

*Школа-конференция «Генетическая модификация и анализ генома клеток»  
31 октября – 1 ноября, ИБР РАН*



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН**



**Тезисы  
Школы-конференции  
«Генетическая модификация  
и анализ генома клеток»  
31 октября – 1 ноября 2024 г.**

Проведение Школы-конференции поддержано  
Министерством науки и высшего образования РФ,  
соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021

# Оглавление

<b>Программа .....</b>	<b>5</b>
<b>Организационный и программный комитеты.....</b>	<b>7</b>
<b>Культивирование срезов ткани легких мыши</b>	
А.А. Воложинская, И.А. Говорова, Ю.А. Новикова, С.Ю. Никиточкина, Е.А. Воротеляк.....	<b>8</b>
<b>Флуоресцентная визуализация экспрессии генов методом гибридной цепной реакции: как начать и что можно получить</b>	
Е.Е. Воронежская.....	<b>9</b>
<b>Перспективы использования генетически охарактеризованного биоматериала человека в репродукции</b>	
А.С. Глотов, Ю.А. Насыхова.....	<b>10</b>
<b>Биоинформатический анализ белков ядра и хроматина клеток человека: локализации, функции, свойства</b>	
А.К. Грибкова, А.К. Шайтан.....	<b>11</b>
<b>Специализированная роль белка Dm nxf1 в индивидуальном развитии <i>Drosophila melanogaster</i></b>	
Д.М. Грудкова, Е.В. Голубкова, М.А. Кулакова.....	<b>12</b>
<b>Современные методы пространственной транскриптомики в биологии развития</b>	
Е.Г. Ивашкин.....	<b>13</b>
<b>Модуляция сигнального каскада YAP/TAZ путем генетической модификации и применения ингибиторов-малых молекул</b>	
Е.П. Калабушева, О.Л. Черкашина, Е.А. Бутова, Д.С. Аболин, О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк.....	<b>14</b>
<b>Характеризация клеточной линии CHO 4BGD с гомозиготными нокаутами генов <i>BAK1</i>, <i>BAX</i>, <i>DHFR</i>, <i>GLUL</i> при помощи полногеномного секвенирования</b>	
Д.Э. Колесов, Н.А. Орлова, М.В. Синегубова, И.И. Воробьев.....	<b>15</b>
<b>Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки от пациента с остеопорозом с однонуклеотидным полиморфизмом Arg16 в гене бета-2-адренергического рецептора</b>	
О.А. Краснова, А.А. Ковалева, Ю.В. Сопова, П.И. Семенова, И.Э. Неганова.....	<b>16</b>
<b>Подходы к созданию высокоиммуногенных персонализированных онковакцин</b>	
М.А. Лагарькова.....	<b>17</b>

<b>In vitro модели дифференцировки макрофагов человека с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток</b>	
И.В. Лядова, О.Н. Шевелева, Е.А. Протасова, Е.В. Григорьева, С.П. Медведев.....	17
<b>Материнские транскрипты генов ANTP в ооцитах <i>Platynereis dumerilii</i></b>	
Р.И. Муллахметов, М.А. Кулакова, Г.П. Маслаков.....	19
<b>Генная терапия эпилепсии с использованием кальций-активируемых калиевых каналов</b>	
Е.С. Никитин.....	20
<b>Сигнальный путь YAP/TAZ при моделировании развития кожи человека с использованием ИПСК</b>	
М.Д. Панкратова, А.А. Рябинин, Е.П. Калабушева, З.Р. Стариннов, Е.А. Воротеляк.....	21
<b>Перспективы генетического репрограммирования ретинального пигментного эпителия у млекопитающих и человека для науки и медицины</b>	
Л.А. Ржанова, М.А. Александрова.....	22
<b>Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток макака-резуса (<i>Macaca mulatta</i>) путем репрограммирования мультипотентных стволовых клеток жировой ткани</b>	
А.С. Рябченко, В.К. Абдыев, Е.А. Воротеляк.....	23
<b>Влияние серотонина на активность транскрибируемых регуляторных элементов в процессе эмбрионального развития гипоталамуса</b>	
М.С. Сабиров, А.Н. Гайнуллина, Е.А. Чикина, В.И. Мельникова, Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, Е.Е. Воронежская, Р.А. Романов.....	24
<b>Развитие технологий исследования ДНК клеток доимплантационных эмбрионов</b>	
А.Ф. Сайфитдинова.....	25
<b>Редактирование сложной гетерозиготной мутации методом CRISPR/Cas9 в гене кальцечувствительного рецептора в культуре индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека</b>	
П.И. Семенова, А.В. Панова, Ю.В. Сопова, О.А. Краснова, А.А. Ковалева, И.Э. Неганова.....	26
<b>Неожиданный урок ошибки скрещивания: эмбрионально летальные в гомозиготе мутации гена <i>Flnс</i> успешно компенсируют друг друга</b>	
Ю.Ю. Силаева.....	27
<b>Эффективность клеточного репрограммирования зависит от активности иммунопротеасом</b>	
А.С. Цимоха, А.В. Кузнецов, И.В. Зубарев, А.Р. Газизова, А.В. Селенина, С.В. Пономарцев, А.Н. Томилин.....	27

**Определение *in situ* общегеномного содержания H3K27me2 - эпигенетического маркера транскрипционно-неактивного хроматина в предимплантационных зародышах мыши, культивируемых *in vitro* в присутствии бисфенола а и лактоферрина**

Л.А. Чельшева, Е.М. Нониашвили, Е.Л. Паткин.....29

**Связь активности YAP с паттерном пролиферации кератиноцитов в коже человека**

О.Л. Черкашина, А.А. Цитрина, Д.С. Аболин, А.В. Косых, Е.А. Воротеляк,  
Е.П. Калабушева.....30

**От понимания структуры и динамики хроматина к разработке методов эпигенетической инженерии на основе dCas-белков**

А.К. Шайтан.....31

**Генетические подходы к моделированию оверэкспрессии различных генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и получение генномодифицированных макрофагов человека**

О.Н. Шевелева, Н.Н. Буторина, В.И. Кузьяева, С.П. Медведев, Е.А. Протасова,  
И.В. Лядова.....32

