных конференциях по редактированию генома за последние 3 года, в том числе 25 устных (3 из них на зарубежных конференциях) и 9 постерных (6 на зарубежных конференциях). Вся работа по редактированию мутаций проводится на клеточных культурах HEK293T, CFTE290- и ИПСК. У научного коллектива имеется большой опыт создания плазмид. За последние несколько лет сотрудники лаборатории клонировали несколько десятков плазмид. В прошлом году начата работа с AAV векторами и показаны хорошие результаты. Члены научного коллектива много лет работают с разными клеточными культурами, такими как мезенхимные стромальные клетки, ИПСК, лимфоциты, миобласты, HEK293T, HeLa, A549, CFTE290-. Есть большой опыт получения и дифференцировки ИПСК. У коллектива имеется пять культур ИПСК от больных муковисцидозом, из которых можно получить дыхательные органоиды. У членов научного коллектива есть большой опыт проведения проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимического анализа. Таким образом, коллектив исполнителей обладает всеми необходимыми навыками для успешного выполнения молекулярно-генетической и клеточной части работы.

на английском языке

The main subject of the Laboratory of Genome Editing of the FSBSI "RCMG" is the development of effective methods for the correction of mutations leading to monogenic hereditary diseases (work is carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation, the Basic Research Program of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Basic Research for Biomedical Technologies" 2018-2020 and by Russian Science Foundation).

Since 2016, the research team published 11 articles in Russian and foreign journals in the field of genome editing, including the journal Q1. The team of authors made 34 reports at scientific conferences on genome editing over the past 3 years, including 25 oral (3 of them at foreign conferences) and 9 poster presentations (6 at foreign conferences). All mutation editing work is performed in HEK293T, CFTE290- and iPSC cell cultures. The research team has extensive experience in creating plasmids. Over the past few years, laboratory staff have cloned dozens of plasmids. Last year, work with AAV vectors was started and good results were shown. The team members have been working with various cell cultures for many years, such as mesenchymal stromal cells, iPSCs, lymphocytes, myoblasts, HEK293T, HeLa, A549, CFTE290-. Scientific team has extensive experience in obtaining and differentiating iPSCs. The team has five iPSC cultures from cystic fibrosis patients, from which respiratory organoids can be obtained. Members of the research team have extensive experience in conducting flow cytometry and immunohistochemical analysis. Thus, the team of performers has all the necessary skills for the successful implementation of the molecular genetic and cellular parts of the work.

1.8. Планируемый объем финансирования проекта Фондом по годам (указывается в тыс. рублей):

2021 г. - 6000 тыс. рублей,
2022 г. - 6000 тыс. рублей,
2023 г. - 6000 тыс. рублей,
2024 г. - 6000 тыс. рублей.

Несоответствие планируемого объема финансирования проекта (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) требованиям пункта 15 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу.

Планируемый объем софинансирования проекта по годам (указывается в тыс. рублей):

2021 г. - 0 тыс. рублей,
2022 г. - 0 тыс. рублей,
2023 г. - 0 тыс. рублей,
2024 г. - 0 тыс. рублей.

Носит информационный характер.

Сведения об источниках софинансирования и партнерах:

нет

1.9. Научный коллектив по результатам проекта в ходе его реализации предполагает опубликовать в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях не менее

Приводятся данные за весь период выполнения проекта. Уменьшение количества публикаций (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы) по сравнению с порогом, установленным в пункте 21.2 конкурсной документации, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

10 публикаций,

из них

10 в изданиях, индексируемых в базах данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (Scopus).

Информация о научных изданиях, в которых планируется опубликовать результаты проекта, в том числе следует указать в каких базах индексируются данные издания - «Сеть науки» (Web of Science Core Collection), «Скопус» (Scopus), РИНЦ, иные базы, а также указать тип публикации - статья, обзор, тезисы, монография, иной тип

Экспериментальные статьи и аналитические обзоры мы планируем подавать в журналы, индексируемые в Web of Science и входящие в Q1 (Molecular therapy. Nucleic acids; Scientific reports; Stem Cell Research & Therapy; Stem Cell Research; Journal of Cystic Fibrosis; Human Genetics; American Journal of Human Genetics; Protein & Cell). Многие из них распространяются по подписке, поэтому бесплатны. Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 5,8 (от 3,9 до 9,9). У нас есть опыт публикации в такого рода журналах. В случае неудачи будем подавать статьи в журналы Q2 (PLoS One; Stem Cells and Development; Molecular Diagnosis & Therapy; European Journal of Human Genetics; Molecular Medicine). Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 3,1 (от 2,8 до 3,7). В последнюю очередь будем ориентироваться на журналы Q3-4 (Current gene therapy; BMC Medical Genomics; Molecular Biology Reports; Transgenic Research; Biotechnology Letters; BMC Biotechnology; Molecular Biotechnology). Средний импакт-фактор этой группы журналов составляет 2,1 (от 1,7 до 2,6). Небольшие обзорные и экспериментальные статьи планируем подавать в российские журналы, входящие в Web of Science и/или Scopus: Вестник РГМУ, Генетика, Гены и клетки, Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Традиционно коллектив исполнителей участвует в нескольких европейских конференциях, тезисы которых публикуются в приложениях журналов, входящих в Web of Science (Q2-3): European Journal of Human Genetics; Journal of Cystic Fibrosis; FEBS Open Bio. Монографии и другие типы публикаций не планируем.

Иные способы обнародования результатов выполнения проекта

нет

1.10. Число публикаций членов научного коллектива, опубликованных в период с 1 января 2016 года до даты подачи заявки,

90, из них

38 – опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или в Scopus.

1.11. Планируемое участие научного коллектива в международных коллаборациях (проектах) (при наличии)
не планируется

Руководитель проекта подтверждает, что

- он провел предварительные консультации с представителями владельца ОИ по вопросам использования ОИ в случае победы в настоящем конкурсе, ознакомлен с существенными условиями использования ОИ (перечнем оборудования и методик измерений; перечнем выполняемых типовых работ и (или) оказываемых услуг с указанием единицы измерения выполняемой работы и (или) оказываемой услуги и их стоимостью в рублях или порядком определения их стоимости; регламентом доступа к оборудованию ОИ и условиями допуска к работе на оборудовании ОИ), содержащимися на сайте ОИ в сети «Интернет»;
- все члены научного коллектива (в том числе руководитель проекта) удовлетворяют пунктам 11, 12, 18 конкурсной документации;
- на весь период реализации проекта он будет состоять в трудовых отношениях с организацией;
- при обнародовании результатов любой научной работы, выполненной в рамках поддержанного Фондом проекта, он и его научный коллектив будут указывать на получение финансовой поддержки от Фонда и организацию, а также согласны с опубликованием Фондом аннотации и ожидаемых результатов поддержанного проекта, соответствующих отчетов о выполнении проекта, в том числе в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»;
- помимо гранта Фонда проект не будет иметь других источников финансирования в течение всего периода практической реализации проекта с использованием гранта Фонда;
- проект не является аналогичным по содержанию проекту, одновременно поданному на конкурсы научных фондов и иных организаций;
- проект не содержит сведений, составляющих государственную тайну или относимых к охраняемой в соответствии с законодательством Российской Федерации иной информации ограниченного доступа;
- доля членов научного коллектива в возрасте до 39 лет включительно в общей численности членов научного коллектива будет составлять не менее 50 процентов в течение всего периода практической реализации проекта;
- в установленные сроки будут представляться в Фонд ежегодные отчеты о выполнении проекта и о целевом использовании средств гранта.

Подпись руководителя проекта _____/А.В. Лавров/

Форма 2. Сведения о руководителе и основных исполнителях проекта

собираются автоматически (частично) на основе анкетных данных руководителя и исполнителей, подтвердивших свое участие. Список исполнителей формируется в "Форме Т"

Форма 2. Сведения о руководителе

2.1. Фамилия, имя, *отчество (при наличии)*

на русском языке

Лавров Александр Вячеславович

на английском языке фамилия и инициалы

Lavrov A.

WoS ResearcherID *(при наличии)*

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу www.ResearcherID.com.
<https://publons.com/researcher/J-8203-2013/>

Scopus AuthorID *(при наличии)*

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.
<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57195433184>

2.2. Дата рождения *(указывается цифрами – число, месяц, год)*

04.05.1978

2.3. Гражданство

РОССИЯ

2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.
Кандидат медицинских наук, 2004

2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах *(при наличии)*, участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий *(при наличии)*, участие в оргкомитетах или программных комитетах известных международных конференций, иной опыт организации международных мероприятий

ММА им. И.М. Сеченова, медаль имени Н.И. Пирогова «За лучшую студенческую научную работу», 2001

2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации *(сокращенное наименование организации)*

Руководитель проекта может на момент подачи заявки не являться работником организации, но, в случае победы в конкурсе, должен заключить с ней трудовой договор. В случае, если руководитель проекта не является гражданином Российской Федерации, организацией должны быть выполнены все процедуры, предусмотренные законодательством Российской Федерации при трудоустройстве иностранных граждан.
ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

2.7. Область научных интересов – ключевые слова *(приводится не более 15 ключевых слов)*

на русском языке

анализ экзома и транскриптома, строение и функция ядра, хронический миелоидный лейкоз, генетика рака, секвенирование следующего поколения, таргетная терапия, геномное редактирование

на английском языке

next gene sequencing, exome and transcriptome analysis, nuclear structure and function, chronic myeloid leukemia, cancer genetics, target therapy

2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

2.9. Перечень публикаций руководителя проекта, опубликованных в период с 1 января 2016 года до даты подачи заявки, подтверждающий выполнение условия пункта 14 конкурсной документации

Для лиц, находившихся в указанный в настоящем пункте период в отпусках по беременности и родам, отпусках по уходу за ребенком, а также отпусках работникам, усыновившим ребенка, допускается наличие соответствующих публикаций также в период, предшествующий 1 января 2016 года, и равный продолжительности таких отпусков.

Достаточно привести ссылки на публикации в количестве, равном установленному в конкурсной документации порогу. В случае представления публикации в изданиях, индексируемых в базе данных «Сеть науки» (Web of Science Core Collection) или «Скопус» (Scopus), входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>), данная статья в настоящем пункте указывается как одна публикация, но учитывается как две публикации. При этом необходимо указать на принадлежность издания к Q1 и на год принадлежности издания к Q1. Несоответствие количества публикаций (в том числе отсутствие информации в соответствующих полях формы или отсутствие информации о принадлежности издания к Q1), приводимое в перечне и/или численно в строке ниже, требованиям пункта 14 конкурсной документации является основанием недопуска заявки к конкурсу в соответствии с подпунктом «е» пункта 26 конкурсной документации.

на английском языке

1. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Gene therapy of hereditary diseases by CRISPR/Cas9 technology in vivo. Med Gen (Mosk). 2016; Vol. 15, N 9, p.: 3-11 (<http://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/167>) ИФ РИНЦ 0,193
2. Smirnikhina S.A., Bannikov A.V., Anuchina A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Adilgereeva E.P., Lavrov A.V. Influencing factors for CRISPR/Cas9 efficacy for F508del mutation editing in cystic fibrosis. Med Gen (Mosk). 2017; Vol. 16, N 11 p.: 32-37. (<http://www.medgen-journal.ru/jour/article/view/345>) ИФ РИНЦ 0,193
3. Smirnikhina SA, Anuchina AA, Kochergin-Nikitsky KS, Adilgereeva EP, Yakushina VD, Lavrov AV. Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9. Bulletin of RSMU. 2018, №2, с. 15-20, doi: 10.24075/vrgmu.2018.022 (<https://vestnikrgmu.ru/archive/2018/2/2/abstract?lang=en>) ИФ РИНЦ 0,304
4. Smirnikhina SA, Anuchina AA, Lavrov AV. Ways of improving precise knock-in by genome editing technologies. Human Genetics, 2018, doi: 10.1007/s00439-018-1953-5 (<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00439-018-1953-5>) IF JCR 2017 4.637 Q1
5. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. Genes & Cells, 2018, Vol XIV, №3, p. 22-31 (<http://genescells.ru/article/sovremennoepatogeneticheskoe-lechenie-i-razrabotka-novyih-metodov-gennoy-i-kletochnoy-terapii-mukovistsidoza/>) ИФ РИНЦ 0,914
7. Kondrateva E.V., Adilgereeva E.P., Amelina E.L., Tabakov V.Yu., Anuchina A.A., Ustinov K.D., Yasinovsky M.I., Voronina E.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Receiving induced pluripotent stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis. Siberian Medical Review. 2019;(2):95-101 (<https://pdfs.semanticscholar.org/960e/017996b38b51aa75de2d2011678416e0fa45.pdf>) ИФ РИНЦ 0,625
8. Smirnikhina SA, Anuchina AA, Lavrov AV. Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. Hum Genet. 2019 Jan;138(1):1-19. doi: 10.1007/s00439-018-1953-5. Web of Science, Scopus, Q1 (2019)
9. Smirnikhina S.A., Lavrov A.V. Modern pathogenesis-based methods and development of new gene and cell-based methods for cystic fibrosis treatment. Genes & Cells, 2018, Vol XIV, №3, p. 23-31, DOI: 10.23868/201811029 (in Russian). Scopus
10. Zaynitdinova M.I., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A., Eremin I.I., Pulin A.A. Gene therapy approaches to the Duchenne muscular dystrophy treatment. Genes & Cells, 2019, Vol XIV, №4, p. 6-18. doi: 10.23868/201912026 (in Russian). Scopus
11. Anuchina A.A., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. TIRR: a potential front runner in HDR race – hypotheses and perspectives. Molecular Biology Reports, 47, 2371–2379 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05285-x>. Web of Science, Scopus
12. Slesarenko Y.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Clinical trials for the treatment of hereditary diseases by genome editing. Genes & Cells, 2020, Vol XV, №2, 51-57 p. doi: 10.23868/202004023 (in Russian). Scopus
13. Smirnikhina S. A., Kondrateva E. V., Anuchina A. A., Zaynitdinova M. I., Lavrov A. V. Modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture and development of a method for the correction of F508del mutation. Medical News of North Caucasus. (In Russ.) 2020, 15(2): 158-162. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15038> (in Russian) Scopus
14. Kondrateva E, Adilgereeva E, Amelina E, Tabakov V, Demchenko A, Ustinov K, Yasinovsky M, Voronina E, Lavrov A, Smirnikhina S. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi001-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with p.F508del mutation. Stem Cell Research, 2020, 48, 101933 doi: 10.1016/j.scr.2020.101933 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506120302348>. Web of Science, Scopus, Q1 (2020)

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).

Перечень содержит 14 публикаций в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection, Scopus.

Перечень содержит 3 публикации в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>).

2.10. Основные научные результаты руководителя проекта за период с 1 января 2016 года (результаты должны подтверждаться сведениями из заявки, например - публикациями)

на русском языке

Проведен глубокий молекулярный анализ строения вируса простого герпеса человека методом массивного параллельного секвенирования (11). Выявлены потенциальные прогностические маркеры у больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) в результате полноэкзомного секвенирования (1, 2, 5). Показана несостоятельность экспрессионного профилирования с целью поиска различий и маркеров у больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом (7, 12). Разработан дизайн диагностической панели для диагностики рака щитовидной железы методами высокопроизводительно параллельного секвенирования (14 и ожидание патента). Разработаны подходы к полноэкзомному анализу при диагностике умственной отсталости и обследовано более 100 человек (15). Разработаны методы геномного редактирования с помощью нескольких геномных редакторов на основе CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций при муковисцидозе и десминопатии (3, 6, 8, 9, 10). Получены пациентспецифичные ИПСК от больных муковисцидозом (13).

на английском языке

Characterization of the HSV using next generation sequencing (11). Found potential prognostic markers in CML patients using exome sequencing (1,2,5). Expression profiling and miRNA analysis are shown to be non-informative for diagnostic and prognostic purposes both in determining outcome in newly diagnosed CML patients and in deep responders to make decision about therapy cessation (12). We developed a comprehensive panel to analyse both point mutations, CNVs and fusions in thyroid cancer (14 + patent pending). This panel is suitable for both diagnostic purposes on clinical samples and for the research purposes in wide spectrum of cancers. We developed and implemented diagnostic approaches to molecular diagnostics of hereditary intellectual disorders using high throughput methods including exome sequencing and molecular karyotyping which allowed dramatically increase the diagnostic yield in this patients (15). We developed several approaches to genome editing in hereditary diseases using different modifications of CRISPR/Cas9 technology and developed all necessary steps to organize first preclinical study in Russia of the genome editing and cell transplantation method for treating hereditary disorders (3,6,8,9,10,13).

2.11. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 81, из них:

35 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

Перечень содержит 5 публикаций в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору JCR Science Edition или JCR Social Sciences Edition, по SJR (принадлежность издания к Q1 в Scopus определяется по базе данных <http://www.scimagojr.com/>).

2.12. Дополнительный список публикаций руководителя проекта за последние 5 лет (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях руководителя проекта, за исключением публикаций, указанных в п. 2.9 настоящей формы.

на английском языке

2.13. Опыт выполнения научных проектов (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)

В том числе проектов, финансируемых РНФ (при наличии):

Являлся исполнителем проекта № 17-75-20095, 2017-2019 гг.

2.14. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году

Общее количество – 4, из них:

руководство – 1, участие в качестве исполнителя – 3,

а именно:

Три темы НИР, финансируемые из госзадания ФГБНУ "МГНЦ", и данный проект в случае его поддержки.

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

2.15. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на руководство данным проектом в случае победы в конкурсе Фонда -

25 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

2.16. Предполагаемая форма трудовых отношений с организацией, через которую будет осуществляться финансирование:

Организация будет являться основным местом работы (характер работы – не дистанционный): **да;**

Трудовой договор по совместительству (характер работы – не дистанционный): **нет;**

*Трудовой договор о дистанционной работе (место осуществления трудовой деятельности расположено** на территории Российской Федерации):* **нет.**

***Трудовой кодекс Российской Федерации не предусматривает возможность заключения трудового договора о дистанционной работе с гражданином, проживающим и осуществляющим трудовую деятельность за пределами территории Российской Федерации.*

2.17. Опыт образовательной деятельности за последние 5 лет (указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)

Доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики, Медико-биологический факультет, ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова - 2016-2019

Разработка программы по генетике для Международного факультета ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова

Руководство аспирантами: 2008-2011 С.А. Смирнихина "Анализ трансфекции VEGF121 в МСК человека с использованием невирусных методов"; 2009 – 2012 Яна Вольдгорн, "Изучение особенностей положения хромосом 6, 12, 18 и X в ядрах мезенхимных стволовых клеток в зависимости от направления дифференцировки и сроков культивирования"; 2013 - н.в. Э.П. Адильгереева "Анализ выявленных полноэкзомным секвенированием прогностических маркеров ответа на таргетную терапию при хроническом миелоидном лейкозе"; 2017 - н.в. А.А. Анучина "Совершенствование эффективности геномной репарации при геномном редактировании"; 2019 - н.в. А.В. Иванова "Разработка методов геномного редактирования мутации в дисферлине методом кзонном скиппинга"

2.18. Почтовый адрес

115191, Татищева, 5-28

2.19. Контактный телефон

+79161139047

2.20. Электронный адрес (E-mail)

avlavrov@yandex.ru

2.21. Участие в проекте:

Руководитель проекта

2.22. Файлы с дополнительной информацией (резюме, другая дополнительная информация, которая, по мнению руководителя проекта, может быть полезна для принятия решения о целесообразности финансирования данного проекта)

В формате pdf, до 3 Мб.

на русском языке

Файл, скачать

на английском языке

Файл (en), скачать

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 11 и 12 конкурсной документации) ознакомлен и согласен. С регламентом доступа к оборудованию ОИ и условиями его использования ознакомлен и согласен. Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Лавров Александр Вячеславович
Данные документа, удостоверяющего личность *** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px;"></div> <p style="color: red; font-size: small;">Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</p>
Адрес проживания	115191, Татищева, 5-28
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие**** на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

*** Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

**** Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись руководителя проекта _____/А.В. Лавров/

Дата подписания «___» _____ 2020 г.

Форма 2. Сведения об основном исполнителе проекта

2.1. Фамилия, имя, отчество (при наличии)

на русском языке

Анучина Арина Артуровна

на английском языке фамилия и инициалы

Anuchina A.A.

WoS ResearcherID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу www.ResearcherID.com.

Scopus AuthorID (при наличии)

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.

2.2. Дата рождения (указывается цифрами – число, месяц, год)

15.02.1995

2.3. Гражданство

РОССИЯ

2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах (при наличии), участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий (при наличии)

2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации (сокращенное наименование организации)

научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

2.7. Область научных интересов – ключевые слова (приводится не более 15 ключевых слов)

на русском языке

генетика человека, медицинская генетика, редактирование генома, генная терапия, CRISPR-Cas9

на английском языке

Human genetics, medical genetics, gene editing, gene therapy, CRISPR-Cas9

2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

04-104 04-201 04-208 04-209 04-210

2.9. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 17, из них:

9 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

2.10. Список публикаций основного исполнителя проекта с 1 января 2016 года (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях.

на английском языке

Для русскоязычных названий сведения приводятся на русском языке и в переводе на английский язык. При этом должно быть понятно, что речь идет об

одном и том же документе (например, добавляйте слово «перевод»).

2020 TIRR: a potential front runner in HDR race–hypotheses and perspectives

A. A. Anuchina, A. V. Lavrov & S. A. Smirnikhina

в журнале Molecular Biology Reports

2019 ePS1.01 F508del correction in iPSCs obtained from patient with cystic fibrosis by CRISPR/Cas9

S. Smirnikhina, A. Anuchina, E. Adilgereeva, E. Amelina, E. Kondrateva, K. Ustinov, M. Yasinovsky, K. Kochergin-Nikitsky, M. Zainitdinova, I. Mozgovoy, A. Lavrov

в журнале Journal of Cystic Fibrosis 18:S39

2019 Receiving induced pluripotent stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis

E. V. Kondrateva, E. P. Adilgereeva, E. L. Amelina, V. Yu. Tabakov, A. A. Anuchina, K. D. Ustinov, M. I. Yasinovsky, E. S. Voronina, A. V. Lavrov, S. A. Smirnikhina

в журнале Siberian Medical Review (2):95-101.

2018 Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies

Svetlana Smirnikhina, Arina Anuchina, Alexander V. Lavrov.

в журнале Human Genetics

2018 Development of effective method for F508del mutation correction using CRISPR/Cas9

Svetlana Smirnikhina, Arina Anuchina, Elmira P. Adilgereeva, Konstantin Kochergin-Nikitsky, Alexander V. Lavrov.

в журнале Journal of Cystic Fibrosis

2018 Experimental approaches to the target editing of the CFTR gene using CRISPR-Cas9

S. Smirnikhina, A. Anuchina, K. Kochergin-Nikitsky, E. Adilgereeva, V.D. Yakushina, A. Lavrov.

в журнале Bulletin of RSMU, №2, с. 15-21

2017 Genetics of migraine - is there any progress?

Eugene Klimov, Natalia Kondratieva, Arina Anuchina, Kirill Skorobogatykh, Julia Azimova, Alexey Sergeev, Elena Naumova, Olga Rudko, Zarema Kokaeva, Anna Soboleva, Vladimir Sobolev, Gyuzyal Tabeeva

в журнале Journal of Neurology & Stroke, издательство MedCrave Group (Edmond), том 7, № 4, с. 1-9

2016 Biomarkers of migraine: Part 1 – Genetic markers

Kondratieva N., Azimova J., Skorobogatykh K., Sergeev A., Naumova E., Kokaeva Z., Anuchina A., Rudko O., Tabeeva G., Klimov E.

в журнале Journal of the Neurological Sciences, издательство Elsevier BV (Netherlands), том 369, с. 63-76 DOI

2.11. Опыт выполнения научных проектов и участия в них (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)

РФФИ: 19-34-90130 (Аспиранты) Подходы к повышению эффективности направленной гомологичной репарации при геномном редактировании, 2019-2021

РФФИ: 19-29-04044 (мк) Создание клеточных моделей на основе культивируемых клеток больных врожденным буллезным эпидермолизом и выявления механизмов патологических процессов с применением генетической модификации как средства лечения, 2019-2021

РНФ: 17-75-20095 Разработка эффективного способа коррекции мутации F508del при муковисцидозе с помощью геномного редактирования, 2017-2020

2.12. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году

Общее количество – 3, из них:

руководство – 0, участие в качестве исполнителя – 3,

а именно:

РФФИ: 19-34-90130 (Аспиранты) Подходы к повышению эффективности направленной гомологичной репарации при

геномном редактировании, 2019-2021

РФФИ: 19-29-04044 (мк) Создание клеточных моделей на основе культивируемых клеток больных врожденным буллезным эпидермолизом и выявления механизмов патологических процессов с применением генетической модификации как средства лечения, 2019-2021

РНФ: Увеличение эффективности гомологичной репарации при геномном редактировании, 2021-2023

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

2.13. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на участие в данном проекте в случае победы в конкурсе Фонда -

30 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

2.14. Участие в образовательной деятельности *(указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)*

2.15. В 2019 или в 2020 годах участвовал в качестве руководителя проекта, финансируемого Фондом, или исполнителя проекта, финансируемого Фондом, в следующих проектах (при наличии):

Являлся исполнителем проекта № 17-75-20095, 2017-2019 гг.

2.16. Контактный телефон, электронный адрес (E-mail)

+79163960574, arinate@mail.ru

2.17. Участие в проекте:

Основной исполнитель проекта

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 12 и 13 конкурсной документации) ознакомлен и согласен.
Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Анучина Арина Артуровна
Данные документа, удостоверяющего личность*** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <p style="color: red; font-size: small;">Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</p>
Адрес проживания	Россия, 117303, ул. Каховка, 5к2
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие**** на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

*** Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

**** Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись исполнителя проекта _____/А.А. Анучина/

Дата подписания «___» _____ 2020 г.

Форма 2. Сведения об основном исполнителе проекта

2.1. Фамилия, имя, отчество (при наличии)

на русском языке

Кондратьева Екатерина Владимировна

на английском языке фамилия и инициалы

Kondrateva E.V.

WoS ResearcherID (при наличии)

Можно получить, зарегистрировавшись по адресу www.ResearcherID.com.

Scopus AuthorID (при наличии)

Scopus AuthorID формируется в базе данных Scopus автоматически при появлении у автора хотя бы одной статьи в данной базе. AuthorID указан в авторском профиле, который становится доступен, если при поиске автора в базе данных Scopus (Author Search) в результатах поиска нажать на фамилию автора.

2.2. Дата рождения (указывается цифрами – число, месяц, год)

12.06.1984

2.3. Гражданство

РОССИЯ

2.4. Ученая степень, год присуждения

В случае наличия нескольких ученых степеней, указывается та из них, которая наиболее соответствует тематике проекта.

2.5. Награды и премии за научную деятельность, членство в ведущих научных сообществах (при наличии), участие в редколлегиях ведущих рецензируемых научных изданий (при наличии)

2.6. Основное место работы на момент подачи заявки – должность, полное наименование организации (сокращенное наименование организации)

научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова" (ФГБНУ "МГНЦ", г Москва)

2.7. Область научных интересов – ключевые слова (приводится не более 15 ключевых слов)

на русском языке

геномное редактирование; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; клеточное репрограммирование; муковисцидоз; CRISPR/Cas9; редакторы оснований

на английском языке

genome editing; induced pluripotent stem cells; cell reprogramming; cystic fibrosis; CRISPR/Cas9; base editors

2.8. Область научных интересов – коды по классификатору Фонда

04-104

2.9. Общее число публикаций за период с 1 января 2016 года, 20, из них:

9 - опубликовано в изданиях, индексируемых в Web of Science Core Collection или Scopus.

2.10. Список публикаций основного исполнителя проекта с 1 января 2016 года (монографии, результаты интеллектуальной деятельности, имеющие правовую охрану, публикации в ведущих рецензируемых научных изданиях, публикации в изданиях, индексируемых в системах цитирования Web of Science Core Collection, Scopus, приводится не более 10 публикаций, при наличии публикации в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» указывается ссылка на нее (обязательно для публикаций в индексируемых изданиях), указывается, при наличии, импакт-фактор научного издания (по JCR Science Edition, JCR Social Sciences Edition или SJR))

Пункт не является обязательным к заполнению. Могут приводиться публикации, свидетельствующие о научной квалификации и достижениях.

на английском языке

1. Patent for invention № 2582569 of the Russian Federation. DNA encoding the full-length human interleukin-36 receptor antagonist, DNA encoding the full-length human IL-36 receptor antagonist with the C-terminal polyhistidine tag, the plasmid expression vector (variants), Escherichia coli strain bl21 star[de3] (pet-il36raf), - producer of full-length interleukin-36 receptor antagonist and Escherichia coli strain bl21 star[de3] (pet-raf-his), - producer of full-length interleukin-36 receptor antagonist with C-terminal polyhistidine tag. Kondrateva E.V., Nimirickiy P.P., Petrov A.V., Simbirtsev A.S.; applicant and patent holder: Federal state unitary enterprise State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Russian FMBA. - No. 2014130529.10, filed 07/24/2014; published 04/27/2016, bull. № 12.
<https://patents.google.com/patent/RU2582569C2/ru>
2. Kolobov A.A., Kalinin R.S., Skvortsov N.V., Kondrateva E.V., Stefanov V.E., Petrov A.V., Simbirtsev A.S. Optimization of the method of IL-36Ra purification from lipopolysaccharides using phase separation with Triton X-114. Cytokines and inflammation. - 2017. – Vol. 16, No. 3. - P. 11–17. RSCI
<https://www.cytokines.ru/russian/2017/3/Art2.php>
3. Kolobov A.A., Kondrateva E.V., Kudling T.V., Karasev M.M., Kalinin R.S., Protasov E.A., Nimiritskiy P.P., Stefanov V.E., Aleksandrov G.V., Petrov A.V., Simbirtsev A.S. Development of a drug for psoriasis treatment based on the recombinant human interleukin-36 receptor antagonist (il-36ra). Medical Immunology. - 2017. - Vol. 19 from Materials of the XVI All-Russian Scientific Forum with international participation named after Academician V.I. Ioffe - St. Petersburg Regional Branch of the Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists. - P. 386–386. RSCI, SIF 0.26
4. Lavrov A.V., Varenikov G.G., Kondrateva E.V., Skoblov M.Yu. Targeted single nucleotide editing allows correction of hundreds of pathogenic variants in hereditary diseases. Genes & Cells. - 2018, Appendix No. 2. - P. 41-42. (International Congress "CRISPR-2018". September 10-14, 2018, Novosibirsk. Oral presentation). RSCI
5. Method of producing non-methionine receptor antagonist interleukin-36 strain bacteria Escherichia Coli BL21 [de3] - producer non-methionine receptor antagonist interleukin-36 (variants), method of their preparation, and plasmid vector pBAD15a pET15a and DNA sequence for their preparation. Kolobov A. A., Kondrateva E. V., Nimiritskiy P. P., Kudling T. V., Sergeeva D. S., Karasev M. M., Petrov A. V.; applicant and patent holder: Federal state unitary enterprise State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Russian FMBA. - No. 2017103888, filed 06/02/2017; published 19/11/2018, bull. № 32.
<https://www1.fips.ru/publication-web/publications/document?type=doc&tab=IZPM&id=AD6BA7F1-648F-499F-971D-5092B882A79A>
6. Kondrateva E.V., Lavrov A.V., Varenikov G.G., Skoblov M.Y. Targeted single nucleotide editing allows correction of hundreds of pathogenic variants in hereditary diseases. Molecular genetics, microbiology and virology. 2019, v. 37. Special edition. doi: <https://doi.org/10.17116/molgen2019s-tez> JCR 0.36
https://www.mediasphera.ru/journals/Mol_genetika_2019_tezisy.pdf
7. S. Smirnikhina, A. Anuchina, E. Adilgereeva, E. Amelina, E. Kondrateva, K. Ustinov, M. Yasinovsky, K. Kochergin-Nikitsky, M. Zainitdinova, I. Mozgovoy, A. Lavrov. F508del correction in iPSCs obtained from patient with cystic fibrosis by CRISPR/Cas9. Journal of Cystic Fibrosis 18S1 (2019) S39–S56. doi: [https://doi.org/10.1016/S1569-1993\(19\)30240-1](https://doi.org/10.1016/S1569-1993(19)30240-1). SIF 4.290
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199319302401?via%3Dihub>
8. Kondrateva E.V., Adilgereeva E.P., Amelina E.L., Tabakov V.Yu., Anuchina A.A., Ustinov K.D., Yasinovsky M.I., Voronina E.S., Lavrov A.V., Smirnikhina S.A. Receiving induced pluripotential stem cells from fibroblasts of patients with cystic fibrosis. Siberian Medical Review. 2019;(2):95-101. doi: <https://doi.org/10.20333/2500136-2019-2-95-101>
https://smr.krasgmu.ru/journal/1904_11_kondrateva.pdf
9. Kondrateva E. V., Anuchina A. A., Adilgereeva E. P., Amelina E. L., Ustinov K. D., Yasinovsky M. I., Kochergin-Nikitsky K. S., Zainitdinova M. I., Mozgovoy I. V., Lavrov A. V., Smirnikhina S. A. E-P16.02 - F508del editing in patient-derived iPSCs by CRISPR/Cas9. ESHG 2019. European Journal of Human Genetics (2019) 27: 1907-1908, doi: 10.1038/s41431-019-0493-3. JCR 3.650

10. Smirnikhina S. A., Kondrateva E. V., Anuchina A. A., Adilgereeva E. P., Amelina E. L., Ustinov K. D., Yasinovsky M. I., Kochergin-Nikitsky K. S., Zainitdinova I., Mozgovoy V., Lavrov A. V. P16.31C - F508del correction in CFTE29o- cell line by CRISPR/Cas9. ESHG 2019. European Journal of Human Genetics (2019) 27: 1700, doi: 10.1038/s41431-019-0494-2. JCR 3.650 <https://www.nature.com/articles/s41431-019-0494-2>

11. Kondrateva E. V., Lavrov A. V., Varenikov G.G., Smirnikhina S. A. Thesis of VII Congress of Vavilov Society of Genetics and Breeders on the 100th anniversary of the Department of Genetics of Saint Petersburg State University, and associate Symposia (Saint Petersburg, June 18-22, 2019), P. 293. <https://events.spbu.ru/eventsContent/events/2018/vogis/VII%20VSGB%20Congress%20Abstracts%202019.pdf>

12. Smirnikhina S., Anuchina A., Adilgereeva E., Amelina E., Kondrateva E., Ustinov K., Yasinovsky M., Kochergin-Nikitsky K., Zainitdinova M., Slesarenko Y., Mozgovoy I., Lavrov A. F508del editing in CFTE29o- cell line and iPSCs from patient with cystic fibrosis by CRISPR/Cas9. FEBS Open Bio 9(Suppl. 1) (2019) 65–431; pp. 397-398. doi: 10.1002/2211-5463.12675. JCR 1.959 <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/2211-5463.12675>

13. Smirnikhina S. A., Kondrateva E. V., Anuchina A. A., Zainitdinova M. I., Lavrov A. V. Modeling of cystic fibrosis in HEK293T cell culture and development of a method for correcting the F508del mutation. Medical News of North Caucasus. 2020;15(2): 158-162. doi: 10.14300/mnnc.2020.15038.