**Изучение неспецифического взаимодействия SpCas9 с ДНК при помощи методов молекулярной динамики**

В.А. Яковлев, Н.В. Кристовский, Г.А. Армеев, А.К. Шайтан.....33

**Школа-конференция «Генетическая модификация и анализ генома клеток»**

<b>31 октября</b>	
9:00-10:00	Регистрация участников <b>ПРЕДСЕДАТЕЛИ</b> Е.А. Воротеляк / Г.В. Павлова
	Открытие конференции «Генетика и индивидуальное развитие»
10:00-10:30	<b>М.А. Лагарькова, ФНКЦ ФХМ, МГУ</b> Подходы к созданию высокоиммуногенных персонализированных онковакцин
10:30-11:00	<b>А.К. Шайтан, МГУ</b> От понимания структуры и динамики хроматина к разработке методов эпигенетической инженерии на основе dCas-белков
11:00-11:30	<b>Y. Vassetzky, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France</b> Targeted modification of 3D genome organization
11:30-12:00	<b>A. Schwager (Карпукхина), Institut Curie, Paris, France</b> From 3D organization to therapy of mantle cell lymphoma
12:00-12:15	<b>Кофе-брейк / Постерная сессия</b>
12:15-12:40	<b>Г.В. Павлова, ИВНД и НФ РАН</b> Молекулярно-генетические аспекты дифференцировочной терапии глиомы человека
12:40-13:05	<b>Е.С. Никитин, ИВНД и НФ РАН</b> Генная терапия эпилепсии с использованием кальций-активируемых калиевых каналов
13:05-13:35	<b>И.В. Лядова, ИБР РАН</b> In vitro модели дифференцировки макрофагов человека с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток
13:25-13:40	<b>Е.Е. Воронежская, ИБР РАН</b> Флуоресцентная визуализация экспрессии генов методом гибридизационной цепной реакции: как начать и что можно получить
13:40-14:10	<b>Обед</b>
	<b>ПРЕДСЕДАТЕЛИ</b> И.В. Лядова / А.С. Цимоха
14:10-14:40	<b>Р.А. Романов, ИБР РАН</b> Может ли материнский стресс изменить молекулярно-клеточную организацию мозга потомства
14:40-14:55	<b>Ю.А. Насыхова, НИИ АГиР им. Д.О.Отта</b> Перспективы использования генетически охарактеризованного биоматериала человека в репродукции
14:55-15:10	<b>А.Ф. Сайфитдинова, РГПУ, СПбГУ</b> Развитие технологий исследования ДНК клеток доимплантационных эмбрионов
15:10-15:25	<b>Е.П. Калабушева, ИБР РАН</b> Модуляция сигнального каскада YAP/TAZ путем генетической модификации и применения ингибиторов – малых молекул
15:25-15:40	<b>М.С. Сабиров, ИБР РАН</b> Влияние серотонина на активность транскрибируемых регуляторных элементов в процессе эмбрионального развития гипоталамуса
15:40-15:50	<b>А.О. Травина, ИНЦ РАН</b> Транскрипция тандемных повторов в гаметогенезе земноводных
15:50-16:00	<b>Кофе-брейк</b>
16:00-16:25	<b>А.С. Цимоха, ИНЦ РАН</b> Эффективность клеточного репрограммирования зависит от активности иммунопротеасом
16:25-16:50	<b>П.И. Семенова, ИНЦ РАН</b> Редактирование сложной гетерозиготной мутации методом CRISPR/Cas9 в гене кальцечувствительного рецептора в культуре индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека
16:50-17:15	<b>Е.Г. Ивашкин, ИПЭЭ</b> Современные методы пространственной транскриптомики в биологии развития
17:15-17:40	<b>Ю.Ю. Силаева, ИБГ РАН</b> Неожиданный урок ошибки скрещивания: эмбрионально летальные в гомозиготе мутации гена <i>Flnс</i> успешно компенсируют друг друга"
17:40-18:10	<b>Подведение итогов молодежного конкурса (стендовых докладов) и награждение победителей</b>

Школа-конференция «Генетическая модификация и анализ генома клеток»

1 ноября

ПРОВЕДЕНИЕ МАСТЕР-КЛАССОВ

10:00-13:00	<b>М.С. Сабилов, ИБР РАН</b> Введение в анализ данных секвенирования РНК индивидуальных клеток
	ИЛИ
11:00-11:30	<b>Кофе-брейк</b>
11:30-13:00	<b>В. Гасанов, ИБР РАН</b> Модификация клеток прокариот, получение штаммов-продуцентов, оценка уровня экспрессии рекомбинантного белка
13:00-14:00	<b>Обед</b>
14:00-16:00	<b>Е.Е. Воронежская, Е.Г. Ивашкин, ИБР РАН</b> Выявление результатов в реакции НСР в тканях с помощью конфокального микроскопа
	ИЛИ
14:00-16:00	<b>О.Л. Черкашина, ИБР РАН</b> Генетическая модификация клеток эукариот: липофекция, сборка вирусных частиц, трансдукция
16:00-16:10	<b>Кофе-брейк</b>
16:10-17:30	<b>А.А. Рябинин, В.К. Абдыев, ИБР РАН</b> Индукция плюрипотентных стволовых клеток человека: методы культивирования, состояние плюрипотентности, фундаментальное и прикладное значение
17:30	<b>Завершение конференции</b>

## Программный комитет Школы-конференции

**Васильев А.В.,**

чл.-корр. РАН, д.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
Кафедра эмбриологии Биологического факультета  
Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова

**Воротеляк Е.А.,**

член-корр. РАН, д.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Васецкий Е.С.**

д.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,  
Институт Гюстава Русси,  
Национальный центр научных исследований,  
Вильжюиф, Франция

**Калмыкова А.И.**

д.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Томилин А.Н.**

чл.-корр. РАН, д.б.н.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

**Захаров И.С.**

д.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

## Организационный комитет Школы-конференции

**Хабарова М.Ю.**

к.б.н., доцент

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Волина Е.В.**

к.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Черкашина О.Л.**

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Моргун Е.И.**

к.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Алёшина Н.М.,**

к.б.н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Антипов М.А.**

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

### Культивирование срезов ткани легких мыши

А.А. Воложинская\*<sup>1</sup>, И.А. Говорова<sup>2</sup>, Ю.А. Новикова<sup>2</sup>, С.Ю. Никиточкина<sup>2</sup>,  
Е.А. Воротеляк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* *kashigina-sasha1@mail.ru*

Легкие млекопитающих представляют собой сложноорганизованную структуру, моделирование которой является непростой задачей. Одним из доступных методов для исследования структуры легких, морфогенеза и механизмов межклеточного взаимодействия в тканях легких является органотипическое культивирование срезов легких – precision-cut lung slices (PCLS) (Wu, X. et al., 2019). Данный метод представляет особый интерес в контексте исследования регенерации ткани, в частности для изучения механизмов дифференциации клеток-предшественников – альвеолоцитов 2го типа (AT2). На модели органоидов легких показано, что одним из ключевых факторов, влияющих на дифференцировку AT2 клеток, является Hippo сигнальный путь и его транскрипционный ко-фактор YAP (Goskey et al., 2021). Однако, органоидная модель, не смотря на высокую биологическую релевантность реальному органу, не отображает полностью структурные особенности легких. В связи с этим, актуальной задачей представляется исследование модуляции YAP сигналинга и его влияние на клетки-предшественники на модели PCLS.

Для достижения поставленной задачи был отработан протокол культивирования PCLS мыши в течение 48-72 ч. В работе были использованы половозрелые мыши C57Bl6. Животные были анестезированы авертином. Без предварительной перфузии, при постоянном подогреве животного (до +37°C), легкие интратрахеально были заполнены раствором низкоплавкой агарозы (1,5 мл). После извлечения, легкие, заполненные агарозой, были помещены в лед и хранились 20 мин при температуре +4°C. Далее, доли легкого были нарезаны толщиной 400 мкм на вибрирующем микротоме при +4°C. После чего срезы, промытые в растворе Хэнкс с антибиотиком и антимикотиком (4р x 30 мин), культивировались в бессывороточной среде в 12-луночном плато.

Для оценки жизнеспособности культивируемых PCLS срезов был выполнен колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест). Было продемонстрировано, что PCLS, культивируемые в контрольной среде сохраняют структуру и жизнеспособность в течение минимум 48 ч. Показано, что применяемый протокол удовлетворяет требованиям эксперимента и будет использован в дальнейшем для исследования влияния YAP сигналинга на процессы дифференцировки клеток-предшественников на модели PCLS.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74- 30015).*

Устный доклад

**Флуоресцентная визуализация экспрессии генов методом гибридной цепной реакции: как начать и что можно получить**

Е.Е. Воронежская\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* *elena.voronezhskaya@idbras.ru*

Генетические технологии прочно вошли в нашу жизнь и применяются в различных областях науки и медицины. Непрерывно растущий массив данных генетического секвенирования позволяет детально исследовать процессы видообразования и филогенетических отношений, маркировать индивидуальные особенности ценных промысловых животных, выявлять предрасположенность к заболеваниям. Вместе с растущим массивом количественных данных по экспрессии определенных генов, разрабатываются также подходы к визуализации их продуктов (мРНК) в тканях. Одним из современных методов такой визуализации является флуоресцентная детекция мРНК на основе гибридной цепной реакции (HCR). В докладе будет дано базовое представление о методике HCR, представлены начальные этапы работы с использованием данного метода, на собственных препаратах показано отличие HCR от классической *in situ* гибридизации. На примере анализа экспрессии генов семейства *Sox* у пресноводного моллюска большого прудовика будут продемонстрированы неожиданные черты раннего нейрогенеза брюхоногих моллюсков.