14. Ekaterina Kondrateva, Elmira Adilgereeva, Elena Amelina, Vyacheslav Tabakov, Anna Demchenko, Kirill Ustinov, Matvey Yasinovsky, Ekaterina Voronina, Alexander Lavrov, Svetlana Smirnikhina. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi001-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with p.F508del mutation. Stem Cell Res. 2020 Aug 2;48:101933. doi: 10.1016/j.jscr.2020.101933. Impact Factor: 4.489.

15. Ekaterina Kondrateva, Anna Demchenko, Alexander Lavrov, Svetlana Smirnikhina. An overview of currently available molecular Cas-tools for precise genome modification. Gene. 2020. In-press, Available online 12 October 2020. doi: 10.1016/j.gene.2020.145225. Impact factor 2.984.

2.11. Опыт выполнения научных проектов и участия в них (указываются наименования фондов (организаций), их местонахождение (страна), форма участия, номера, названия проектов и сроки выполнения за последние 5 лет)

2.12. Планируемое участие в научных проектах (в любом качестве) в 2021 году

Общее количество – 4, из них:

руководство – 0, участие в качестве исполнителя – 4,

а именно:

Три темы НИР, финансируемые из государственного задания ФГБНУ "МГНЦ", и данный проект в случае его поддержки.

(указываются в том числе грантодатели или заказчики проектов и источник финансирования, например – государственное задание учредителя, гранты РФФИ, ФПИ, РНФ, иных фондов или иных организаций, государственный контракт (заказчик, программа), иной хозяйственный договор, иные гранты и субсидии).

2.13. Доля рабочего времени, которую планируется выделить на участие в данном проекте в случае победы в конкурсе Фонда -

30 процентов.

Имеется в виду – от полной занятости в рамках трудовых или гражданско-правовых правоотношений, т.е. занятость в свободное от основной работы время также должна учитываться.

2.14. Участие в образовательной деятельности (указывается информация о руководстве аспирантами, адъюнктами, интернами, ординаторами, разработке и чтении новых образовательных курсов в российских и зарубежных вузах)

2.15. В 2019 или в 2020 годах участвовал в качестве руководителя проекта, финансируемого Фондом, или исполнителя проекта, финансируемого Фондом, в следующих проектах (при наличии):

Являлся исполнителем проекта № 17-75-20095, 2017-2019 гг.

2.16. Контактный телефон, электронный адрес (E-mail)

+79216539595, ekaterina.kondratyeva@gmail.com

2.17. Участие в проекте:

Основной исполнитель проекта

С условиями конкурса Фонда (в том числе, с пунктами 12 и 13 конкурсной документации) ознакомлен и согласен. Подтверждаю свое участие в проекте.

Фамилия, имя и отчество	Кондратьева Екатерина Владимировна
Данные документа, удостоверяющего личность*** (серия, номер, сведения о дате и органе выдачи)	<div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border-bottom: 1px solid black; height: 15px;"></div> <p style="color: red; font-size: small;">Внимание! Данное поле заполняется вручную в печатном экземпляре заявки. Заполнение обязательно!</p>
Адрес проживания	115035 Москва, Овчинниковская набережная, д. 18/1, к.5
Оператор персональных данных	Российский научный фонд

Я выражаю согласие**** на обработку указанным выше оператором персональных данных, внесенных в настоящую форму мною лично.

Обработка Российским научным фондом (адрес: г. Москва, ул. Солянка, д. 14, строение 3) указанных выше персональных данных может осуществляться **посредством** их сбора, систематизации, накопления, хранения, уточнения, использования, блокирования, распространения на официальном сайте Российского научного фонда, передачи и уничтожения **с целью** проведения экспертизы заявок на конкурсы, проводимые Российским научным фондом, экспертизы проектов и программ, финансируемых Российским научным фондом, подготовки аналитических материалов по конкурсам, долговременного сохранения документированной информации об участниках программ, получивших финансирование Российского научного фонда, общедоступного раскрытия информации о руководителях программ и проектов, финансируемых Российским научным фондом. Указанная обработка моих данных может осуществляться в течение 75 лет со дня заполнения настоящей формы в печатной форме. Хранение настоящей формы может быть поручено ООО «РАЙСВОЛФ» (107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22), оказывающему Российскому научному фонду услуги архивного хранения документов. Настоящее согласие может быть отозвано посредством направления на указанный выше адрес оператора персональных данных заявления с требованием о прекращении обработки персональных данных. Заявление должно содержать номер документа, удостоверяющего личность субъекта персональных данных; сведения о дате выдачи указанного документа и выдавшем его органе, а также собственноручную подпись субъекта персональных данных.

*** Непредставление данных документа, удостоверяющего личность, является основанием недопуска заявки к конкурсу.

**** Заполнение является обязательным в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 июля 2006 г. №152-ФЗ «О персональных данных».

Подпись исполнителя проекта _____/Е.В. Кондратьева/

Дата подписания «___» _____ 2020 г.

Форма 3. Сведения об организации

собираются автоматически на основе регистрационных данных организации, через которую будет осуществляться финансирование ("Форма Т")

3.1. Полное наименование *(приводится в соответствии с регистрационными документами)*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова"

3.2. Сокращенное наименование

ФГБНУ "МГНЦ"

3.3. Наименование на английском языке

Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics"

3.4. Организационно-правовая форма *(указывается по ОКОПФ)*

Федеральные государственные бюджетные учреждения

3.5. Форма собственности *(указывается по ОКФС)*

Федеральная собственность

3.6. Ведомственная принадлежность

Министерство науки и высшего образования РФ

3.7. ИНН, КПП, ОГРН, ОКТМО

7724181700, 772401001, 1027739609480, 45917000

3.8. Адрес

115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

3.9. Фактический адрес

115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

3.10. Субъект Российской Федерации

г Москва

3.11. Должность, фамилия, имя, отчество *(при наличии)* руководителя организации

Директор, Куцев Сергей Иванович

3.12. Контактный телефон

4996128607

3.13. Электронный адрес *(E-mail)*

mgnc@med-gen.ru

Руководитель организации подтверждает, что:

- ознакомлен с условиями конкурса Фонда и согласен на финансирование проекта, в случае его поддержки, через организацию;
- согласен с пунктами 13, 19, 40, 42, 43 конкурсной документации, иными условиями конкурса;
- подтверждает сведения о руководителе проекта, изложенные в данной заявке;
- организация исполняет обязательства по уплате налогов в бюджеты всех уровней и обязательных платежей в государственные внебюджетные фонды, платежеспособна, не находится в процессе ликвидации, не признана несостоятельной (банкротом), на ее имущество не наложен арест и ее экономическая деятельность не приостановлена;
- в случае признания заявки победителем организация берет на себя следующие обязательства:
 - заключить с членами научного коллектива гражданско-правовые или трудовые (срочные трудовые) договоры;
Если таковые не заключены ранее. В случае, если член научного коллектива не является гражданином Российской Федерации, организацией должны быть выполнены все процедуры, предусмотренные законодательством Российской Федерации при трудоустройстве иностранных граждан.
 - по поручению руководителя проекта выплачивать членам научного коллектива вознаграждение за

- выполнение работ по проекту;
- ежегодно в установленные сроки представлять отчет о целевом использовании гранта Российского научного фонда.

Руководитель организации гарантирует, что:

- вознаграждение за выполнение работ по реализации проекта будет ежегодно получать каждый член научного коллектива;
Лица, не являющиеся налоговыми резидентами Российской Федерации, могут осуществлять работы по Проекту на безвозмездной основе (за исключением руководителя проекта).
- общий размер ежегодного вознаграждения члена научного коллектива не будет превышать 30 процентов от суммы ежегодного вознаграждения всем членам научного коллектива;
Включая установленные законодательством Российской Федерации гарантии, отчисления по страховым взносам на обязательное пенсионное страхование, на обязательное медицинское страхование, на обязательное социальное страхование на случай временной нетрудоспособности и в связи с материнством, на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний.
- общий размер ежегодного вознаграждения членов научного коллектива в возрасте до 39 лет включительно не будет меньше 35 процентов от суммы ежегодного вознаграждения всех членов научного коллектива;
- общее число членов научного коллектива (вместе с руководителем проекта) не будет превышать 10 человек, при этом членом научного коллектива не будет являться работник организации, в непосредственном административном подчинении которого находится руководитель проекта;
- научному коллективу будет предоставлено помещение и обеспечен доступ к имеющейся экспериментальной базе для осуществления научного исследования.

Подпись руководителя организации (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

_____/_____
М.П.

Форма 4. Содержание проекта

4.1. Научная проблема, на решение которой направлен проект

на русском языке

Нобелевская премия, присужденная в этом году Дженнифер Дудне и Эммануэль Шарпентье за создание методов геномного редактирования является, безусловно, одной из самых быстро выданных премий от момента сделанного открытия. Геномное редактирование стремительно перевернуло молекулярную биологию, генную инженерию и медицину. Нобелевские лауреаты предложили способ точного программируемого разрыва ДНК с использованием программируемых нуклеаз. Однако одним из серьёзных препятствий для распространения нового метода в клинической практике стала низкая эффективность гомологичной репарации (ГР) – клеточного механизма восстановления разрывов ДНК. Именно ГР позволяет восстановить в области разрыва нормальную последовательность ДНК в случае мутаций, вызывающих наследственные заболевания. В большинстве случаев разрывы восстанавливаются методом негомологичного соединения концов, что не может быть использовано для коррекции большинства патогенных изменений ДНК. В настоящее время остается нерешенной проблема получения клинически значимого количества клеток с корректно восстановленной областью разрыва.

на английском языке

Nobel prize won in 2020 by J. Dudna and E. Charpentier for the development of the new genome editing tool is one of the most quickly granted Nobel prizes from the date of the discovery/development. Indeed genome editing boosted molecular biology, gene engineering and medicine. Nobel prize winners developed a method to precisely program DNA break with programmable nucleases. However one of the most difficult obstacles to implement this discovery in clinical practice is the low level of homologous repair (HR) – one of the cellular mechanisms of DNA repair. Specifically this mechanism is capable of correcting the vast majority of the disease causing mutations. But the prevailing mechanism of DNA repair is non-homologous end joining (NHEJ) which induces indels at the breaking point and cannot be used for allele correction in hereditary disorders. Till now-a-days there is an unsolved problem of precise correction of clinically reasonable numbers of cells during genome editing in vivo.

4.2. Научная значимость и актуальность решения обозначенной проблемы

на русском языке

Технологии геномного редактирования, включая использование CRISPR/Cas9 можно использовать для коррекции («редактирования») мутаций и разрабатывать этиотропную терапию неизлечимых до сих пор болезней [Смирнихина С.А., 2016; Hockemeyer D, 2016; Maeder ML, 2016; Prakash V, 2016]. Однако опубликованные ранее работы [Firth AL, 2015; Lee CM, 2012; Suzuki S, 2016; Hollywood JA, 2016; Crane AM, 2015; Bednarski C, 2016; Camarasa MV, 2016; Schwank G, 2013] демонстрируют крайне низкую эффективность успешного редактирования (<<1% клеток), что является общей проблемой технологии геномного редактирования. В большинстве случаев применения CRISPR/Cas9 для коррекции мутаций требуется провести репарацию ДНК после разрыва программируемыми нуклеазами с одновременным восстановлением нормальной копии аллеля, что достигается за счет включения клеточных механизмов гомологичной репарации (ГР). Однако, в клетке на протяжении её цикла доминирует механизм негомологичного соединения концов (НГСК), который приводит к образованию вставок и делеций (инделов) в месте разрыва ДНК. Поэтому важно сдвинуть баланс от НГСК/ГР в пользу второго механизма. Это позволит не только надеяться на разработку новых методов геномного редактирования in vivo с целью этиотропного лечения наследственных заболеваний, но и может существенно повысить эффективность других генноинженерных работ с использованием ГР.

на английском языке

Genome editing technologies including CRISPR/Cas9 can be used for the corrections of variable mutations and development of new etiotropic approaches to successfully treat previously incurable diseases [Smirnikhina S.A., 2016; Hockemeyer D, 2016; Maeder ML, 2016; Prakash V, 2016]. However previously published data [Firth AL, 2015; Lee CM, 2012; Suzuki S, 2016; Hollywood JA, 2016; Crane AM, 2015; Bednarski C, 2016; Camarasa MV, 2016; Schwank G, 2013] demonstrate extremely low precise editing efficacy (<<1%) which is the major technological problem of modern genome editing era. In most of the cases of hereditary diseases it's necessary to restore a normal copy of the gene after targeted DNA break at the mutation locus by homologous repair. But during the cell cycle mainly NHEJ repairs the DNA brakes, inducing indel in the brake locus and it's important to shift the balance between NHEJ/HR to HR. This will hopefully not only help to develop new in vivo therapies but also will improve many genetic engineering methods based on HR.

4.3. Конкретная задача (задачи) в рамках проблемы, на решение которой направлен проект, ее масштаб и комплексность

на русском языке

Цель работы: повысить эффективность гомологичной репарации для прецизионного геномного редактирования методом CRISPR/Cas9.

Задачи:

1. Изучить эффекты и возможности синхронизаторов клеточного цикла для повышения уровня ГР
2. Изучить эффекты и возможности рибонуклеопротеиновых комплексов для повышения уровня ГР
3. Изучить эффекты и возможности ингибитора лигазы 4 для повышения уровня ГР
4. Изучить эффекты и возможности применения геминина, блокирующего активность CRISPR/Cas9 в фазы клеточного цикла, когда ГР невозможна или маловероятна
5. Изучить эффекты и возможности комбинаций вышеперечисленных воздействий совместно с изменением экспрессии генов-регуляторов репарации разрывов ДНК для повышения уровня ГР
6. Изучить эффекты и возможности праймированного редактирования (prime editing) для повышения уровня ГР
7. Изучить на модели органоидов эффективность методов повышения уровня ГР

До настоящего момента никто не ставил задачи выбрать и скомбинировать наиболее эффективные средства влияния на эффективность ГР. Важно отметить, что при решении поставленных задач планируется использовать клинически применяемые и изученные фармакологические средства для синхронизации клеточного цикла и для ингибирования НГСК, что потенциально открывает перспективу их клинического применения при разработке методов геномного редактирования для лечения наследственных заболеваний. Второй важной отличительной особенностью проекта является оценка эффектов разных воздействий и их комбинаций на модели клеточных органоидов, что позволит максимально приблизиться в оценках к моделям *in vivo* относительно простых клеточных моделей.

на английском языке

Aim of the work: to increase the efficiency of homologous repair for precision genomic editing by CRISPR/Cas9.

Tasks:

1. To study the effects and possibilities of cell cycle synchronizers to increase the level of HR
2. To study the effects and possibilities of ribonucleoprotein complexes for increasing the level of HR
3. To study the effects and possibilities of Ligase IV inhibitor for increasing the level of HR
4. To study the effects and possibilities of using fusion of geminin, which blocks the CRISPR/Cas9 activity during the phases of the cell cycle, when HR is impossible or unlikely.
5. To study the effects and possibilities of combinations of the above effects together with changes in the expression of genes regulating DNA breaks repair to increase the level of HR
6. Explore the effects and possibilities of prime editing to increase the level of HR
7. To study the effectiveness of methods for increasing the level of HR using an organoid model

Until now, no one has set the task of choosing and combining the most effective means of influencing the effectiveness of HR. It is important to note that when solving the set tasks, it is planned to use clinically used and studied pharmacological agents for synchronizing the cell cycle and for inhibiting NHEJ, which potentially opens up the prospect of their clinical application in the development of genomic editing methods for the treatment of hereditary diseases. The second important distinctive feature of the project is the assessment of the effects of different influences and their combinations on the model of cellular organoids, which will make it as close as possible in the assessments to *in vivo* models of relatively simple cellular models.

4.4. Научная новизна исследований, обоснование достижимости решения поставленной задачи (задач) и возможности получения предполагаемых результатов

на русском языке

В работе будут впервые изучены по отдельности и в комбинациях факторы, влияющие на эффективность гомологичной репарации (ГР) на фоне гипо- и гиперэкспрессии факторов контроля путей репарации – TIRR, MAD2L2: синхронизатор клеточного цикла винбластин, ингибитор лигазы IV, геминин и новый метод праймированного редактирования (ПР). В лаборатории уже выполнены часть работ по изучению влияния TIRR и MAD2L2, результаты которых лягут в основу предлагаемого проекта. Методики, необходимые для проведения экспериментов, связанные с получением генноинженерных конструкций, оценки эффективности CRISPR/Cas9, культивирования клеток, получения и

функциональной характеристики органоидов проработаны детально и используются научным коллективом в течение нескольких лет.

Для оценки эффектов необходимо применение NGS, как и для оценки безопасности метода. Для этих задач возможности ЦКП «Геноаналитика» (полногеномное и таргетное секвенирование, транскриптомное исследование) и их большой опыт работы на разных платформах NGS будут несомненно полезны и найдут свое приложение в текущем проекте.

Поставленные задачи представляются достижимыми, запланированные результаты будут получены к концу выполнения проекта.

на английском языке

For the first time, the work will study separately and in combinations the factors affecting the efficiency of homologous repair (HR) against the background of hypo- and overexpression of the factors controlling the repair pathways - TIRR, MAD2L2: cell cycle synchronizer - vinblastine, inhibitor of ligase IV, geminin and prime editing.

The laboratory has already completed part of the work on studying the impact of TIRR and MAD2L2, the results of which will form the basis of the proposed project. The techniques necessary for conducting experiments related to the production of genetically engineered constructs, the assessment of the CRISPR/Cas9 efficiency, cell cultivation, the production and functional characteristics of organoids have been worked out in detail and have been used by the research team for several years.

To evaluate the effects, the use of NGS is necessary, as well as to assess the safety of the method. For these tasks, the capabilities of the "Genoanalityca" Center for Collective Use (genome-wide and targeted sequencing, transcriptomic research) and their extensive experience of working on various NGS platforms will undoubtedly be useful and will find their application in the current project.

The tasks set seem to be achievable, the planned results will be obtained by the end of the project.

4.5. Современное состояние исследований по данной проблеме, основные направления исследований в мировой науке и научные конкуренты

на русском языке

На сегодняшний день насчитывается более десяти тысяч работ, посвященных применению системы CRISPR-Cas9 в различных областях, включая активацию и репрессию генов, подавление транскрипции, внесение множественных мутаций и многое другое[1]. Тем не менее, первоначальная область применения технологии - внесение и коррекция мутаций в ДНК - по-прежнему является несовершенным подходом, который требует доработки и корректировки. В природе функцией Cas-белков является внесение разрывов в молекулу вирусной РНК[2]. В лабораторных условиях система была оптимизирована под внесение подобных двунитевых разрывов в молекулу ДНК[3]. Для коррекции мутации в клетку помимо Cas9 и гидовой РНК добавляется донорная молекула, которая служит шаблоном, по которому клетка восстанавливает последовательность в месте разрыва. В естественных условиях таким шаблоном служит гомологичная хромосома, и при условии ее доступности (в S и частично в G2 фазах клеточного цикла) клетка запускает механизм репарации разрыва, называемый направленной гомологичной репарацией (НГР)[4]. Тем не менее, преобладающим механизмом в клетке является путь репарации с ошибками (негомологичное соединение концов, НГСК), который активен в G1 и поздней G2 фазе и существенно подавляет путь НГР[5].

Именно на повышение эффективности НГР нацелено большинство работ, связанных с коррекцией мутаций в ДНК. В числе разрабатываемых методов модификация непосредственно системы, например, использование разных типов Cas-белков или различных вариантов матрицы (кольцевая или линейная, одно- и двуцепочечная)[6]. Недостатком таких подходов является невозможность унифицировать подход: при работе с различными мутациями Cas-белок подбирается в соответствии с РАМ-последовательностью в районе разрыва, и нуклеотидный состав данного локуса может ограничивать набор подходящих белков. Работы, описывающие сравнение разных вариантов донорных молекул демонстрируют противоречивые результаты и также не позволяют выявить наиболее подходящий тип матрицы[7] – [9]. Среди современных подходов к эффективному редактированию выделяют синхронизацию работы Cas9 с клеточным циклом. Методы синхронизации можно разделить на два типа. Первый – использование веществ, останавливающих клетки в определенной фазе клеточного цикла: G2/M-фазе (нокодазол, винбластин, АБТ-751, хлорид лития) или S-фазе (афидиколин, дидеоксицитидин)[10] – [15]. Второй метод был описан позднее и заключается в соединении транскрипта Cas9 с транскриптом гена геминина, который уничтожается убиквитин-лигазами в G1 фазе клеточного цикла. Таким образом система активна только в фазах цикла, где присутствует НГР[16], [17].

Еще одним подходом к решению проблемы низкой эффективности целевого редактирования является использование ингибиторов НГСК и/или активаторов НГР. И в первом, и во втором случае эффект достигается использованием малых

молекул с неизвестным механизмом действия либо направленного воздействия на известные факторы репарации (siRNA, shRNA, эктопическая экспрессия, химерный Cas9-транскрипт). Известными мишенями для ингибирования являются такие факторы НГСК, как 53BP1 и Ligase IV, причем одним из самых известных ингибиторов лигазы с доказанным действием является малая молекула SCR7[18]–[22]. Мишенями активации НГР являются такие гены, как CtIP, RAD51, BRCA1; воздействие на них достигается использованием малых молекул (RS-1, стимулятор RAD51), добавлением мРНК белка(BRCA1) или созданием химерного транскрипта с Cas9 (CtIP, RAD51)[23]–[27].

Следует отметить, что в случае активации факторов репарации использование эктопической экспрессии имеет определенные преимущества по сравнению с использованием малых молекул: искомым ген при необходимости подвергается мутагенезу, кроме того, он может быть добавлен в клетку в различных формах: ДНК, РНК или белок. В последние несколько лет данные о механизмах репарации и, в частности, о точке переключения путей, обновились и пополнились новыми факторами, что позволяет использовать воздействие не на промежуточный или конечный этап репарации, а на точку инициации, чтобы не допустить возможности переключения механизма НГР на путь НГСК. В 2018 году было показано, что одним из ключевых участников нехомологичного соединения концов является Shieldin-комплекс. Он состоит из белков MAD2L2, SHLD3 (CTC-534A2.2/RINN1), SHLD2 (FAM35A/RINN2) и SHLD1 (C20ORF196/RINN3)[28]. Белок SHLD3 обеспечивает взаимодействие комплекса с RIF1, который образует комплекс с главным участником пути НГСК 53BP1[29]. Показано, что важнейшим участником комплекса является белок MAD2L2/REV7, супрессия которого приводит к активации пути НГР при условии нормальной экспрессии 53BP1 и RIF1[30], [31]. С другой стороны, в отсутствие разрыва с 53BP1 взаимодействует белок TIRR, который предохраняет его от связывания с неповрежденными локусами ДНК[32]. Показано, что как гиперэкспрессия, так и сниженная экспрессия TIRR негативно влияет на нехомологичное соединение концов[32]–[35]. Подобное двунаправленное действие представляет большой интерес для его использования в экспериментах по геномному редактированию, а прямое взаимодействие с 53BP1 позволяет рассматривать использование TIRR как потенциального переключателя репарации [36]. Переключение механизмов НГСК на НГР также опосредовано белком SCAI – супрессором инвазии опухолевых клеток. Было показано, что он участвует в дестабилизации комплекса НГСК с помощью присоединения к 53BP1 и вытеснения фактора RIF1, обеспечивающего взаимодействие с Shieldin-комплексом[37].

Еще одним из методов повышения ГР является использование новой модификации метода CRISPR/Cas9 - праймированного редактирования (ПР). Этот метод основан на использовании обратной транскриптазы (ОТ), присоединенной к нуклеазе SpCas9 и особой направляющей РНК, которая состоит из трех частей: распознающей таргетный локус РНК, праймера для обратной транскрипции и правильной последовательности, которую необходимо встроить. Результаты показывают, что соотношение НГСК/ГР при классическом варианте CRISPR/Cas9 с ssODN в качестве матрицы для HDR в 270 раз выше, чем при использовании последней разработанной системы ПРЗ [38-39]. Количество подходов к повышению эффективности целевого редактирования на сегодняшний день велико. Тем не менее, многие имеют существенные недостатки, а в одной работе, как правило, описано применение одного или двух выбранных методов вместо синтеза уже имеющихся. Таким образом, несмотря на то, что описанные новые факторы репарации можно рассматривать в качестве кандидатов для повышения эффективности НГР, оптимальным представляется именно комбинация новых подходов с разработанными, такими как синхронизация с клеточным циклом, использование малых молекул или воздействие на нижестоящие факторы репарации.

- [1] F. Memi, A. Ntokou, and I. Papangelis, "CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations," *Seminars in Perinatology*, vol. 42, no. 8. W.B. Saunders, pp. 487–500, Dec. 01, 2018, doi: 10.1053/j.semperi.2018.09.003.
- [2] A. Szczepankowska, *Role of CRISPR/Cas System in the Development of Bacteriophage Resistance*, vol. 82. 2012.
- [3] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science* (80-.), vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012, doi: 10.1126/science.1225829.
- [4] J. San Filippo, P. Sung, and H. Klein, "Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 229–257, 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- [5] J. Li and X. Xu, "DNA double-strand break repair: A tale of pathway choices," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 48, no. 7, pp. 641–646, 2016, doi: 10.1093/abbs/gmw045.
- [6] S. A. Smirnikhina, A. A. Anuchina, and A. V. Lavrov, "Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies," *Hum. Genet.*, vol. 138, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00439-018-1953-5.
- [7] M. Bibikova et al., "Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 289–297, Jan. 2001, doi: 10.1128/mcb.21.1.289-297.2001.
- [8] S. Cristea et al., "In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration," *Biotechnol.*

Bioeng., vol. 110, no. 3, pp. 871–880, Mar. 2013, doi: 10.1002/bit.24733.

[9] T. O. Auer, K. Durore, A. De Cian, J. P. Concordet, and F. Del Bene, “Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair,” *Genome Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 142–153, Jan. 2014, doi: 10.1101/gr.161638.113.

[10] E. E. Brachman and E. B. Kmiec, “Gene repair in mammalian cells is stimulated by the elongation of S phase and transient stalling of replication forks,” *DNA Repair (Amst.)*, vol. 4, no. 4, pp. 445–457, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.dnarep.2004.11.007.

[11] T. K. Ha, Y. G. Kim, and G. M. Lee, “Effect of lithium chloride on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 22, pp. 9239–9248, Aug. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6012-0.

[12] D. Yang, M. A. Scavuzzo, J. Chmielowiec, R. Sharp, A. Bajic, and M. Borowiak, “Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–15, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep21264.

[13] B. Fernandez-Garcia et al., “Proteomic analysis of annexin A2 phosphorylation induced by microtubule interfering agents and kinesin spindle protein inhibitors,” *J. Proteome Res.*, vol. 9, no. 9, pp. 4649–4660, Sep. 2010, doi: 10.1021/pr100377v.

[14] S. Lin, B. T. Staahl, R. K. Alla, and J. A. Doudna, “Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery,” *Elife*, vol. 3, p. e04766, 2014, doi: 10.7554/eLife.04766.

[15] Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li, and D. D. Miller, “An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site,” *Pharmaceutical Research*, vol. 29, no. 11. Springer, pp. 2943–2971, Nov. 20, 2012, doi: 10.1007/s11095-012-0828-z.

[16] T. Gutschner, M. Haemmerle, G. Genovese, G. F. Draetta, and L. Chin, “Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair,” *Cell Rep.*, vol. 14, no. 6, pp. 1555–1566, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.019.

[17] S. E. Howden et al., “A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells,” *Stem Cell Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 508–517, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.001.

[18] M. Srivastava et al., “An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression,” *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1474–1487, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.054.

[19] T. Maruyama, S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, J. R. Ingram, and H. L. Ploegh, “Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, pp. 538–542, May 2015, doi: 10.1038/nbt.3190.

[20] M. Gerlach et al., “Efficient Knock-in of a Point Mutation in Porcine Fibroblasts Using the CRISPR/Cas9-GMNN Fusion Gene,” *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 6, p. 296, Jun. 2018, doi: 10.3390/genes9060296.

[21] Z. Hu et al., “Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR–Cas9 and ssODN in human cancer cells,” *Cell Biosci.*, vol. 8, no. 1, p. 12, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13578-018-0200-z.

[22] M. D. Canny et al., “Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR–Cas9 genome-editing efficiency,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 1, pp. 95–102, Nov. 2017, doi: 10.1038/nbt.4021.

[23] K. Jayatilaka et al., “A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 41, pp. 15848–15853, Oct. 2008, doi: 10.1073/pnas.0808046105.

[24] S. Yu, Z. Song, J. Luo, Y. Dai, and N. Li, “Over-expression of RAD51 or RAD54 but not RAD51/4 enhances extra-chromosomal homologous recombination in the human sarcoma (HT-1080) cell line,” *J. Biotechnol.*, vol. 154, no. 1, pp. 21–24, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.023.

[25] H. A. Rees, W. H. Yeh, and D. R. Liu, “Development of hRad51–Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09983-4.

[26] M. Charpentier et al., “CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03475-7.

[27] J. Pinder, J. Salsman, and G. Dellaire, “Nuclear domain ‘knock-in’ screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 19, pp. 9379–92, Oct. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv993.

[28] S. M. Noordermeer et al., “The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair,” *Nature*, vol. 560, no. 7716. Nature Publishing Group, pp. 117–121, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0340-7.

[29] C. S. Clairmont et al., “TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41556-019-0442-y.

[30] H. Ghezraoui et al., “53BP1 cooperation with the REV7–shieldin complex underpins DNA structure-specific NHEJ,” *Nature*, vol. 560, no. 7716, pp. 122–127, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0362-1.

[31] G. Xu et al., “REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition,” *Nature*, vol. 521, no. 7553, pp. 541–544, May 2015, doi: 10.1038/nature14328.

[32] V. Boersma et al., “MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection,” *Nature*, vol.

521, no. 7553, pp. 537–540, 2015, doi: 10.1038/nature14216.

[33] A. Zhang, B. Peng, P. Huang, J. Chen, and Z. Gong, “The p53-binding protein 1-Tudor-interacting repair regulator complex participates in the DNA damage response,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 16, pp. 6461–6467, Apr. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.777474.

[34] M. V. Botuyan et al., “Mechanism of 53BP1 activity regulation by RNA-binding TIRR and a designer protein,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41594-018-0083-z.

[35] P. Drané et al., “TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function,” *Nature*, vol. 543, no. 7644, pp. 211–216, 2017, doi: 10.1038/nature21358.

[36] Y. Dai, A. Zhang, S. Shan, Z. Gong, and Z. Zhou, “Structural basis for recognition of 53BP1 tandem Tudor domain by TIRR,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 2123, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04557-2.

[37] A. A. Anuchina, A. V. Lavrov, and S. A. Smirnikhina, “TIRR: a potential front runner in HDR race—hypotheses and perspectives,” *Molecular Biology Reports*, vol. 47, no. 3. Springer, pp. 2371–2379, Mar. 01, 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05285-x.