*Автор благодарит всех коллег, вместе с которыми проводилась отработка методики и оригинальные исследования. Работа по анализу экспрессии генов семейства Sox выполнена в рамках реализации гранта РФФ № 22-14-00375.*

## Перспективы использования генетически охарактеризованного биоматериала человека в репродукции

А.С. Глотов\*<sup>1,2</sup>, Ю.А. Насыхова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\* [anglotov@mail.ru](mailto:anglotov@mail.ru)

Значение генетических исследований в репродукции человека возрастает год от года. Во-первых, это связано с тем, что основные причины глобальных проблем воспроизводства человека в настоящем и будущем (отложенное деторождение, рост частоты соматических заболеваний будущих родителей, усиление негативного антропогенного влияния на окружающую среду) связаны с высокой частотой бесплодия или невынашивания беременности, увеличением числа вспомогательных репродуктивных процедур, увеличением числа тяжёлых осложнений беременности, материнской и младенческой смертностью. Во-вторых, ежемесячно растёт число наследственных заболеваний, которое уже приближается к 10 тыс. В-третьих, частой причиной прерывания беременности или развития врожденных пороков развития (ВПР) плода (которые сегодня занимают ведущее место среди генетической патологии - 36,5 на 1000 новорожденных) являются генетические заболевания. Для снижения риска репродуктивных потерь используют различные генетические технологии на всех этапах воспроизводства человека.

Биобанкирование в репродукции необходимо для решения задач в двух основных направлениях. С одной стороны, специалисты ведут сбор уникального биоматериала для биомедицинских задач, затрагивающих непосредственно этапы воспроизводства человека, с другой стороны - берут биообразцы для выполнения генетических исследований. В первом случае цели использования образцов могут быть разные, но они не обязательно будут связаны с генетическим компонентом. Во втором случае задачи применения биобанкирования фокусируются на использовании образцов для решения как индивидуальных задач конкретной семьи, так и общих вопросов в рамках генетических исследований. Например, при выполнении генетических методов обследования сохраняют следующий биоматериал донора: цельную кровь, плазму, лейкоцитарную пленку, ДНК, РНК. Данный материал может быть использован как для самого пациента в будущем при проведении уточняющих генетических исследований, так и для поиска новых биомаркеров того заболевания, которым обладает пациент. В ряде случаев редкие образцы пациентов служат в качестве материала для разработки новых диагностических тест-систем или поиска новых таргетных мишеней.

Для реализации указанных целей в 2021 г была организована БРК «Репродуктивное здоровье человека», которая включает уникальные биологические образцы от пациентов с многофакторными и моногенными наследственными заболеваниями, значимыми для репродукции, а также образцы контрольной выборки. Данная коллекция включает более 65 тыс. образцов и оформлена в качестве уникальной научной установки (USU\_3076082). Коллекционный фонд УНУ формируется организациями, входящими в состав Сетевого Центра - НИИ АГиР им. Д.О. Отта (г. Санкт-Петербург), МГНЦ (г. Москва) и Сургутский государственный университет (г. Сургут). >>

*Исследование проведено при поддержке Проекта № 15.BRK.21.008 «Многоцентровая исследовательская биоресурсная коллекция «Репродуктивное здоровье человека» (соглашение № 075-15-2021-1058 от 28. 09. 2021), финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ.*

---

*Стендовый доклад*

**Биоинформатический анализ белков ядра и хроматина клеток человека:  
локализации, функции, свойства**

А.К. Грибкова\*<sup>1</sup>, А.К. Шайтан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* *akgribkova@gmail.com*

Хроматин — это комплекс ДНК, РНК и белков в ядрах эукариотических клеток. Белки хроматина осуществляют важнейшие молекулярно-биологические процессы, такие как транскрипция, репарация ДНК, а также участвуют в организации трехмерной структуры генома, разделении жидкостных фаз и регуляции эпигенетических процессов. Несмотря на значительный прогресс в изучении отдельных белков хроматина, полное представление о качественном и количественном составе белков хроматина, то есть хроматома, не лишено пробелов.

В рамках данной работы были систематизированы источники информации о ядерных белках клеток человека. Была предложена упрощенная классификация белков хроматина на основе биологических функций, молекулярных процессов, геномной локализации и физико-химических свойств. Путем сравнительного анализа белков хроматина, ядра и цитоплазмы мы выявили особенности этих фракций по ряду параметров (длины белков, упорядоченные и неупорядоченные регионы, распределение зарядов, аминокислотный состав). Также в результате работы были найдены отличительные признаки функциональных групп белков хроматина с точки зрения их физико-химических свойств и с учетом представленности в клетках человека.

Полученные результаты способствуют углублению знаний об особенностях белкового состава ядра и хроматина клеток человека, а также о механизмах функционирования хроматина. Результаты могут стать основой для разработки новых подходов для изучения и регуляции молекулярных процессов, затрагивающих геном и эпигеном.

*Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-30003.*

**Специализированная роль белка Dm nxf1 в индивидуальном развитии  
*Drosophila melanogaster***

Д.М. Грудкова\*<sup>1</sup>, Е.В. Голубкова<sup>1</sup>, М.А. Кулакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\* *dashka.gru@mail.ru*

Транспорт мРНК – важнейший этап в регуляции экспрессии генов, неразрывно связанный с локализованной транскрипцией, важнейшими механизмами дифференциации клеток, процессами нейрогенеза, формированием и развитием организма на ранних этапах эмбриогенеза. Так, ген *Dm nxf1 Drosophila melanogaster* отвечает за ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК. Кроме того, белок NXF1, будучи связан с определенными мРНК, обеспечивает локальную трансляцию белка в клетках мозга, участвует в формировании внутренней структуры его отделов и построении их границ. Ко всему прочему, ген имеет органно-специфичный транскрипт с невырезанным интроном, содержащим преждевременный стоп-кодон и консервативные последовательности, которые позволяют избежать NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay), а также с интрон-содержащего транскрипта транслируется укороченный белок. На этом основании мы делаем предположение о функциональной значимости транскрипта с невырезанным интроном.

Так как ген жизненно необходим и экспрессируется в нервных клетках и в ранних синцитиальных эмбрионах дрозофилы, мы предполагаем, что: 1) нарушение поведения мутантных по гену *Dm nxf1* мух связано со специализированной ролью белка в индивидуальном развитии дрозофилы; 2) доминантно-негативный эффект мутантных аллелей может быть обусловлен изменениями в транскриптах и их локализации и, как следствие, нарушением нормальной функции белка.

Для проверки гипотезы мы изучаем влияние мутации в конкретном гене у самок и самцов, содержащих ранее неизученные мутации *sbr5* и *sbr1* (*sbr* – small bristles – исторически сложившееся название гена *Dm nxf1*) на поведение мух, сопоставляя с функцией мутантного белка. Проводим анализ продолжительности жизни и тест на отрицательный геотаксис для выявления нарушений в локомоторной активности мух, чтобы доказать специализированную роль белка в нервной системе *Drosophila melanogaster*. Для установления локализации интрон-содержащего транскрипта в ранних эмбрионах дрозофилы используем метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization).

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ (ID Pure 115624290).

## Современные методы пространственной транскриптомики в биологии развития

Е.Г. Ивашкин\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

\* [evgeny.g.ivashkin@sev-in.ru](mailto:evgeny.g.ivashkin@sev-in.ru)

Пространственная транскриптомика представляет собой комплекс подходов, позволяющий изучать экспрессию генов с учетом их точного пространственного расположения в клетках и тканях. Эти методы находят широкое применение в биологии развития, где особенно важно понимать, как гены регулируются и экспрессируются в различных частях организма в процессе его развития. Традиционная *in situ* гибридизация позволяет локализовать конкретные РНК-молекулы в клетках и тканях с высоким пространственным разрешением, что важно для изучения молекулярных механизмов дифференциации и морфогенеза.

Современные технологии, такие как гибридизация *in situ* с использованием каскадной амплификации сигнала (HCR, гибридизационная цепная реакция), значительно улучшают чувствительность и точность детекции РНК в сложных тканевых структурах. Эти методы позволяют исследователям не только обнаруживать, но и количественно оценивать экспрессию генов на уровне отдельных клеток.

Секвенирование РНК с пространственным разрешением, такое как Slide-seq и Spatial Transcriptomics, предоставляет возможность создания детализированных карт экспрессии генов на срезах тканей. Эти подходы основаны на использовании микрочастиц или других носителей, которые фиксируют и локализуют РНК перед ее последующим секвенированием.

Использование меток на основе нуклеиновых кислот, таких как Barcoded Oligonucleotide Probes, позволяет значительно увеличить многопробный анализ геной активности в сложных тканевых системах, что особенно важно для изучения динамики геной регуляции в процессе развития организмов.

Пространственная транскриптомика открывает новые перспективы для биологии развития, позволяя интегрировать данные о геной экспрессии с анатомической структурой тканей и морфологическим развитием организмов. Эти методы играют важную роль в понимании ключевых молекулярных процессов, лежащих в основе формирования и функционирования живых систем.

Устный доклад

**Модуляция сигнального каскада YAP/TAZ путем генетической модификации и применения ингибиторов-малых молекул**

Е.П. Калабушева\*<sup>1</sup>, О.Л. Черкашина<sup>1</sup>, Е.А. Бутова<sup>1</sup>, Д.С. Аболин<sup>1</sup>, О.С. Роговая<sup>1</sup>,  
Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* *kalabusheva.e@gmail.com*

Каскад YAP/TAZ в коже человека вовлечен в сигнальную сеть, управляющую физиологической и репаративной регенерацией. В гомеостазе эпидермиса он контролирует интенсивность пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, в ходе ранозаживления управляет процессом эпителио-мезенхимного перехода, миграцией клеток и формированием рубца. Ингибиторы и активаторы YAP/TAZ являются перспективными препаратами для коррекции нарушений механизмов ранозаживления.

В работе применяли ингибиторы сигнального каскада YAP/TAZ: вертепорфин (VP) и пептид 17 (P17). Оба ингибитора разрывают связь YAP и TAZ с ассоциированными транскрипционными факторами семейства TEAD. В качестве активатора использовали ингибитор киназы LATS (LATSi), участвующей в формировании комплекса деградации белка YAP. Анализ экспрессии YAP и TAZ в культуре первичных кератиноцитов человека после воздействия исследуемых веществ показал обратную зависимость: при добавлении VP и P17 мы наблюдали увеличение экспрессии этих белков, в то время как обработка LATSi приводила к снижению. Отмечали падение экспрессии маркеров дифференцировки – кератин 1 и 10 как при применении ингибиторов, так и активатора YAP/TAZ. Добавление LATSi повышало экспрессию кератина 5, типичного для низкодифференцированного состояния кератиноцитов.

Далее сигнальный каскад инактивировали за счет генетической модификации. В работе использовали линию с нокаутом TAZ, полученную с применением технологии CRISPR/Cas9, и нокаутном YAP, полученную с применением shRNA. Подавление экспрессии верифицировали методами количественного ПЦР-анализа и вестерн-блоттинга. Для линий ΔTAZ и shYAP было выявлено повышение экспрессии маркеров дифференцировки и снижение экспрессии маркеров базального слоя, однако для клеток ΔTAZshYAP эффект был менее выраженным и не имел статистической значимости. Таким образом, генетически-опосредованное ингибирование YAP или TAZ стимулирует дифференцировку эпидермальных кератиноцитов, однако подавление сразу двух белков вероятно приводит к активации компенсаторных механизмов. Аналогичные механизмы могут объяснять эффекты, оказываемые VP и P17. В то же время LATSi снижает интенсивность дифференцировки, активируя каскад YAP/TAZ, что логично дополняет результаты экспериментов с генетической модификацией.

Полученные данные указывают на взаимодополняющую роль паралога YAP и TAZ в контроле процессов эпидермальной дифференцировки и необходимость изучения компенсаторных механизмов, запускаемых при подавлении их экспрессии.

*Исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение №075-15-2024-539 от 24 апреля 2024 года).*

**Характеризация клеточной линии CHO 4BGD с гомозиготными нокаутами генов *BAK1*, *VAX*, *DHFR*, *GLUL* при помощи полногеномного секвенирования**

Д.Э. Колесов\*<sup>1</sup>, Н.А. Орлова<sup>1</sup>, М.В. Синегубова<sup>1</sup>, И.И. Воробьев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, Россия

\* 52ru111@mail.ru

В случае редактирования генетически нестабильных иммортализованных клеточных линий, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO), особенно остро стоит проблема обнаружения событий нецелевой активности Cas9. В данной работе мы представляем результаты анализа данных полногеномного секвенирования отредактированной клеточной линии CHO 4BGD. Было показано, что даже относительно низкое покрытие (10x) позволяет исследовать инактивацию обоих аллелей в геноме, а также нецелевые эффекты.

Ранее в лаборатории, при помощи двух последовательных раундов редактирования клеток CHO S, была получена клеточная линия CHO 4BGD, не содержащая активных аллелей проапоптотических генов *Bak1* и *Vax*, а также генов метаболических селекционных маркеров: дигидрофолатредуктазы (DHFR) и глутаминсинтетазы (GS), и содержащая дополнительные копии генов антиапоптотического белка Bcl-2 и индуктора макроаутофагии Beclin-1. Для полученной клеточной линии было экспериментально показано статистически значимое увеличение времени культивирования в режиме fed-batch и накопления целевого продукта (мкАт IgG1) по сравнению с контрольной линией CHO S.

Для выравнивания парноконцевых прочтений при помощи алгоритма BWA mem была использована сборка CriGri-PICRH-1.0 (Genbank GCF\_000419365.1), куда в качестве дополнительных контигов были добавлены последовательности 4 плазмид, кодирующих белки Bcl-2, Beclin-1, Cas9 и гРНК, а также геном *E. coli* strain TOP10 (GCA\_019599065.1). События редактирования были подтверждены для каждой из 5 использованных направляющих РНК; при помощи перекрывающихся прочтений были охарактеризованы события замен, делеций и вставки чужеродной ДНК, которые относились либо к геному *E. Coli*-TOP10, либо к плазмиде, кодирующей Cas9. Кроме того, при помощи алгоритма на основе CRISPR RGEN и набора утилит Vedtools и Vcftools были рассмотрены все локусы в геноме, в которых гРНК имели гомологию не менее 16 нуклеотидов из 20, а следующие 3 нуклеотида соответствовали приемлемому PAM-сайту нуклеазы Cas9. Всего в геноме CHO обнаружено 468 локусов для пяти гРНК (из них 411 с покрытием более 5x) и 14 потенциальных сайтов нецелевого разрезания нуклеазы Cas9. Согласно аннотации к геному CriGri-PICRH-1.0 все предполагаемые нецелевые эффекты относятся к межгенным областям и ни один ген не содержал мутаций в ОРС в результате редактирования. Дополнительно были подтверждены события вставки в геном CHO и определена копияность двух плазмид, кодирующих белки Bcl-2 и Beclin-1.

**Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки от пациента с  
остеопорозом с однонуклеотидным полиморфизмом Arg16  
в гене бета-2-адренергического рецептора**

О.А. Краснова\*<sup>1</sup>, А.А. Ковалева<sup>1</sup>, Ю.В. Сопова<sup>1</sup>, П.И. Семенова<sup>1</sup>, И.Э. Неганова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

\* [o.krasnova@incras.ru](mailto:o.krasnova@incras.ru)

Костное ремоделирование представляет собой сложный процесс, включающий резорбцию и формирование костной ткани, осуществляемое остеокластами и остеобластами соответственно. Нарушение баланса между этими процессами может привести к различным костным заболеваниям, включая остеопороз, который имеет мультифакторную природу возникновения. Для понимания механизмов прогрессии остеопороза в различных случаях необходимо создание *in vitro* модели, использующей остеобласты и остеокласты от конкретного пациента. Применение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) позволит создать *in vitro* модель остеопороза и изучить влияние отдельных факторов на его патогенез.

Целью данного исследования являлось получение линии иПСК от пациента с остеопорозом с полиморфизмом 46A (Arg16) в гене бета-2-адренергического рецептора (*ADRB2*) и редактирование полиморфизма с помощью CRISPR/Cas9.

Первичную линию мезенхимных стволовых клеток трансдуцировали с помощью вируса Сендай для запуска эктопической экспрессии генов *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-MYC*. Оценку экспрессии маркеров плюрипотентности у полученных иПСК осуществляли с помощью методов ПЦР, проточной цитометрии и иммунофлуоресцентного анализа. Генетическое редактирование осуществляли с помощью трансфекции иПСК смесью плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP-ADRB2 и донорного нуклеотида. В результате исследования были получены иПСК от пациента с остеопорозом с 46A в гене *ADRB2*. ИПСК имеют нормальный кариотип, характеризуются экспрессией *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *DPPA4* на уровне гена и белка и положительно окрашиваются на TRA-1-60. Более того, полученные иПСК способны формировать эмбриоидные тела и дифференцировать в направлении предшественников трех зародышевых листков, что подтверждается экспрессией маркеров экто-, эндо- и мезодермы на уровне генов и белков.

Далее, в результате генетического редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9 были получены и охарактеризованы клоны иПСК с заменой 46G приводящей к замене Arg16Gly.

Таким образом, полученная пациент-специфическая линия иПСК может быть использована для создания клеточной модели для изучения влияния однонуклеотидного полиморфизма Arg16 в гене *ADRB2* в патогенезе остеопороза.

Данная работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

Устный доклад

## Подходы к созданию высокоиммуногенных персонализированных онковакцин

М.А. Лагарькова\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* *maryalag@yahoo.com*

Иммунологический контроль опухоли является перспективным подходом к терапии злокачественных заболеваний, устойчивых к обычной терапии. Опухолевые клетки за счет соматического мутационного процесса накапливают мутации. Некоторые из этих мутаций ведут к изменению в последовательности белков, синтезирующихся в опухоли. Фрагменты таких белков в составе молекул главного комплекса гистосовместимости ГКГ (неоантигены) делают опухоль узнаваемой для Т-лимфоцитов, которые могут уничтожить опухолевые клоны. Это свойство иммунной системы открывает перспективы использования различных вариантов иммунотерапии: введения пациенту химически синтезированных неоантигенных пептидов, ДНК или РНК, кодирующих опухолевые неоантигены; введения пациенту обогащенных неоантиген-специфичными клонами Т лимфоцитов. Доклад посвящен разработке технологий идентификации, валидации неоантигенов для нескольких типов рака и оптимизации средств их доставки

---

Устный доклад

## ***In vitro* модели дифференцировки макрофагов человека с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток**

И.В. Лядова\*<sup>1,2</sup>, О.Н. Шевелева<sup>1</sup>, Е.А. Протасова<sup>1</sup>, Е.В. Григорьева<sup>3</sup>, С.П. Медведев<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН,  
Новосибирск, Россия

\* *ivlyadova@mail.ru*

Макрофаги представляют собой клетки врожденного иммунитета, локализованные в тканях и выполняющие функции поддержания гомеостаза организма. Тканерезидентные макрофаги образуются в эмбриогенезе на стадиях примитивного и раннего дефинитивного гемопоэза, отличающегося от постнатального костномозгового кроветворения, и в дальнейшем поддерживаются за счет самообновления. В постнатальном периоде в ряде тканей и в условиях воспаления пул тканерезидентных макрофагов дополняется макрофагами, образованными из моноцитов крови после миграции последних из крови в ткани. Моделирование процесса генерации макрофагов представляет интерес как с точки зрения изучения механизмов гемопоэтической дифференцировки на разных стадиях онтогенеза, так и с целью получения клеток для клеточной терапии ряда социально-значимых заболеваний. В настоящее время практически единственной моделью для получения тканерезидентных макрофагов человека является их дифференцировка из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК, иПСК-МФ). >>

В докладе рассматриваются методические особенности и преимущества данной модели, а также приводятся результаты собственных исследований с использованием модели иПСК-МФ. Исследованы траектории дифференцировки иПСК в иПСК-МФ с использованием различных протоколов, установлены маркеры-предикторы успешной дифференцировки иПСК в иПСК-МФ (CD43, CD309), описаны основные характеристики иПСК-МФ (высокая фагоцитарная активность, высокая антибактериальная активность и др.). Отработан подход к получению генетически-модифицированных макрофагов человека путем генетической модификации иПСК (CRISPR/Cas9) и последующей дифференцировки иПСК в иПСК-МФ. Получены иПСК с оверэкспрессией A20, гена, контролирующего синтез белка с противовоспалительной регуляторной активностью. Изучение дифференцировки иПСК-A20 в культуре *in vitro* выявило ранее не описанные особенности экспрессии A20: низкий уровень экспрессии в иПСК, существенное повышение экспрессии в ходе гемопоэтической дифференцировки, резкое снижение экспрессии на стадии образования иПСК-МФ и экспрессия в иПСК-МФ низкомолекулярной формы белка. Выявленные особенности подтверждены при анализе макрофагов моноцитарного происхождения и, по-видимому, отражают различную потребность в ауторегуляции воспалительного ответа в клетках, находящихся на разных стадиях гемопоэтической дифференцировки. Получены иПСК с оверэкспрессией интерферона I типа IFN- $\beta$ . Обнаружено, что в процессе спонтанной и направленной дифференцировки иПСК оверэкспрессия IFN- $\beta$  ведет к нарушению экспрессии генов, ассоциированных с нейроэктодермальной дифференцировкой.

В целом, получение генетически модифицированных иПСК и их дифференцировка в иПСК-МФ и другие гемопоэтические клетки является ценной моделью для изучения влияния различных генетических факторов на процесс клеточной дифференцировки и получения иммунных клеток со стойкой генетической модификацией.

*Работа поддержана Минобрнауки России (№ 075-15-2021-1075).*

## Материнские транскрипты генов ANTP в ооцитах *Platynereis dumerilii*

Р.И. Муллахметов\*<sup>1</sup>, М.А. Кулакова<sup>1</sup>, Г.П. Маслаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\* *mullakhmetov.03@mail.ru*

Развитие многоклеточных животных зависит от координированной работы множества транскрипционных факторов, среди которых особая роль принадлежит гомеодоменным белкам из класса ANTP. Гены этих факторов образуют кластеры – группы сцепления, возникшие путём *cis*-дупликаций предкового гена. Известны три кластера – Нох-кластер, ParaНох-кластер и НК-кластер, последний из которых эволюционно наиболее древний. Все гены из класса ANTP многозадачны и обычно контролируют множество событий в развитии: от установления общего плана организации до терминальных тканеспецифичных дифференцировок. У большинства билатеральных животных эти гены работают коллинеарно. Это означает, что от позиции в кластере зависит место, время и/или интенсивность их экспрессии. Эволюционное становление такой сложной регуляции остаётся загадкой, и для её разрешения необходимо подробное изучение универсальных и частных функций генов ANTP в разных модельных системах.