[38] S.-Y. Isobe, K. Nagao, N. Nozaki, H. Kimura, and C. Obuse, “Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair,” *Cell Rep.*, vol. 20, no. 2, pp. 297–307, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.056.

[39] A. V. Anzalone et al., “Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA,” *Nature*, vol. 576, no. 7785, pp. 149–157, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.

на английском языке

To date, there are more than ten thousand papers devoted to the application of the CRISPR-Cas9 system in various areas, including gene activation and repression, transcription suppression, introduction of multiple mutations, and much more [1]. However, the original field of application of the technology - introducing and correcting mutations in DNA - is still an imperfect approach that requires refinement and adjustment.

In nature, Cas proteins function is to introduce breaks into the viral RNA molecule [2]. In the laboratory the system was optimized for introducing double-strand breaks into the DNA molecule [3]. To correct the mutation, together with Cas9 and the guide RNA, a donor molecule is added to the cell, this molecule serves as a template for restoring the sequence at the break point. Under natural conditions a homologous chromosome serves as a template, and the cell activates a break repair mechanism called homology directed repair (HDR), available in the S and partially in the G2 phases of the cell cycle [4]. However, the predominant mechanism in the cell is the error-prone repair pathway (non-homologous end-joining, NHEJ), which is active in G1 and late G2 phases and significantly suppresses the HDR pathway [5].

The majority of papers related to the correction of DNA mutations are focused on increasing the efficiency of HDR. Among the methods being developed the modification of the main system, for example, the use of different types of Cas-proteins or different variants of the matrix (circular or linear, single- and double-stranded) are spread [6]. The disadvantage of such approaches is the impossibility to unify the approach, when working with various mutations - the Cas protein is selected according to the PAM sequence near the break region, and the nucleotide sequence in this locus limits the set of suitable proteins. Papers, which describe the comparison of different variants of donor molecules, show controversial results and do not allow to identify the most appropriate type of matrix[7]–[9].

Among modern approaches to effective editing, the synchronization of Cas9 with the cell cycle is distinguished. Synchronization methods can be divided into two types. The first is the use of substances that arrest cells at a certain phase of the cell cycle: G2/M-phase (nocodazole, vinblastine, ABT-751, lithium chloride) or S-phase (aphidicolin, dideoxycytidine) [10]–[15]. The second method was described later and relates to fusion of the Cas9 with the geminin gene, which is destroyed by ubiquitin ligases in the G1 phase of the cell cycle. Thus, the system is active only in the phases of the cycle with HDR activity [16], [17].

Another approach to solve the problem of the targeted editing low efficiency is the use of NHEJ inhibitors and/or HDR activators. In both cases, the effect is achieved by using small molecules with an unknown mechanism of action or targeting known repair factors (siRNA, shRNA, ectopic expression, Cas9 fusion). Known targets for inhibition are NHEJ factors such as 53BP1 and Ligase IV, and the small molecule SCR7 is one of the best known and ligase inhibitors with proven efficacy[18]–[22]. HDR activation targets are genes such as CtIP, RAD51, BRCA1; the effect is achieved by using small molecules (RS-1, stimulates RAD51), mRNA (BRCA1) or fusion with Cas9 (CtIP) [23]–[27].

Note, that in the case of repair factors activation, the use of ectopic expression has several advantages over the use of small molecules: the desired gene could undergo mutagenesis; it can be added to the cell in various forms: DNA, RNA, or protein. In the past few years, the data about repair pathways and pathway switching have been updated and supplemented with new factors, which allows impact not only the intermediate or final stage of repair, but on the point of initiation to prevent the possibility of switching the HDR mechanism to NHEJ. In 2018 it was shown that one of the key contributors to non-homologous end joining is the Shieldin complex. It consists of MAD2L2, SHLD3 (CTC-534A2.2/RINN1), SHLD2

(FAM35A/RINN2), and SHLD1 (C20ORF196/RINN3) proteins [28]. The SHLD3 protein mediates the interaction of the complex with RIF1, which forms a complex with the main participant of the NHEJ pathway 53BP1 [29]. It was shown that the most important participant in the complex is the MAD2L2/REV7 protein, which suppression leads to the activation of the HDR pathway despite normal expression of 53BP1 and RIF1 [30], [31]. On the other hand, in the absence of a double-strand break, the TIRR protein interacts with 53BP1 and prevents it from binding to intact DNA loci [32]. It has been shown that both overexpression and depletion of TIRR negatively affect non-homologous end joining [32]–[35]. This bi-directional action is interesting for the use in genome editing experiments, and direct interaction with 53BP1 allows us to consider the use of TIRR as a potential repair switch [36]. The SCAI protein, a suppressor of cancer cell invasion, also mediates switching of the NHEJ to HDR. It has been shown that it is involved in the destabilization of the NHEJ complex by binding to 53BP1 and replacing the RIF1 factor, which provides interaction with the Shieldin complex [37].

Another method for increasing the HDR efficiency is the use of a new modification of the CRISPR/Cas9 method - prime editing (PE). This method is based on the use of reverse transcriptase (RT) fused to the SpCas9 nickase and a special guide RNA, which consists of three parts: a target RNA for locus recognition, a primer for reverse transcription, and the correct sequence for insertion. The results show that the NHEJ/HDR ratio in the classical CRISPR/Cas9 variant with ssODN as a matrix for HDR is 270 times higher than when using the latest developed system PE3 [38–39].

The number of approaches for improving the efficiency of targeted editing is large today. Nevertheless, many methods have significant disadvantages, and in single work, as a rule, the use of one or two selected methods is described instead of the synthesis of already existing ones. Thus, despite the fact that the described new repair factors can be considered as candidates for increasing the efficiency of HDR, the combination of new approaches with developed ones, such as synchronization with the cell cycle, the use of small molecules, or the effect on downstream repair factors, seems to be optimal.

- [1] F. Memi, A. Ntokou, and I. Papangelis, "CRISPR/Cas9 gene-editing: Research technologies, clinical applications and ethical considerations," *Seminars in Perinatology*, vol. 42, no. 8. W.B. Saunders, pp. 487–500, Dec. 01, 2018, doi: 10.1053/j.semperi.2018.09.003.
- [2] A. Szczepankowska, *Role of CRISPR/Cas System in the Development of Bacteriophage Resistance*, vol. 82. 2012.
- [3] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science* (80-.), vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012, doi: 10.1126/science.1225829.
- [4] J. San Filippo, P. Sung, and H. Klein, "Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 229–257, 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- [5] J. Li and X. Xu, "DNA double-strand break repair: A tale of pathway choices," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 48, no. 7, pp. 641–646, 2016, doi: 10.1093/abbs/gmw045.
- [6] S. A. Smirnikhina, A. A. Anuchina, and A. V. Lavrov, "Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies," *Hum. Genet.*, vol. 138, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00439-018-1953-5.
- [7] M. Bibikova et al., "Stimulation of Homologous Recombination through Targeted Cleavage by Chimeric Nucleases," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 289–297, Jan. 2001, doi: 10.1128/mcb.21.1.289-297.2001.
- [8] S. Cristea et al., "In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 110, no. 3, pp. 871–880, Mar. 2013, doi: 10.1002/bit.24733.
- [9] T. O. Auer, K. Durore, A. De Cian, J. P. Concordet, and F. Del Bene, "Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair," *Genome Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 142–153, Jan. 2014, doi: 10.1101/gr.161638.113.
- [10] E. E. Brachman and E. B. Kmiec, "Gene repair in mammalian cells is stimulated by the elongation of S phase and transient stalling of replication forks," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 4, no. 4, pp. 445–457, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.dnarep.2004.11.007.
- [11] T. K. Ha, Y. G. Kim, and G. M. Lee, "Effect of lithium chloride on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 22, pp. 9239–9248, Aug. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6012-0.
- [12] D. Yang, M. A. Scavuzzo, J. Chmielowiec, R. Sharp, A. Bajic, and M. Borowiak, "Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–15, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep21264.
- [13] B. Fernandez-Garcia et al., "Proteomic analysis of annexin A2 phosphorylation induced by microtubule interfering agents and kinesin spindle protein inhibitors," *J. Proteome Res.*, vol. 9, no. 9, pp. 4649–4660, Sep. 2010, doi: 10.1021/pr100377v.
- [14] S. Lin, B. T. Staahl, R. K. Alla, and J. A. Doudna, "Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery," *Elife*, vol. 3, p. e04766, 2014, doi: 10.7554/eLife.04766.
- [15] Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li, and D. D. Miller, "An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding

- site," *Pharmaceutical Research*, vol. 29, no. 11. Springer, pp. 2943–2971, Nov. 20, 2012, doi: 10.1007/s11095-012-0828-z.
- [16] T. Gutschner, M. Haemmerle, G. Genovese, G. F. Draetta, and L. Chin, "Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair," *Cell Rep.*, vol. 14, no. 6, pp. 1555–1566, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.019.
- [17] S. E. Howden et al., "A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells," *Stem Cell Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 508–517, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.001.
- [18] M. Srivastava et al., "An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression," *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1474–1487, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.054.
- [19] T. Maruyama, S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, J. R. Ingram, and H. L. Ploegh, "Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, pp. 538–542, May 2015, doi: 10.1038/nbt.3190.
- [20] M. Gerlach et al., "Efficient Knock-in of a Point Mutation in Porcine Fibroblasts Using the CRISPR/Cas9-GMNN Fusion Gene," *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 6, p. 296, Jun. 2018, doi: 10.3390/genes9060296.
- [21] Z. Hu et al., "Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells," *Cell Biosci.*, vol. 8, no. 1, p. 12, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13578-018-0200-z.
- [22] M. D. Canny et al., "Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency," *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 1, pp. 95–102, Nov. 2017, doi: 10.1038/nbt.4021.
- [23] K. Jayatilaka et al., "A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 41, pp. 15848–15853, Oct. 2008, doi: 10.1073/pnas.0808046105.
- [24] S. Yu, Z. Song, J. Luo, Y. Dai, and N. Li, "Over-expression of RAD51 or RAD54 but not RAD51/4 enhances extra-chromosomal homologous recombination in the human sarcoma (HT-1080) cell line," *J. Biotechnol.*, vol. 154, no. 1, pp. 21–24, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.023.
- [25] H. A. Rees, W. H. Yeh, and D. R. Liu, "Development of hRad51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09983-4.
- [26] M. Charpentier et al., "CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03475-7.
- [27] J. Pinder, J. Salsman, and G. Deltaille, "Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 19, pp. 9379–92, Oct. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv993.
- [28] S. M. Noordermeer et al., "The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair," *Nature*, vol. 560, no. 7716. Nature Publishing Group, pp. 117–121, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0340-7.
- [29] C. S. Clairmont et al., "TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change," *Nat. Cell Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2020, doi: 10.1038/s41556-019-0442-y.
- [30] H. Ghezraoui et al., "53BP1 cooperation with the REV7–shieldin complex underpins DNA structure-specific NHEJ," *Nature*, vol. 560, no. 7716, pp. 122–127, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0362-1.
- [31] G. Xu et al., "REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition," *Nature*, vol. 521, no. 7553, pp. 541–544, May 2015, doi: 10.1038/nature14328.
- [32] V. Boersma et al., "MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection," *Nature*, vol. 521, no. 7553, pp. 537–540, 2015, doi: 10.1038/nature14216.
- [33] A. Zhang, B. Peng, P. Huang, J. Chen, and Z. Gong, "The p53-binding protein 1-Tudor-interacting repair regulator complex participates in the DNA damage response," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 16, pp. 6461–6467, Apr. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.777474.
- [34] M. V. Botuyan et al., "Mechanism of 53BP1 activity regulation by RNA-binding TIRR and a designer protein," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41594-018-0083-z.
- [35] P. Drané et al., "TIRR regulates 53BP1 by masking its histone methyl-lysine binding function," *Nature*, vol. 543, no. 7644, pp. 211–216, 2017, doi: 10.1038/nature21358.
- [36] Y. Dai, A. Zhang, S. Shan, Z. Gong, and Z. Zhou, "Structural basis for recognition of 53BP1 tandem Tudor domain by TIRR," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 2123, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04557-2.
- [37] A. A. Anuchina, A. V. Lavrov, and S. A. Smirnikhina, "TIRR: a potential front runner in HDR race—hypotheses and perspectives," *Molecular Biology Reports*, vol. 47, no. 3. Springer, pp. 2371–2379, Mar. 01, 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05285-x.
- [38] S.-Y. Isobe, K. Nagao, N. Nozaki, H. Kimura, and C. Obuse, "Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair," *Cell Rep.*, vol. 20, no. 2, pp. 297–307, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.056.
- [39] A. V. Anzalone et al., "Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA," *Nature*, vol. 576, no. 7785, pp. 149–157, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1711-4.

4.6. Предлагаемые методы и подходы, общий план работы на весь срок выполнения проекта, включая план работы на ОИ и ожидаемые результаты (объемом не менее 2 стр.; в том числе указываются ожидаемые конкретные результаты по годам; общий план дается с разбивкой по годам)

на русском языке

В работе будут использованы методы повышения ГР, которые, с одной стороны, уже описаны в литературе и показали хорошие результаты (использование RNP, геминина, ингибитора лигазы IV Scg7, праймированного редактирования, винбластин), с другой стороны, разработанные в нашей лаборатории (влияние на ключевые факторы, участвующие в ГР: ингибирование MAD2L2 и TIRR, оверэкспрессия TIRR).

На первом этапе тестировать указанные выше методы будем на клеточной культуре HEK293T с встроенным геном GFP с однонуклеотидной делецией (при этой мутации в кодирующей последовательности гена происходит образование преждевременного стоп-кодона и флуоресценция не регистрируется). Мы будем восстанавливать правильную последовательность GFP с помощью ssODN, в случае исправления мутации будем фиксировать флуоресценцию GFP. Таким образом, это позволит нам на первом этапе оценить базовый уровень ГР и его повышение при использовании разных подходов, оцененный с помощью проточной цитофлуориметрии. Все необходимые плазмиды и ssODN для этих целей есть в лаборатории.

На втором этапе применим разработанные методы для увеличения ГР в органоидах. Органоиды будем получать из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с муковисцидозом с гомозиготной мутацией F508del в гене CFTR. Для этого дифференцируем ИПСК сначала в NKX2-1+ прогениторные клетки, из которых при добавлении ряда факторов (FGF7, CHIR-99021 и ретиноевая кислота) будут получены сами органоиды. В органоидах будем исправлять мутацию F508del, для чего в распоряжении членов коллектива есть все необходимые плазмиды и ssODN. В данном случае оценку эффективности коррекции мутации будем проводить с помощью глубокого таргетного секвенирования фрагмента CFTR.

Используемые методы:

Синхронизация клеточного цикла с помощью винбластина. Ранее нами подобрана оптимальная концентрация винбластина (10,1 мкг/мл), при которой существенно возрастает доля клеток культуры HEK293T, находящихся в фазе клеточного цикла G2/M, в которой происходит ГР. Будет проведено дополнительное исследование, направленное на подбор оптимальной концентрации винбластина для синхронизации клеток, входящих в состав органоидов. Будет проведено редактирование мутации F508del в гене CFTR в них с оценкой эффективности путем таргетного глубокого секвенирования фрагмента CFTR.

Доставка компонентов CRISPR/Cas9 в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP). Ранее мы наладили сборку и доставку RNP в клетки культуры HEK293T и показали, что эффективность редактирования ГР увеличивается до 20 раз. Необходимо будет провести дополнительную оптимизацию протокола трансфекции RNP в органоиды с использованием системы, основанной на восстановлении правильной последовательности GFP (при ко-трансфекции плазмиды с GFP с мутацией). Оценивать эффективность редактирования будем с помощью проточной цитофлуориметрии. Будет проведено редактирование мутации F508del в гене CFTR в них с оценкой эффективности путем таргетного глубокого секвенирования фрагмента CFTR.

Ингибирование генов MAD2L2 и TIRR. Ранее мы отработали протокол ингибирования этих генов в культуре HEK293T с помощью siRNA. Первые эксперименты показывают, что ингибирование MAD2L2 приводит к увеличению ГР в 5 раз. Необходимо будет оптимизировать протокол ингибирования этих генов в культуре органоидов. После чего будут проведены эксперименты по редактированию мутации F508del в гене CFTR в них с оценкой эффективности путем таргетного глубокого секвенирования фрагмента CFTR.

Оверэкспрессия TIRR. Ранее мы разработали протокол оверэкспрессии фактора TIRR и культуре HEK293T, однако пока не провели пилотные эксперименты, направленные на оценку его влияния на ГР. Необходимо будет оптимизировать протокол оверэкспрессии в органоидах и провести эксперименты по редактированию мутации F508del в гене CFTR в них с оценкой эффективности путем таргетного глубокого секвенирования фрагмента CFTR.

Оверэкспрессия геминина. Кодирующая последовательность геминина (точнее, его фрагмент) должен быть присоединен к нуклеазе в плазмиде. Для этого нам необходимо будет заказать соответствующую плазмиду в депозитории Addgene, клонировать в нее используемые в работе направляющие РНК, верифицировать полученные плазмиды секвенированием по Сэнгеру и рестрикционным анализом. После этого необходимо будет провести эксперименты по восстановлению правильной последовательности GFP и коррекции мутации F508del в гене CFTR. Оценивать эффективность исправления мутации в GFP будем проточной цитофлуориметрией, в гене CFTR - глубоким

таргетным секвенированием.

Подавление НГСК с помощью ингибитора лигазы IV. В нашем распоряжении имеется этот ингибитор - Scr7.

Литературные данные дают противоречивую информацию о его оптимальной концентрации для экспериментов по геномному редактированию, поэтому нам необходимо будет сначала подобрать эту концентрацию на модельной системе по восстановлению GFP в клетках культуры HEK293T (с оценкой с помощью проточной цитофлуориметрии). После этого будет проведена работа по коррекции мутации F508del в гене CFTR в органоидах с оценкой глубоким таргетным секвенированием.

Праймированное редактирование (ПР). Для использования этого метода нам необходимо будет заказать в депозитории Addgene плазмиду с нисказой SpCas9 и присоединенной к ней кодирующей последовательностью обратной транскриптазы (ОТ), а также видоизменить последовательность sgRNA на мутацию F508del, которую мы используем в комбинации с SpCas9. В рамках этой работы мы будем использовать модификации ПР2 и ПР3. Для ПР2 необходима плазида с nCas9-ОТ и модифицированная sgRNA (regRNA), один фрагмент которой будет служить праймером для ОТ, а второй - правильной последовательностью для встраивания. Модификация ПР3 требует использования еще одной sgRNA, с помощью которой будет создан второй разрыв на противоположной цепи. Эта модификация считается более эффективной, однако по некоторым данным приводит к большему проценту инделов в месте редактирования. Так как эффективность работы ПР2 и ПР3 сильно зависит от последовательности regRNA, мы проведем отдельную работу по выявлению наиболее эффективной последовательности (будем варьировать длину праймера для ОТ и матрицы для ГР), а также проведем работу по оценке оптимального расстояния до второго ника (в случае ПР3). Планируем использовать минимум шесть regRNA и минимум две sgRNA для второго ника. Результаты будем оценивать с помощью глубокого таргетного секвенирования фрагмента CFTR.

Предполагается по итогам проведения выше описанных экспериментов скомбинировать некоторые подходы.

Например, представляется целесообразным оценить эффективность комбинаций ингибитора лигазы IV, синхронизатора клеточного цикла и геминина и сравнить их по эффективности, точности и трудоемкости с новым и перспективным ПР.

План работ

Первый год

Получение культуры органоидов из ИПСК больного муковисцидозом, секвенирование генома полученных органоидов. Проверка возможности и подбор оптимальной дозы винбластина для синхронизации в фазе G2/M клеток, входящих в состав органоидов.

Оптимизация условий трансфекции RNP в органоиды.

Оптимизация ингибирования MAD2L2 и TIRR в органоидах с помощью малых интерферирующих РНК.

Оптимизация протокола оверэкспрессии TIRR.

Заказ на Addgene плазмид с геминином и праймированным редактированием.

Дизайн направляющих РНК для праймированного редактирования

Клонирование направляющих РНК в плазмиды с геминином и nCas9-RT, верификация полученных плазмид.

Публикация 2 статей

Второй год

Подбор оптимальной концентрации Scr7

Проведение экспериментов по редактированию F508del в органоидах при доставке CRISPR/Cas9 в виде RNP, оценка эффективности редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Проведение экспериментов по редактированию F508del в синхронизированных органоидах (при возможности проведения синхронизации в гетерогенном по определению органоиде), оценка эффективности редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Проведение экспериментов по редактированию F508del в органоидах при ингибировании MAD2L2 и TIRR, оценка эффективности редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Проверка возможностей комбинирования синхронизатора, ингибитора лигазы IV и геминина на клеточной культуре HEK293T

Отработка протоколов работы с ПР на культурах HEK293T

Разработка методов оценки возможных побочных эффектов, в том числе офф-таргетных эффектов при различных способах редактирования.

Публикация 2 статей

Третий год

Проведение экспериментов по редактированию F508del в органоидах при оверэкспрессии TIRR, оценка эффективности редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Проведение экспериментов по редактированию F508del в органоидах с использованием геминина, оценка эффективности редактирования с помощью глубокого таргетного секвенирования.

Проведение экспериментов по редактированию в комбинациях, показавших свою эффективность на клетках HEK293T, на органоидах.

Начало работ по ПР на органоидах

Проведение оценки побочных эффектов методом глубокого таргетного секвенирования предсказанных возможных офф-таргетных сайтов, а также экзомного/геномного секвенирования и анализа транскриптома клеток/органов

Оценка функциональных эффектов коррекции мутации F508del в органоидах.

Публикация 2 статей

Четвертый год

Завершение экспериментальных работ, повтор неполных/неудачных экспериментов или экспериментов с противоречивыми результатами.

Сравнение и анализ полученных результатов

Написание итоговых статей (4) и отчета.

на английском языке

The work will use methods for increasing HDR, which, on the one hand, have already been described in the literature and have shown good results (the use of RNP, geminin, ligase IV inhibitor Scr7, primed editing, vinblastine), on the other hand, developed in our laboratory (the effect on key factors involved in HDR: MAD2L2 and TIRR inhibition, TIRR overexpression). At the first stage, we will test the above methods on a HEK293T cell culture with an inserted GFP gene with a single nucleotide deletion (with this mutation, a premature stop codon is formed in the coding sequence of the gene and fluorescence is not recorded). We will restore the correct GFP sequence using ssODN, if the mutation is corrected, we will record the GFP fluorescence. Thus, this will allow us at the first stage to assess the baseline level of HDR and its increase using different approaches, assessed using flow cytometry. All necessary plasmids and ssODNs for these purposes are in the laboratory.

At the second stage, we will apply the developed methods to increase HDR in organoids. Organoids will be obtained from induced pluripotent stem cells of a patient with cystic fibrosis with a homozygous F508del mutation in the CFTR gene. For this, we differentiate iPSCs first into NKX2-1+ progenitor cells, from which the organoids will be obtained by adding a number of factors (FGF7, CHIR-99021, and retinoic acid). In organoids, we will correct the F508del mutation, for which the research team have all the necessary plasmids and ssODNs. In this case, the assessment of the efficiency of mutation correction will be carried out using deep targeted sequencing of the CFTR fragment.

Methods used:

Synchronization of the cell cycle with vinblastine. Previously, we selected the optimal concentration of vinblastine (10.1 µg/ml), at which the proportion of HEK293T culture cells in the G2/M phase of the cell cycle, in which HDR occurs, significantly increases. Additional research will be carried out aimed at selecting the optimal concentration of vinblastine to synchronize the cells of the organoids. Editing of the F508del mutation in the CFTR gene in them will be carried out with an assessment of the efficiency by targeted deep sequencing of the CFTR fragment.

Delivery of CRISPR/Cas9 components in the form of ribonucleoprotein complexes (RNP). Previously, we adjusted the assembly and delivery of RNP into HEK293T cells and showed that the efficiency of HDR editing increases up to 20 times. It will be necessary to further optimize the protocol for transfection of RNP into organoids using a system based on restoring the correct GFP sequence (when co-transfecting a plasmid with a mutated GFP). We will evaluate the editing efficiency using flow cytometry. Editing of the F508del mutation in the CFTR gene in them will be carried out with an assessment of the effectiveness by targeted deep sequencing of the CFTR fragment.

Inhibition of the MAD2L2 and TIRR genes. We have previously worked out a protocol for inhibition of these genes in a HEK293T culture using siRNA. The first experiments show that inhibition of MAD2L2 leads to a 5-fold increase in HDR. It will be necessary to optimize the protocol for inhibiting these genes in organoid culture. After that, experiments will be carried out to edit the F508del mutation in the CFTR gene in them with an assessment of the efficiency by targeted deep sequencing of the CFTR fragment.

Overexpression of TIRR. We have previously developed a protocol for overexpression of TIRR factor in HEK293T culture, however, we have not yet conducted pilot experiments aimed at assessing its effect on HDR. It will be necessary to optimize

the protocol of overexpression in organoids and conduct experiments on editing the F508del mutation in the CFTR gene in them with an assessment of the efficiency by targeted deep sequencing of the CFTR fragment.

Overexpression of geminin. The coding sequence for geminin (more precisely, its fragment) must be attached to the nuclease in the plasmid. To do this, we will need to order the corresponding plasmid from the Addgene depository, clone the guide RNAs used in the work, verify the resulting plasmids by Sanger sequencing and restriction analysis. After this, it will be necessary to carry out experiments to restore the correct GFP sequence and correct the F508del mutation in the CFTR gene. We will evaluate the efficiency of mutation correction in GFP by flow cytometry, in the CFTR gene - by deep targeted sequencing.

Suppression of NHEJ with a ligase IV inhibitor. We have at our disposal this inhibitor - Scr7. The literature data provide conflicting information about its optimal concentration for experiments on genome editing, therefore, we will first need to select this concentration on a model system for GFP restoration in HEK293T cells (assessed by flow cytometry). After that, work will be carried out to correct the F508del mutation in the CFTR gene in organoids with assessment by deep targeted sequencing.

Primed Editing (PE). To use this method, we will need to order a plasmid with nickase SpCas9 fused with reverse transcriptase (RT) coding sequence from the Addgene depository, as well as modify the sgRNA sequence for the F508del mutation, which we use in combination with SpCas9. As part of this work, we will use the modifications PE2 and PE3. For PE2, a plasmid with nCas9-OT and a modified sgRNA (pegRNA) is required, one fragment of which will serve as a primer for RT, and the other as the correct sequence for insertion. Modification of PE3 requires the use of another sgRNA, which will create a second nick on the opposite strand. This modification is considered more effective, however, according to some reports, it leads to a higher percentage of indels in the target locus. Since the efficiency of PE2 and PE3 strongly depends on the pegRNA sequence, we will carry out a separate work to identify the most effective sequence (we will vary the length of the primer for RT and template for HR), and we will also work to assess the optimal distance to the second nick (in the case of PE3). We plan to use at least six pegRNAs and at least two sgRNAs for the second nick. The results will be assessed using deep targeted sequencing of the CFTR fragment.

It is supposed to combine some approaches based on the results of the above experiments. For example, it seems appropriate to evaluate the effectiveness of combinations of a ligase IV inhibitor, a cell cycle synchronizer, and geminin and compare them in terms of effectiveness, accuracy, and labor intensity with a new and promising PE.

Work plan

First year

Obtaining a culture of organoids from iPSCs of a patient with cystic fibrosis. Whole-genome sequencing of obtained organoids.

Selection of the optimal dose of vinblastine for synchronization in the G2/M phase of the cells that are part of the organoids.

Optimization of conditions for RNP transfection into organoids.

Optimization of MAD2L2 and TIRR Inhibition in organoids using small interfering RNAs.

Optimization of the TIRR overexpression protocol.

Order for Addgene plasmids with geminin and primed editing.

Design of RNA Guidelines for Prime Editing

Cloning of guide RNAs into plasmids with geminin and nCas9-RT, verification of the resulting plasmids.

Publishing 2 articles

Second year

Selection of the optimal concentration of Scr7

Carrying out experiments on editing F508del in organoids upon delivery of CRISPR/Cas9 in the form of RNP, evaluating the editing efficiency using deep targeted sequencing.

Experimenting with editing F508del in synchronized organoids (if it would be demonstrated during the 1-st year that it's possible to do in the heterogenous organoid), evaluating editing performance using deep targeted sequencing.

Experiments on editing F508del in organoids with inhibition of MAD2L2 and TIRR, evaluation of the editing efficiency using deep targeted sequencing.

Testing the possibilities of combining a synchronizer, a ligase IV inhibitor and geminin on HEK293T cell culture

Development of protocols for working with PE in HEK293T

Development of methods for assessing possible side effects, including off-target effects with different editing methods.

Publishing 2 articles

Third year

Conducting experiments on editing F508del in organoids with TIRR overexpression, evaluating the editing efficiency using deep targeted sequencing.

Conducting experiments on editing F508del in organoids using geminin, evaluating the efficiency of editing using deep targeted sequencing.

Conduct editing experiments in combinations that have been shown to be effective in HEK293T cells, in organoids.

Start of work on PE in organoids

Assessment of side effects by deep targeted sequencing of predicted possible off-target sites, as well as exome/whole-genome sequencing and analysis of cell/organoid transcriptome

Evaluation of the functional effects of the F508del mutation correction in organoids.

Publishing 2 articles

Fourth year

Completion of experimental work, repetition of incomplete/failed experiments or experiments with conflicting results.

Comparison and analysis of the obtained results

Writing summary articles and reports.

Publishing 4 articles

4.7. Имеющийся у научного коллектива научный задел по проекту, наличие опыта совместной реализации проектов (указываются полученные ранее результаты, разработанные программы и методы)

Работа в области повышения ГР ведется в лаборатории редактирования генома с 2017 года. За это время были подробно изучены механизмы репарации двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих в результате нуклеазной активности, и пути воздействия на них. По итогам этой работы научным коллективом в 2019 г. был опубликован обзор в журнале Human Genetics (Q1). Экспериментальная работа в этом направлении также начата в 2017 году. За это время были определены ключевые факторы ГР (MAD2L2, TIRR), воздействуя на которые можно повысить ГР, проведена часть экспериментов на клеточной культуре HEK293T, в которой показано повышение ГР (исправление мутации в гене EGFP) при нокдауне гена MAD2L2 в 5 раз (неопубликованные данные). Начата работа по доставке компонентов CRISPR/Cas9 в клетки в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (RNP); показано, что эффективность ГР в некоторых случаях повышается в 20 раз (неопубликованные данные). Проведена серия экспериментов по влиянию синхронизаторов клеточного цикла на эффективность ГР, показано, при использовании винбластина повышает эффективность ГР в 2 раза (неопубликованные данные). Имеется опыт получения и ведения различных культур, в т.ч. индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Идет межлабораторный перенос технологии получения органоидов с целью освоения навыками сотрудниками лаборатории (в настоящий момент есть возможность получения и ведения органоидов в смежной лаборатории "Генетики стволовых клеток". Таким образом, в члены коллектива владеют всеми ключевыми навыками, необходимыми для выполнения этого проекта, а полученные ранее результаты показывают, что использованные методы, действительно, повышают ГР.

4.8. Перечень оборудования, материалов, информационных и других ресурсов, имеющихся у научного коллектива для выполнения проекта (в том числе – описывается необходимость их использования для реализации проекта)

Коллектив исполнителей имеет доступ к следующему оборудованию:

1. Для молекулярно-генетической части работы есть все необходимое оборудование, включая генетические анализаторы (для секвенирования ДНК по Сэнгеру), термоциклеры (для проведения ПЦР), в том числе и для проведения ПЦР в реальном времени (для оценки экспрессии), проточный цитометр (для иммунофенотипирования клеток), световые и инвертированные флуоресцентные микроскопы (для визуализации клеток и экспрессии GFP), термостаты, ПЦР-боксы, морозильники, холодильники, вентексы, шейкеры, центрифуги, электрофорезное оборудование, аналитические весы, компьютеры для обработки и анализа результатов, боксы для клонирования и работы с прокариотами.
2. Для клеточной части работы: шкаф ламинарный II класса биологической безопасности (для обеспечения асептических условий при работе с клеточными культурами), автоматический CO₂-инкубатор (для обеспечения контролируемых условий для культивирования in vitro), люминесцентный инвертированный микроскоп с устройством документирования (для наблюдения фиксированных объектов и прижизненное наблюдение объектов с помощью фазового контраста, переменного рельефного контраста, DIC-контраста и люминесценции, с возможностью документирования), орбитальный шейкер (для ротационного перемешивания биологических жидкостей и растворов), центрифуга лабораторная (для программируемого центрифугирования), микроцентрифуга Mini spin (для программируемого центрифугирования малых объемов), низкотемпературный медицинский морозильник (для

хранения биообразцов при температуре от -50° до -90°С); конфокальный микроскоп (для углубленного анализа экспрессии маркеров клеток). Опыт получения и культивирования кишечных органоидов.