*Platynereis dumerilii* - удобный модельный объект для изучения эволюционных вопросов, более того, для него уже существует база данных с интересующими нас генами из класса ANTP. Ранее мы обнаружили, что у аннелиды *P. dumerilii* почти все гены Нох-кластера имеют материнские транскрипты, причём некоторые из них сплайсируются каноническим образом (Maslakov et al., 2021). Мы решили проверить, справедливо ли это правило для других генов из класса ANTP. С помощью геноспецифичных праймеров мы убедились в наличии материнских транскриптов у 16 генов из кластеров Para-Нох и НК. Для дальнейшего анализа ситуации нам необходимо было клонировать фрагменты исследуемых генов. Мы использовали суммарную РНК из хвостов червя и «рандомные» гексамерные праймеры, чтобы получить комплементарные цепи ДНК методом обратной транскрипции. Используя геноспецифичные праймеры, мы синтезировали искомые фрагменты, затем лигировали их в транскрипционный вектор pAL2-T (Evrogen) и клонировали в штамме *E. coli* (JM109). Таким образом, нам удалось получить фрагменты 12 генов ANTP, из которых 9 имеют материнские транскрипты. Вектор со вставкой был использован для синтеза меченых РНК-зондов для последующей гибридизации *in situ* на ооцитах и ранних эмбрионах *P. dumerilii*. Предварительные данные о локализации материнских транскриптов могут служить отправной точкой для дальнейших исследований, направленных на выявление роли этих генов в процессах эволюции и развития в линии спиральных животных.

Исследование выполнено за счёт средств Российского научного фонда (проект № 23-24-00426). Авторы выражают благодарность РЦ Культивирования Микроорганизмов (КМ) и ЦКП “Хромас” за помощь в получении данных.

**Генная терапия эпилепсии с использованием кальций-активируемых калиевых каналов**

Е.С. Никитин\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

\* [nikitin@ihna.ru](mailto:nikitin@ihna.ru)

Генная терапия является потенциальной альтернативой хирургическому лечению эпилепсии, от которой страдают миллионы людей, и которая в ~30% случаев является фармакорезистентной. Для снижения возбудимости основных глутаматэргических нейронов в качестве метода лечения предлагается инженерная экспрессия K<sup>+</sup>-каналов, выбранная благодаря выдающейся способности K<sup>+</sup>-каналов гиперполяризовать нейроны. Однако, влияние сверхэкспрессии K<sup>+</sup>-каналов на физиологию клеток еще не изучено. Для доставки канала мы использовали вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), предназначенный для снижения эпилептиформной активности в возбуждающих пирамидных нейронах путем экспрессии человеческого гена Ca<sup>2+</sup>-активируемого K<sup>+</sup>-канала KCa3.1. Электрофизиологические и фармакологические эксперименты в острых срезах мозга показали, что в трансдуцированных KCNN4 нейронах наблюдается Ca<sup>2+</sup>-зависимая медленная следовая гиперполяризация, которая значительно снижает способность KCNN4-положительных нейронов генерировать высокочастотные спайки, не влияя на их способность к низкочастотному кодированию и форму их потенциалов действия. Тесты на противоэпилептическую активность показали мощное подавление фармакологически индуцированных припадков *in vitro* как на уровне отдельных клеток, так и на уровне локальных потенциалов поля с уменьшением количества спайков во время иктальных разрядов. В совокупности наши результаты убедительно свидетельствуют о том, что экспрессия канала KCNN4 в возбуждающих нейронах с помощью AAV является перспективным терапевтическим средством для использования в качестве генной терапии эпилепсии.

*Исследование поддержано грантом РФФ 20-15-00408.*

## Сигнальный путь YAP/TAZ при моделировании развития кожи человека с использованием ИПСК

М.Д. Панкратова\*<sup>1</sup>, А.А. Рябинин<sup>1</sup>, Е.П. Калабушева<sup>1</sup>, З.Р. Стариннов<sup>1</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* *masha.pankratova25@bk.ru*

Сигнальный каскад YAP/TAZ является одним из ключевых сигнальных путей, регулирующих морфогенез кожи, оказывая влияния на пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток, а также другие сигнальные пути. Однако, на сегодняшний день мало что известно о роли данного каскада в развитии кожи человека из-за биоэтических ограничений. Одним из перспективных подходов к моделированию и изучению развития кожи человека является направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с получением трехмерных органных структур, в которых создается оптимальное микроокружение для появления различных типов клеток и их самоорганизации. Данный подход позволяет воспроизводить и проанализировать морфогенез кожи человека и ряда ее дериватов *in vitro*.

Целью данной работы было изучение активности сигнального каскада YAP/TAZ при моделировании развития кожи человека и ее производных из ИПСК. На разных временных точках дифференцировки производился отбор материала для иммуногистохимического анализа и анализа экспрессии генов при помощи пространственной транскриптомики. В результате первого этапа анализа в составе кожных органоидов были выделены нейральные, мезенхимные и эпителиальные популяции. В выделенных клеточных популяциях была проанализирована экспрессия YAP и TAZ, транскрипционных факторов TEAD1-4, а также наиболее верифицированных мишеней данного каскада – CYR61 и CTGF. Кроме того, была изучена динамика активности YAP и TAZ в ходе дифференцировки органоидов, которую оценивали по ядерной локализации данных белков в выделенных популяциях клеток.

Полученные в результате индуцированной дифференцировки органоиды содержали основные клеточные популяции и структуры, характерные для развития кожи *in vivo*, включая эпидермис, дерму и волосяные фолликулы. В результате анализа экспрессии генов были выявлены закономерности в динамике экспрессии и паттерны коэкспрессии компонентов YAP/TAZ сигнального пути. В частности, YAP совместно с TEAD3 регулирует образование многослойного эпидермиса и волосяных фолликулов, в то время как TAZ преимущественно задействован в развитии мезенхимы. Сигнальный каскад YAP/TAZ вовлечен в эпителио-мезенхимные взаимодействия в развивающейся коже человека, поскольку активность этого каскада была выявлена как в эпидермисе, так и в дерме. Таким образом, в ходе данной работы впервые был охарактеризован паттерн экспрессии членов сигнального каскада YAP/TAZ при моделировании эмбриогенеза кожи человека.

*Исследование было поддержано грантом РФ № 21-74-30015.*

**Перспективы генетического репрограммирования ретинального пигментного эпителия у млекопитающих и человека для науки и медицины**

Л.А. Ржанова\*<sup>1</sup>, М.А. Александрова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* 9303923@gmail.com

Основной причиной дегенеративных заболеваний глаза человека, приводящих к потере зрения является дегенерация сетчатки в результате гибели фоторецепторов (ФР) и ретинального пигментного эпителия (РПЭ). В современной медицине разрабатываются подходы, направленные на сохранение исходных ФР и РПЭ, замену клеток путем активации эндогенной регенерации или за счет клеточной трансплантации. Лечение наследственных заболеваний глаз с использованием методов хирургии генома и генной терапии, показало высокий процент эффективности на ранних стадиях развития заболеваний, когда еще сохранились ФР и РПЭ. Первый успешный клинический пример генной терапии в офтальмологии был показан у пациентов с врожденным амаврозом Лейбера, вызванный мутациями в гене *RPE65*. Сейчас проходят клинические испытания у пациентов с болезнью Штаргардта, синдромом Ушера и пигментным ретинитом, а также клинические испытания CRISPR/Cas9 на людях с врожденный амаврозом Лебера 10 типа. Другой подход в лечении ряда дегенеративных заболеваний сетчатки, при которых происходит большая клеточная потеря – это заместительная клеточная терапия. Клетки РПЭ, полученные из ЭСК и ИПСК человека уже проходят клинические испытания и имеют большие перспективы в лечении возрастной макулярной дистрофии. Репрограммирование эндогенных клеток РПЭ в нейроны сетчатки также является перспективным методом для лечения таких заболеваний. Клетки РПЭ цыплят, мышей и человека способны к прямому репрограммированию в нейроны сетчатки под влиянием генов, участвующие в процессе дифференцировки сетчатки *in vitro* и *in vivo*. Были исследованы более 20 таких генов, кодирующие гомеобоксные и транскрипционные факторы семейства bHLH, которые при помощи вирусных векторов доставляли в клетки РПЭ позвоночных *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на ярко выраженные успехи в репрограммировании клеток РПЭ цыплят и мышей, у человека оно зачастую проходит не полноценно и, хотя клетки приобретают многие характеристики нейральных клеток сетчатки, они оказываются малофункциональными *in vitro*. Предполагается, что эту эффективность можно повысить при помощи малых молекул, некодирующих РНК, факторов роста и других соединений, которые влияют на клеточное репрограммирование, генетическую трансфекцию, сигнальные пути, клеточный метаболизм, пролиферацию и гибель. Необходимо учитывать гетерогенность самой ткани РПЭ, клетки которой находятся на разных стадиях развития и могут по-разному отвечать на воздействия генной терапии и хирургии генома.