4.9. Обоснование необходимости использования данного ОИ. Решаемые с использованием ОИ задачи

В том числе обоснование критической важности использования ОИ для проекта.

ЦКП «Геноаналитика» проводит полногеномное и таргетное секвенирование любых организмов, а также транскриптомные исследования. Все эти три направления генетического анализа необходимы для оценки он- и офф-таргетной активности CRISPR/Cas9 и эффективности ГР. Оценка он-таргетной активности (таргетное секвенирование редактируемого локуса) позволит охарактеризовать соотношение НГСК/ГР. Учитывая разнообразие действующих факторов, предположительно повышающих ГР, необходимо всесторонне изучить возможные неспецифические воздействия на геном и транскриптом клеток и органоидов. В ФГБНУ «МГНЦ» есть NGS-секвенаторы, однако доступная технология ThermoFisher имеет технологические ограничения на точность оценки инделов, что важно для оценки уровня НГСК. А имеющийся секвенатор Illumina позволяет только проводить таргетное экзомное секвенирование, тогда как полногеномное, глубокое таргетное и транскриптомное секвенирование, необходимые для выполнения данной работы, отсутствует (или существенно ограничено), что вынуждает нас планировать подобную работу с привлечением стороннего ЦКП.

4.10. План работы на первый год выполнения проекта (в том числе указываются запланированные командировки (экспедиции))

на русском языке

Получение культуры органоидов из ИПСК больного муковисцидозом. Секвенирование генома полученных органоидов. Подбор оптимальной дозы винбластина для синхронизации в фазе G2/M клеток, входящих в состав органоидов.

Оптимизация условий трансфекции RNP в органоиды.

Оптимизация ингибирования MAD2L2 и TIRR в органоидах с помощью малых интерферирующих РНК.

Оптимизация протокола оверэкспрессии TIRR.

Заказ на Addgene плазмид с геминином и праймированным редактированием.

Дизайн направляющих РНК для праймированного редактирования

Клонирование направляющих РНК в плазмиды с геминином и nCas9-RT, верификация полученных плазмид.

Если будет возможность, то планируем принять участие в нескольких конференциях, в том числе зарубежных.

на английском языке

Obtaining a culture of organoids from iPSCs of a patient with cystic fibrosis. Whole-genome sequencing of obtained organoids.

Selection of the optimal dose of vinblastine for synchronization in the G2/M phase of the cells that are part of the organoids.

Optimization of conditions for RNP transfection into organoids.

Optimization of MAD2L2 and TIRR inhibition in organoids using small interfering RNAs.

Optimization of the TIRR overexpression protocol.

Order for Addgene plasmids with geminin and primed editing.

Design of pegRNA for Prime Editing

Cloning of guide RNAs into plasmids with geminin and nCas9-RT, verification of the resulting plasmids.

If possible, we plan to take part in several conferences, including foreign ones.

4.11. Планируемое на первый год содержание работы каждого основного исполнителя проекта (включая руководителя проекта)

Лавров А.В. (общее руководство): написание статей по теме проекта, анализ конкурентов, дизайн всех экспериментов (создание плазмид, геномное редактирование, получение органоидов), организация работы с ЦКП, администрирование работ по гранту, в т.ч. поэтапный контроль и обеспечение взаимодействия между участниками работ; разработка детального плана работ на второй этап.

Анучина А.А. (молекулярно-генетическая работа): создание плазмид для ГР, дизайн плазмид, анализ полученных плазмид, отработка протоколов повышения и понижения экспрессии MAD2L2 и TIRR, написание статей по проекту.

Кондратьева Е.В. (клеточная работа): получение и ведение культур органоидов от пациента с муковисцидозом, подготовка и проведение экспериментов на органоидах, написание статей по проекту.

Все – подготовка годового отчета.

Если будет возможность, то планируем принять участие в нескольких конференциях, в том числе зарубежных.

4.12. Ожидаемые в конце первого года конкретные научные результаты (форма изложения должна дать возможность провести экспертизу результатов и оценить степень выполнения заявленного в проекте плана работы) на русском языке

Культура органоидов из ИПСК больного муковисцидозом. Данные о геноме органоидов.

Данные о возможности использования винбластина для синхронизации в фазе G2/M клеток, входящих в состав органоидов и в случае возможности информация о дозах и протоколе введения.

Протокол трансфекции RNP в органоиды.

Протокол ингибирования MAD2L2 и TIRR в органоидах с помощью малых интерферирующих РНК.

Протокол оверэкспрессии TIRR.

Заказанные на Addgene плазмид с геминином и праймированным редактированием получены, клонированные и банкированные в лаборатории.

Синтезированные направляющие РНК для праймированного редактирования

Плазмиды в сборе с направляющими РНК, геминином, а также ПР nCas9-RT. Характеристика плазмид в банке.

Если будет возможность, то участие в нескольких конференциях, в том числе зарубежных.

на английском языке

Culture of organoids from iPSCs of a patient with cystic fibrosis. Data about genome of organoid.

Data on the possibility of using vinblastine for synchronization in the G2/M phase of cells of the organoids and, if possible, information on doses and administration protocol.

Protocol for transfection of RNP into organoids.

Protocol for inhibition of MAD2L2 and TIRR in organoids using small interfering RNAs.

TIRR overexpression protocol.

Ordered from Addgene plasmids with geminin and primed editing were obtained, cloned and banked in the laboratory.

Synthesized guide RNAs for primed editing

Assembled plasmids with guide RNA, geminin, and nCas9-RT. Characteristics of plasmids in the bank.

If possible, then participation in several conferences, including foreign.

4.13. Перечень планируемых к приобретению за счет гранта оборудования, материалов, информационных и других ресурсов для выполнения проекта (в том числе – описывается необходимость их использования для реализации проекта)

Планируется закупка следующих реактивов и расходных материалов:

1. Антитела для иммуоцитохимических исследований (Anti-HA tag antibody, Anti-CRISPR-Cas9 antibody, CFTR, FOXJ1, MUC5AC, SOX9, SOX2, SCGB3A2, AQP1, PDPN, HOPX, SFTPD, SFTPB, SFTPC, AQP-5, SCGB1A1, AGER (RAGE), ID2, NKX2.1 и др.) – для характеристики органоидов, для оценки эффективности трансдукции, для оценки экспрессии CFTR.
2. Культуральные среды, растворы и добавки культуральной чистоты для выделения, наращивания и криоконсервации культур клеток – для всех работ, связанных с редактированием мутации и получением органоидов.
3. Лабораторный пластик (культуральная посуда, серологические пипетки, наконечники для дозаторов и т.д.) – для всех работ, связанных с редактированием мутации, получением органоидов.
4. Наборы для выделения ДНК, плазмид и РНК – для получения и характеристики плазмид, оценки редактирования, характеристики органоидов.
5. Олигонуклеотиды ПЦР и секвенирования – для получения и характеристики плазмид, оценки редактирования.
6. Реагенты для культивирования прокариот и эукариот – для всех работ, связанных с редактированием мутации, получением органоидов.
7. Реагенты и расходные материалы для электрофореза нуклеиновых кислот – для получения и характеристики плазмид, оценки редактирования.
8. Реактивы и расходные материалы (стрипы, наконечники для пипеток) для ПЦР – анализа – для получения и характеристики плазмид, оценки редактирования.
9. Ростовые и дифференцировочные факторы для культивирования и направленной дифференцировки клеток в органоиды.
10. Эндонуклеазы рестрикции – для клонирования и верификации полученных плазмид.
11. Комплект реагентов для проведения форсколинового теста.
12. Синхронизаторы клеточного цикла, ингибитор лигазы IV, siRNA для управления экспрессией генов, вовлеченных в

регуляцию репарации ДНК.

13. Плазмиды с Addgene

4.14. Файл с дополнительной информацией 1 (в случае представления заявки на конкурс в виде электронного документа - письменное обязательство владельца ОИ обеспечить допуск научного коллектива к его использованию)

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. Один файл в формате pdf, до 3 Мб.

Скачать...

Текст в файлах с дополнительной информацией должен приводиться на русском языке. Перевод на английский язык требуется в том случае, если руководитель проекта оценивает данную информацию существенной для эксперта.

4.15. Файл с дополнительной информацией 2 (если информации, приведенной в файле 1, окажется недостаточно)

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. Один файл в формате pdf, до 3 Мб.

Подпись руководителя проекта _____ /А.В. Лавров/

Форма 5. Запрашиваемое финансирование на 2021 год

5.1. Планируемые расходы по проекту

№ п.п.	Направления расходования гранта	Сумма расходов (тыс.руб.)
	ВСЕГО	6000
	Вознаграждение членов научного коллектива (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды, без лиц категории «вспомогательный персонал»)	2400
	Вознаграждение лиц категории «вспомогательный персонал» (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	0
1	Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)	2400
2	Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (за исключением владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта (не более 15 процентов от суммы гранта)	0
3	Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (включая обучение работников, монтажные, пуско-наладочные и ремонтные***** работы) ***** Не связанные с осуществлением текущей деятельности организации.	0
4	Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования	2200
5	Иные расходы для целей выполнения проекта	400
6	Работы (услуги) ОИ (не более 20 процентов от суммы гранта)	400
7	Накладные расходы организации (не более 10 процентов от суммы гранта)	600

5.2. Расшифровка планируемых расходов

№ п.п.	Направления расходования гранта, расшифровка
1	<p>Итого вознаграждение (с учетом страховых взносов во внебюджетные фонды)</p> <p>(указывается сумма вознаграждения (включая руководителя, основных исполнителей и иных исполнителей, привлекаемых к выполнению работ по проекту), включая установленные законодательством Российской Федерации гарантии, отчисления по страховым взносам на обязательное пенсионное страхование, на обязательное медицинское страхование, на обязательное социальное страхование на случай временной нетрудоспособности и в связи с материнством, на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний)</p> <p>Лавров Александр Вячеславович, 340 000</p> <p>Анучина Арина Артуровна, 480 000</p> <p>Кондратьева Екатерина Владимировна, 480 000</p> <p>Зайнитдинова Миляуша Иршатовна, 240 000</p> <p>Демченко Анна Гасымовна, 240 000</p> <p>Слесаренко Яна Сергеевна, 240 000</p> <p>Иванова Алиса Владимировна, 240 000</p> <p>Ясиновский Матвей Ильич, 140 000</p>
2	<p>Оплата научно-исследовательских работ сторонних организаций (за исключением владельца ОИ), направленных на выполнение научного проекта</p> <p>(приводится перечень планируемых договоров (счетов) со сторонними организациями с указанием предмета и суммы каждого договора)</p> <p>нет</p>
3	<p>Расходы на приобретение оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования</p>

(представляется перечень планируемых к закупке оборудования и иного имущества, необходимых для проведения научного исследования (в соответствии с п. 4.13 формы 4))

нет

4 Расходы на приобретение материалов и комплектующих для проведения научного исследования

(представляется расшифровка запланированных материалов и комплектующих (в соответствии с п. 4.13 формы 4))

2200

Реагенты для генно-инженерных работ (1 000 000 руб.):

Наборы для выделения ДНК, плазмид и РНК – 150 000;

Олигонуклеотиды ПЦР и секвенирования – 150 000;

Реагенты для культивирования прокариот – 50 000;

Реагенты и расходные материалы для электрофореза нуклеиновых кислот – 50 000;

Реактивы и расходные материалы (стрипы, наконечники для пипеток) – 100 000;

Эндонуклеазы рестрикции, нуклеазы Cas – 200 000;

Общелaborаторный пластик (пробирки, наконечники для пипеток) – 100 000;

Наборы для транскрипции ин витро – 100 000;

Плазмиды - 100 000.

Расходные материалы для культуральных работ и получения органоидов (1 200 000):

Культуральные среды, растворы и добавки культуральной чистоты для выделения, наращивания и криоконсервации культур клеток – 400 000

Лабораторный пластик (культуральная посуда, серологические пипетки, наконечники для дозаторов и т.д.) – 150 000

Реагенты для культивирования эукариот – 100 000

Ростовые и дифференцировочные факторы для культивирования и направленной дифференцировки клеток в органоиды – 150 000

Антитела для иммунофенотипирования органоидов – 100 000

Реагенты для трансфекции - 300 000

5 Иные расходы для целей выполнения проекта

(приводятся иные затраты на цели выполнения проекта, в том числе на командировки, оплату услуг связи, транспортных услуг, расходы не расшифровываются)

400 000

Подпись руководителя проекта _____/А.В. Лавров/

Подпись руководителя организации (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

_____/_____
М.П.

Форма «Объект инфраструктуры»

1.1. Наименование ОИ

на русском языке:

ЦКП "Геноаналитика"

на английском языке:

Genoanalytica

1.2. Описание ОИ (объемом не более 2 стр.)

ЦКП «Геноаналитика» основан в 2010 году в Москве. Цель ЦКП — помощь в проведении экспериментальных работ в области генетики и молекулярной биологии на высочайшем техническом уровне и в самых разных масштабах.

Целевая аудитория ЦКП: университеты, научно-исследовательские институты и лаборатории, частные и государственные клиники, неонатальные центры и роддома, а также студенты и аспиранты, сотрудники и руководители малых инновационных предприятий, резиденты технопарков, бизнес-инкубаторов и центров трансфера технологий биологической тематики.

ЦКП «Геноаналитика» имеет в собственности всё необходимое оборудование для секвенирования, мощности которого позволяют обеспечить полноценное функционирование Центра коллективного пользования для широкого спектра заказчиков с учётом индивидуальных потребностей и особенностей каждого проекта. Экспериментальная работа проводится высококвалифицированными специалистами. Полученные данные могут анализироваться здесь же силами опытных бионформатиков. ЦКП обладает как собственными вычислительными ресурсами, так и возможностью оперативно задействовать облачные мощности, расположенные на территории России.

Базовая организация ЦКП — ЗАО «Геноаналитика» — проанализировала тысячи образцов заказчиков в рамках фундаментальных и прикладных работ. На счету компании десятки успешных проектов, проведённых научных исследований, зарегистрированных патентов и разработанных высокотехнологичных продуктов, многие из которых успешно реализуются на российском рынке.

Основные услуги ЦКП:

- полногеномное, экзомное и таргетное секвенирование любых организмов;
- транскриптомика и секвенирование всех типов РНК, в том числе single-cell анализы на платформе 10x;
- определение расположения модификаций гистонов в ChIP-seq экспериментах и анализ метилирования ДНК, другие эпигенетические эксперименты;
- анализы на микроматрицах (генотипирование, профилирование метилирования);
- проведение биоинформатических расчётов.

ЦКП «Геноаналитика» располагается на арендуемых площадях в Научном парке МГУ и Технопарке «Сколково». Имеющихся помещений достаточно для осуществления научной и опытно-производственной деятельности.

Компания Геноаналитика сотрудничает с ведущими организациями в области молекулярной биологии и смежных тематик. Это, прежде всего, ФИЦ «Биотехнологии» РАН (г. Москва), Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук (г. Москва), Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт» (ИМГ РАН) (г. Москва), Лимнологический институт СО РАН (г. Иркутск), Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича» (ИБМХ) (г. Москва), ЮФУ (г. Ростов-на-Дону), Медико-генетический научный центр РАМН (г. Москва), НИИ Медицинской генетики (г. Томск) и др.

А также ряд зарубежных партнеров, среди которых Alacris Theranostics (Alacris Theranostics GmbH, Германия) и Медицинская школа Женевского университета (University of Geneva Medical School, Швейцария).

Геноаналитика активно участвует в обучении руководителей и сотрудников малых инновационных предприятий, содействует созданию новых биотехнологических инновационных компаний в рамках программы ФормулаБИО Научного парка МГУ (<http://formulabio.ru/>) и принимает участие в Фестивале Науки (<http://www.festivalnauki.ru/>).