*Работа выполнена в рамках № ГЗ 0088-2024-0014.*

**Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток макак-резуса (*Macaca mulatta*) путем репрограммирования мультипотентных стволовых клеток жировой ткани**

А.С. Рябченко\*<sup>1</sup>, В.К. Абдыев<sup>1</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

\* [anfisafile@gmail.com](mailto:anfisafile@gmail.com)

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) - уникальный тип клеток, обладающий способностью к самообновлению и дифференцировке в различные клетки организма. Более того, применение иПСК является перспективным направлением в таких областях, как регенеративная и трансляционная медицина, тестирование лекарственных препаратов, моделирование заболеваний и эмбрионального развития человека. Однако работа с человеческим материалом имеет некоторые этические и юридические ограничения, что затрудняет работу с человеческими клетками. Нечеловекообразные приматы могут использоваться в качестве модельного объекта, так как филогенетически близки к человеку и не обременены этическими запретами. Макак-резус (*Macaca mulatta*) является одним из наиболее распространенных и доступных модельных объектов нечеловекообразных приматов. Тем не менее, получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток приматов является сложной задачей, так как эти клетки по сравнению с клетками человека менее эффективно поддаются репрограммированию, а из-за видовых различий с человеком имеют иные условия культивирования и поддержания состояния плюрипотентности.

Известно, что ингибиторы деацетилазы гистонов являются эпигенетическими модификаторами и могут способствовать эффективному регулируемому контролю экспрессии генов. В данной работе мы использовали их для повышения эффективности репрограммирования клеток макак-резуса. Для этого было проведено репрограммирование мультипотентных стволовых клеток жировой ткани макак-резуса эписомальными векторами при воздействии вальпроевой кислоты и бутирата натрия в качестве ингибиторов деацетилазы гистонов в течение 18 дней. Уже на 17 день репрограммирования были обнаружены колонии клеток с морфологией иПСК, а первые колонии отобраны на 21 день репрограммирования. Мы предполагаем, что применение ингибиторов деацетилазы гистонов увеличило эффективность репрограммирования. Одной из следующих задач является разработка определенных условий для поддержания плюрипотентности, а также характеристика новой клеточной линии иПСК макак-резуса.

*Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021- 1063 от 28.09.2021 г.*

**Влияние серотонина на активность транскрибируемых регуляторных элементов в процессе эмбрионального развития гипоталамуса**

М.С. Сабилов\*<sup>1</sup>, А.Н. Гайнуллина<sup>1</sup>, Е.А. Чикина<sup>1</sup>, В.И. Мельникова<sup>1</sup>,  
Е.И. Шагимарданова<sup>2,3</sup>, О.А. Гусев<sup>3,4,5</sup>, Е.Е. Воронежская<sup>1</sup>, Р.А. Романов<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Сколковский Институт Науки и Технологий, Москва, Россия

<sup>3</sup> Life Improvement by Future Technologies Center, Москва, Россия

<sup>4</sup> Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

<sup>5</sup> Университет Дзюнтендо, Токио, Япония

<sup>6</sup> Венский Медицинский Университет, Вена, Австрия

\* *m.sabirov@idbras.ru*

Серотонин (5-гидрокситриптами́н, 5-НТ) является важным нейротрансмиттером, который играет ключевую роль в широком спектре процессов. Недавно было обнаружено, что 5-НТ функционирует как эпигенетический регулятор. Серотонин участвует в серотонилировании гистона H3, создавая метку H3K4me3Q5ser на промоторах генов, связанных с развитием, тем самым контролируя индуцибельную экспрессию генов. Учитывая вклад 5-НТ в эпигенетическую регуляцию, мы решили проанализировать активность транскрибируемых цис-регуляторных элементов (tCRE) в развивающемся гипоталамусе.

Экспериментальная процедура состояла в пероральном введении предшественника 5-НТ беременным крысам на стадии активного нейрогенеза (E11-14). Затем, на E20, фетальный гипоталамус был использован в качестве материала для 5'-sc-scRNA-seq, что позволяет одновременно исследовать транскрипционную активность генов и tCREs. Мы реконструировали генные регуляторные сети tCREs и сравнили их между контрольными и стимулированными образцами. Нам удалось идентифицировать энхансер-промоторные связи и найти типы клеток, которые значительно различаются по совместной активности регуляторных модулей. Наиболее существенные различия в активности tCREs между состояниями наблюдались в транзиторных типах клеток, которые образуют «мосты» от глиальных/прогениторных клеток к возбуждающим или тормозным нейронам. Кроме того, мы изучали структурную организацию tCREs. Мы провели анализ активности мотивов связывания факторов транскрипции и обнаружили высокое сходство в структурной организации tCREs, которые активны в различных транзиторных типах клеток. Наконец, мы идентифицировали два семейства белков, RFX и FOX, представители которых имеют повышенную активность мотивов связывания в образцах 5-НТ среди различных типов клеток.

*Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (грант No 075-15-2021-1344).*

**Развитие технологий исследования ДНК клеток  
доимплантационных эмбрионов**

А.Ф. Сайфитдинова\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, Россия

\* [saitdinova@mail.ru](mailto:saitdinova@mail.ru)

Появление методов оплодотворения *in vitro* и развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволили осуществлять исследование генома эмбриона еще до его переноса в полость матки для снижения рисков рождения детей с генетическими заболеваниями. С 1989 года в мире на свет появились тысячи детей после процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с преимплантационным генетическим тестированием (ПГТ) на хромосомные и моногенные заболевания. За этот период был достигнут существенный прогресс в технологии исследования ДНК отдельных эмбриональных клеток – от амплификации отдельных маркеров методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и картирования небольших локусов методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) до использования полногеномного анализа с применением современных молекулярно-генетических методов. В настоящее время различают четыре основных группы исследований: ПГТ-А – все тесты, направленные на определение количественных хромосомных изменений (анеуплоидий); ПГТ-СП – все тесты, направленные на выявление структурных хромосомных перестроек; ПГТ-М – все тесты, направленные на диагностику моногенных заболеваний и выявления отдельных генных аллелей, а также ПГТ-П – все тесты, направленные на предсказание и определение рисков развития мультифакторных (полигенных) заболеваний. Последний вид исследования был введен в практику ПГТ совсем недавно и все еще вызывает множество дебатов, однако, нужно признать, что его появлению мы во многом обязаны бурным развитием технологий секвенирования с длинными прочтениями и внедрением анализа на основе искусственного интеллекта. Для процедуры ПГТ, в зависимости от выбранного метода и конкретного типа исследования, могут использоваться биопсированные полярные тела ооцита или клетки эмбриона: бластомеры, клетки трофэктодермы. В последнее время интенсивно развиваются методы неинвазивного ПГТ, однако они имеют ряд ограничений и пока не получили рекомендации для внедрения в широкую практику. Для подготовки материала отдельных клеток к исследованиям используют специально разработанные технологии полногеномной амплификации. Разработанные подходы могут найти применение в практике научных исследований для подтверждения внесенных в геном изменений в результате редактирования и индуцированного увеличения копийности отдельных хромосом или их сегментов.