ОИ зарегистрирован на сайте <http://www.ckp-rf.ru>

нет

ОИ предоставлял информацию в 2019 году в рамках ежегодного мониторинга доступности и результативности деятельности центров коллективного пользования научным оборудованием и уникальных научных установок (письмо

нет

1.3. Фактический адрес размещения ОИ

121205, г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой бульвар д. 42, стр. 1

Информация о руководителе ОИ (структурного подразделения организации, за которым закреплен ОИ)

Фамилия, имя, отчество (при наличии) (полностью): Мазур Александр Михайлович

Должность: директор по науке

Ученое звание, ученая степень: кандидат физико-математических наук

Контактная информация

Номер телефона: +74959308353, +74956205870

Номер факса: +74959308353

Адрес электронной почты: ckr@genoanalytica.ru

Контактная информация о лице, ответственном за функционирование ОИ:

Мазур Александр Михайлович, +74959308353, ckr@genoanalytica.ru

Адрес в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет» официального сайта (страницы) ОИ:

<https://genoanalytica.ru/ckr>

1.4. Показатели ОИ

№ п.п.	Наименование показателя	Единица измерения	Значение показателя для ОИ	
			2018 год	2019 год
1	Отношение фактического времени работы оборудования ОИ к максимально возможному времени работы ***** оборудования ОИ за год ***** Определяется в соответствии с локальными актами владельца ОИ.	%	20	25
2	Отношение фактического времени работы оборудования ОИ в интересах третьих лиц к фактическому времени работы оборудования ОИ за год	%	50	50
3	Количество организаций-пользователей и (или) организаций, участвующих в проведении исследований (экспериментов) с использованием ОИ, в год	шт.	15	22
4	Количество публикаций в российских и иностранных научных журналах, индексируемых в информационно-аналитических системах научного цитирования «Сеть науки» (WEB of Science Core Collection) и «Scopus», полученных с использованием ОИ, в год	шт.	6	4

1.5. Подтверждаем, что на официальном сайте ОИ представлены:

- перечень оборудования, содержащий наименование и основные характеристики приборов;
 - перечень применяемых ОИ методик измерений;
 - перечень выполняемых типовых работ и (или) оказываемых услуг с указанием единицы измерения выполняемой работы и (или) оказываемой услуги и их стоимость в рублях или порядок определения их стоимости;
 - регламент доступа к оборудованию ОИ, предусматривающий порядок выполнения работ и оказания услуг для проведения научных исследований, а также осуществления экспериментальных разработок в интересах третьих лиц;
- условия допуска к работе на оборудовании ОИ.

ДА

Сообщаем, что на официальном сайте ОИ также представлены (указывается при наличии):

(НЕТ) план работы ОИ, содержащий информацию о текущей и планируемой загрузке оборудования;

(ДА) локальный акт владельца ОИ о создании ОИ;

(ДА) проект гражданско-правового договора о выполнении работ и (или) оказании услуг для проведения научных исследований, а также осуществления экспериментальных разработок.

1.6. Перечень наиболее значимых публикаций в российских и иностранных научных журналах, индексируемых в информационно-аналитических системах научного цитирования «Сеть науки» (WEB of Science Core Collection) и «Scopus», презентующих результаты, полученные с использованием ОИ, за период с 1 января 2018 года по настоящее время (не более 20) с указанием вклада ОИ в достижение научного результата, описанного в данных публикациях (незначительный, средний, определяющий)

1.6.1. Наименование публикации:

THE REGULATORY INTERPLAY BETWEEN OCT-1 ISOFORMS CONTRIBUTES TO HEMATOPOIESIS AND THE ISOFORMS IMBALANCE CORRELATES WITH A MALIGNANT TRANSFORMATION OF B CELLS

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Панкратова Е.В., Степченко А.Г., Крылова И.Д., Порцева Т.Н., Григорьева С.Г

на английском языке:

PANKRATOVA E.V., STEPCHENKO A.G., KRYLOVA I.D., PORTSEVA T.N., GEORGIEVA S.G.

1.6.3. Год публикации:

2018

1.6.4. Ключевые слова:

POU2F1; isoforms; hematopoietic cells differentiation; molecular therapeutic target

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

Oncotarget

1.6.7. Выходные данные публикации:

Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 52), pp: 29892-29905

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

2

1.6.1. Наименование публикации:

Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Дергунова Л.В., Филиппенков И.Б., Ставчанский В.В., Денисова А.Е., Южаков В.В., Мозеров С.А., Губский Л.В., Лимборская С.А.

на английском языке:

Lyudmila V. Dergunova, Ivan B. Filippenkov, Vasily V. Stavchansky, Alina E. Denisova, Vadim V. Yuzhakov, Sergey A. Mozerov, Leonid V. Gubsky and Svetlana A. Limborska

1.6.3. Год публикации:

2018

1.6.4. Ключевые слова:

tMCAO, RNA-Seq, Gene expression, mRNA, Neurotransmission, Inflammation

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

BMC Genomics

1.6.7. Выходные данные публикации:

BMC Genomics (2018) 19:655

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1186/s12864-018-5039-5>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

3

1.6.1. Наименование публикации:

The differences in brain stem transcriptional profiling in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Федосеева Л.А., Климов Л.О., Ершов Н.И., Ефимов В.М., Маркель А.Л., Орлов Ю.Л., Редина О.Е.

на английском языке:

Larisa A. Fedoseeva, Leonid O. Klimov, Nikita I. Ershov, Vadim M. Efimov, Arcady L. Markel, Yuriy L. Orlov and Olga E. Redina

1.6.3. Год публикации:

2019

1.6.4. Ключевые слова:

Stress-sensitive hypertension, Brain stem, Transcriptional profiling, RNA-Seq, ISIAH rat strain

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

BMC Genomics

1.6.7. Выходные данные публикации:

2019, 20(Suppl 3):297

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5540-5>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

4

1.6.1. Наименование публикации:

Altered Slc25 family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Бабенко В.Н., Смагин Д.А., Галямина А.Г., Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н.

на английском языке:

Vladimir N. Babenko, Dmitry A. Smagin, Anna G. Galyamina, Irina L. Kovalenko and Natalia N. Kudryavtseva

1.6.3. Год публикации:

2018

1.6.4. Ключевые слова:

RNA-Seq, Social defeat stress, Depression, Aggression, Slc25a* genes, Mrp* genes, Brain regions

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

BMC NEUROSCIENCE

1.6.7. Выходные данные публикации:

ISSN: 1471-2202eISSN: 1471-2202

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12868-018-0480-6>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

5

1.6.1. Наименование публикации:

Dopamine response gene pathways in dorsal striatum MSNs from a gene expression viewpoint: cAMP-mediated gene networks

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Бабенко В.Н., Галямина А.Г., Рогозин И.Б., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н.

на английском языке:

Vladimir N. Babenko, Anna G. Galyamina, Igor B. Rogozin, Dmitry A. Smagin and Natalia N. Kudryavtseva

1.6.3. Год публикации:

2020

1.6.4. Ключевые слова:

Dorsal striatum, Mouse model of chronic social conflicts, DARPP-32, Alternative splicing, RNA-seq

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

BMC NEUROSCIENCE

1.6.7. Выходные данные публикации:

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1186/s12868-020-00560-w>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

6

1.6.1. Наименование публикации:

Aberrant Expression of Collagen Gene Family in the Brain Regions of Male Mice with Behavioral Psychopathologies Induced by Chronic Agonistic Interactions

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Смагин Д.А., Галямина А.Г., Коваленко И.Л., Бабенко В.Н., Кудрявцева Н.Н.

на английском языке:

Dmitry A. Smagin, Anna G. Galyamina, Irina L. Kovalenko, Vladimir N. Babenko, and Natalia N. Kudryavtseva

1.6.3. Год публикации:

2019

1.6.4. Ключевые слова:

Collagen Gene, mice, Aberrant Expression, Psychopathologies

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

BioMed Research International

1.6.7. Выходные данные публикации:

Volume 2019, Article ID 7276389, 13 pages

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1155/2019/7276389>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

7

1.6.1. Наименование публикации:

Nucleotide Modifications Decrease Innate Immune Response Induced by Synthetic Analogs of snRNAs and snoRNAs

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Stepanov G, Zhuravlev E, Shender V

на английском языке:

Степанов Г., Журвалев Е., Шендер В

1.6.3. Год публикации:

2018

1.6.4. Ключевые слова:

synthetic RNA analogs; small nuclear RNAs; small nucleolar RNAs; RNA modification; innate immune response; RNA-Seq; PKR

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

GENES

1.6.7. Выходные данные публикации:

Genes 2018, 9, 531;

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

[doi:10.3390/genes9110531](https://doi.org/10.3390/genes9110531)

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

8

1.6.1. Наименование публикации:

Novel Insights into the Protective Properties of ACTH(4-7)PGP (Semax) Peptide at the Transcriptome Level Following Cerebral Ischaemia–Reperfusion in Rats

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Филиппенков И.Б., Ставчанский В.В., Денисова А.Е., Южаков В.В., Севанкаева Л.Е., Сударкина О.Ю., Дмитриева В.Г., Губский Л.В., Мясоедов Н.Ф., Лимборская С.А., Дергунова Л.В.

на английском языке:

Ivan B. Filippenkov, Vasily V. Stavchansky, Alina E. Denisova, Vadim V. Yuzhakov, Larisa E. Sevan'kaeva, Olga Y. Sudarkina, Veronika G. Dmitrieva, Leonid V. Gubsky, Nikolai F. Myasoedov, Svetlana A. Limborska and Lyudmila V. Dergunova

1.6.3. Год публикации:

2020

1.6.4. Ключевые слова:

tMCAO; mRNA expression; RNA-Seq; synthetic melanocortin derivative ACTH(4-7)PGP (Semax); peptide regulation

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

GENES

1.6.7. Выходные данные публикации:

Genes 2020, 11, 681; doi:10.3390/genes11060681

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

9

1.6.1. Наименование публикации:

Data of de novo genome assembly of the Chlamydia psittaci strain isolated from the livestock in Volga Region, Russian Federation

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Федорова В.А., Зайцев С.С., Хижнякова М.А., Салтыков Ю.В., Евстифеев В.В., Хусаинов Ф.М., Яковлев С.И., Ларионова О.С., Мотин В.Л.

на английском языке:

Valentina A. Feodorova, Sergey S. Zaitsev, Mariya A. Khizhnyakova, Yuri V. Saltykov, Vitaliy V. Evstifeev, Fidail M. Khusainov, Sergey I. Yakovlev, Olga S. Larionova, Vladimir L. Motin

1.6.3. Год публикации:

2020

1.6.4. Ключевые слова:

Chlamydia psittaci Genome assembly de novo genome Rostinovo-70 Illumina HiSeq 2500 platform Oxford Nanopore MinION

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

Elsevier Inc

1.6.7. Выходные данные публикации:

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105190>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

10

1.6.1. Наименование публикации:

Suppression of Alzheimer's Disease-Like Pathology Progression by Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1: A Transcriptome Profiling Study

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Стефанова Н.А., Ершов Н.И., Колосова Н.Г.

на английском языке:

Natalia A. Stefanova, Nikita I. Ershov and Nataliya G. Kolosova

1.6.3. Год публикации:

2019

1.6.4. Ключевые слова:

Alzheimer, SkQ1, Transcriptome Profiling, Mitochondria, Antioxidant

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

1.6.7. Выходные данные публикации:

Volume 2019, Article ID 3984906, 17 pages

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

<https://doi.org/10.1155/2019/3984906>

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

11

1.6.1. Наименование публикации:

Deep insights into the response of human cervical carcinoma cells to a new cyano enone-bearing triterpenoid soloxolone methyl: a transcriptome analysis

1.6.2. Авторы

на русском языке:

Марков А.В., Кел А.Е., Соломатина О.В., Салахутдинов Н.Ф., Зенкова М.А., Логашенко Е.Б.

на английском языке:

Andrey V. Markov, Alexander E. Kel, Oksana V. Salomatina, Nariman F. Salakhutdinov, Marina A. Zenkova and Evgeniya B. Logashenko

1.6.3. Год публикации:

2019

1.6.4. Ключевые слова:

soloxolone methyl; cervical carcinoma; CDDO-Me; cytoscape; mechanism of action

1.6.5. Вид публикации:

статья

1.6.6. Название издания:

Oncotarget

1.6.7. Выходные данные публикации:

Oncotarget, 2019, Vol. 10, (No. 51), pp: 5267-5297

1.6.8. Ссылка на адрес в сети Интернет (при наличии):

1.6.9. Вклад ОИ в достижение научного результата, описанного в данной публикации:

средний

Количество публикаций в перечне: 11

1.7. *** Файл с программой (планом) научных исследований ОИ (при наличии)**

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. В формате pdf, до 3 Мб.

Перечень основных направлений научных исследований, выполняемых на ОИ (при наличии, объемом не более 2 стр.)

- Полногеномные ассоциативные исследования с применением всех видов микроматриц производства Иллюмина
- Секвенирование и сборка геномов и транскриптомов де ново любых организмов с комбинацией методов массового параллельного секвенирования короткими чтениями и длинных чтений, получаемых по технологии Nanopore.
- Проведение всего спектра одноклеточных исследований на платформе 10x (иммуногенетика, тарскриптомика,

анализ состояния хроматина)

- Исследования анализа экспрессии всех видов РНК (малые, мРНК, длинные некодирующие и т.д) при помощи массового параллельного секвенирования.

Перечень конкретных научно-технических задач, решаемых на ОИ (при наличии, объемом не более 2 стр.)

Собственные исследования, проводимые ЦКП относятся к области неинвазивной диагностики генетических нарушений плода по крови беременной женщины. В частности, при сочетании методики обогащения образцов целевыми последовательностями с технологией массового параллельного секвенирования для предсказания генетики плода. Несмотря на то, что на сегодняшний день уже было опробовано много различных подходов для решения данной задачи, таких как применение технологии секвенирования без обогащения образцов, анализ профиля метилирования ДНК, реализуемый подход Геноаналитики – первая известная попытка уменьшить сложность секвенирования, параллельно увеличивая точность анализа. В сравнении с существующими тестами, разрабатываемый метод анализа одновременно абсолютно безопасный для сохранения беременности и высокоточный для постановки диагноза.

Файл со сведениями, носящими информационный характер, об иных проектах, реализуемых на базе ОИ и финансируемых из иных источников (бюджетных и внебюджетных), и/или выполняемых в рамках международных коллабораций (при наличии)

С графиками, фотографиями, рисунками и иной информацией о содержании проекта. В формате pdf, до 3 Мб.

***** Представляемые сведения носят информационный характер.

1.8. Сведения об организации, на базе которой работает ОИ

Полное наименование (приводится в соответствии с регистрационными документами):

Закрытое акционерное общество "Геноаналитика"

Сокращенное наименование:

ЗАО "Геноаналитика"

Наименование на английском языке:

Genoanalytica

Организационно-правовая форма (указывается по ОКОПФ):

Непубличные акционерные общества

Форма собственности (указывается по ОКФС):

Частная собственность

Ведомственная принадлежность:

ИНН, КПП, ОГРН, ОКТМО:

7709831632, 772901001, 1097746343331, 45325000

Адрес:

119234, Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.77, помещение I

Фактический адрес:

119234, Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.77, офис 102

Субъект Российской Федерации:

г Москва

Должность, фамилия, имя, отчество (при наличии) руководителя организации:

генеральный директор, Ахтителънова Юлия Александровна

Контактный телефон:

+74959308353, +74956205870

Электронный адрес (E-mail):

info@genoanalytica.ru

Закрытое акционерное общество "Геноаналитика" (ЗАО "Геноаналитика"), владелец Объекта инфраструктуры ЦКП "Геноаналитика" (ЦКП «Геноаналитика»), сообщает о своем обязательстве подписать соответствующее грантовое соглашение и предоставить необходимую инфраструктуру и оборудование для выполнения проекта **«Увеличение эффективности гомологичной репарации при геномном редактировании»** (руководитель проекта **Лавров Александр Вячеславович**) (далее – Проект) в случае его победы в открытом публичном конкурсе на получение грантов Российского научного фонда по мероприятию «Проведение исследований на базе существующей научной инфраструктуры мирового уровня» Президентской программы исследовательских проектов, реализуемых ведущими учеными, в том числе молодыми учеными.

Мы подтверждаем, что нам понятно содержание пунктов 9 и 31 конкурсной документации.

Мы подтверждаем, что нам понятен перечень работ (услуг), которые наш ОИ предоставит в целях реализации Проекта, и что ОИ способен выполнить указанные работы (предоставить услуги) в согласованных с руководителем Проекта объемах и сроках на условиях настоящей конкурсной документации.

Мы согласны, что права на результаты интеллектуальной деятельности, созданные при выполнении проекта, принадлежат исполнителям этого проекта. Российская Федерация может использовать для государственных нужд результаты интеллектуальной деятельности, созданные при выполнении проекта, на условиях безвозмездной простой (неисключительной) лицензии, предоставленной правообладателем государственному заказчику, с выплатой государственным заказчиком вознаграждения авторам результатов интеллектуальной деятельности.

Мы согласны, в случае необходимости, внести изменения в регламент доступа к оборудованию ОИ, исключающие дополнительный отбор для победителей настоящего конкурса Фонда.

Подпись руководителя организации, на базе которой работает ОИ (уполномоченного представителя, действующего на основании доверенности или распорядительного документа), **печать** (при ее наличии) **организации.**

В случае подписания формы уполномоченным представителем организации (в т.ч. – руководителем филиала) к печатному экземпляру заявки прилагается копия распорядительного документа или доверенности, заверенная печатью организации.

_____/_____
М.П.