Устный доклад

**Редактирование сложной гетерозиготной мутации методом CRISPR/Cas9 в гене кальцевосприимчивого рецептора в культуре индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека**

П.И. Семенова\*<sup>1</sup>, А.В. Панова<sup>2</sup>, Ю.В. Сопова<sup>1</sup>, О.А. Краснова<sup>1</sup>, А.А. Ковалева<sup>1</sup>,  
И.Э. Неганова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

\* *psemenova2000@gmail.com*

Дифференцировка пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), и их дочерние линии с отредактированным вариантом мутации, позволяет не только изучать генетические аномалии *in vitro*, но и создавать клеточные модели для поиска молекулярных механизмов заболеваний и тестирования новых лекарственных препаратов.

Целью данного исследования являлось генетическое редактирование линии иПСК от пациента с неонатальным гиперпаратериозом, ассоциированным со сложной гетерозиготной мутацией в 6 [c.1656delA, p.I554SfsX73] и в 7 [c.2217T>A, p.C739X] экзонах гена *CaSR*.

Генетическое редактирование осуществляли трансфекцией иПСК, с помощью системы Cas9/sgRNA, направленную на последовательность 6 экзона c.1656delA. Последовательность спейсера направляющей РНК была выбрана специфично для разрезания только мутантной аллели. Спейсер был клонирован в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP-CASR. В качестве донора для рекомбинации использовали одностороннюю ДНК, несущую синонимичную замену. Последовательность вставки была подтверждена с помощью секвенирования. Эффективность трансфекции определяли по интенсивности свечения GFP.

Линия иПСК HPCASRi002-Ae4 с исправленной последовательностью сохранила плюрипотентность, что было подтверждено методами полимеразной цепной реакции в реальном времени и иммунофлуоресцентного анализа (экспрессия транскрипционных факторов NANOG, OCT4, SOX2, DPPA4), а также и проточной цитометрии (поверхностный антиген TRA-1-60). Способность дифференцироваться в дериваты трех зародышевых листков была подтверждена методом образования эмбрионидных тел с последующим иммунофлуоресцентным анализом и ПЦР в реальном времени на маркеры мезодермы (alpha-SMA, HAND1,T) энтодермы (AFP, FOXA2, SOX17) и эктодермы (TUBB3, PAX6, SOX1). G-бендинг линии показал нормальный кариотип 46, XY без хромосомных патологий.

Полученную отредактированную линию иПСК можно использовать для изучения роли исходной мутации в патогенезе развития неонатального гиперпаратериоза, а также её возможного влияния на ход дифференцировки в различные типы тканей.

Данная работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение No 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

Устный доклад

**Неожиданный урок ошибки скрещивания: эмбрионально летальные  
в гомозиготе мутации гена *Flnс* успешно компенсируют друг друга**

Ю.Ю. Силаева\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

\* [yulya.silaeva@gmail.com](mailto:yulya.silaeva@gmail.com)

Филамин С - структурный белок мышечного волокна, мутации в котором приводят к развитию миопатий и кардиомиопатий у человека. Мы создали две линии мышей, мутантных по филамину С: в одной из них делеция трех нуклеотидов в положении с.7415\_7417 приводит к аминокислотной замене E>>D в положении 2472 и делеции аспарагина в положении 2473, в другой делеция GA в положении с.7414\_7415 приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона. Мы показали, что у гомозигот обеих линий наблюдается эмбриональная летальность на стадии E10.5-E11.5, однако при скрещивании гетерозиготных животных двух разных линий, рождаются животные, несущие разные мутации в обоих аллелях гена *Flnс*. Мы показали, что такие животные благополучно проходят эмбриональное развитие, достигают половозрелости и их сердечная мышца функционально и гистологически не отличается от животных дикого типа.

---

Устный доклад

**Эффективность клеточного репрограммирования зависит  
от активности иммунопротеасом**

А.С. Цимоха\*<sup>1</sup>, А.В. Кузнецов<sup>1</sup>, И.В. Зубарев<sup>1</sup>, А.Р. Газизова<sup>1</sup>, А.В. Селенина<sup>1</sup>,  
С.В. Пономарцев<sup>1</sup>, А.Н. Томилин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

\* [atsimokha@gmail.com](mailto:atsimokha@gmail.com)

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) вызывают значительный интерес как в области регенеративной медицины, так и в фундаментальных исследованиях в области биологии развития. Подобно эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), иПСК имеют способность к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Тем не менее, несмотря на активные исследования в этой области и на определенные успехи, эффективность получения и качество иПСК остаются на неудовлетворительном уровне, в том числе из-за медленной кинетики процесса и многофакторных требований. Более того, все еще недостаточно изучены молекулярные механизмы, лежащие в основе индукции клеточной плюрипотентности.

Известно, что убиквитин-протеасомная система (УПС) играет ключевую роль в поддержании клеточной плюрипотентности и дифференцировке как ЭСК, так и иПСК, обеспечивая селективное разрушение внутриклеточных белков для поддержания протеостаза. Кроме того, клетка при изменении внешней среды (стресс, вирусные инфекции, воспаление, стимуляция цитокинами и т.д.) или в соответствии с внутренними перестройками (становление плюрипотентности и дифференцировка) требует от УПС определенной гибкости, что связано, >>

в том числе, с изменениями в составе протеасомных комплексов. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы протеасомы могут замещаться индуцибельными субъединицами, такими как Lmp2, Lmp7 и Mecl-1, образуя иммунопротеасому. Хотя иммунопротеасома изначально была описана как компонент иммунной системы, в последнее время поступает всё больше данных о ее участии в клеточных процессах, не связанных с процессингом антигенов для представления на молекулах MHC-1. Например, была отмечена повышенная экспрессия иммуносубъединиц протеасом в ЭСК человека, при этом наблюдалось значительное снижение синтеза этих субъединиц в процессе дифференцировки, что предполагает роль иммунопротеасом в поддержании плюрипотентности.

В нашем исследовании мы показали важность активности иммунопротеасомы в генерации иПСК при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) с использованием эктопической экспрессии четырех факторов Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc). Мы зафиксировали временную активацию экспрессии иммунопротеасом с 3-го по 7-й день репрограммирования МЭФ в иПСК. В течение всего процесса репрограммирования применение специфического ингибитора протеасомы MG132 или специфического ингибитора иммунопротеасомы PR-957 приводило к значительному снижению образования колоний иПСК, что подчеркивает роль как протеасом, так и иммунопротеасом в этом процессе. Кроме того, критически важной для эффективного получения иПСК мыши является активность иммунопротеасом на начальных этапах репрограммирования МЭФ. Негативное влияние нокаута гена Psmb8, кодирующего субъединицу иммунопротеасомы Lmp7, на эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК подтвердило функциональную значимость иммунопротеасом в данном процессе.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28-09-2021).*

Стендовый доклад

**Определение *in situ* общегеномного содержания H3K27me2 - эпигенетического маркера транскрипционно-неактивного хроматина в предимплантационных зародышах мыши, культивируемых *in vitro* в присутствии бисфенола а и лактоферрина**

Л.А. Челышева\*<sup>1</sup>, Е.М. Нониашвили<sup>1</sup>, Е.Л. Паткин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

\* [ofeliyafutman@gmail.com](mailto:ofeliyafutman@gmail.com)

Репрессивная модификация гистонов H3K27me2 является маркером транскрипционно-неактивного хроматина. Ранее, нами было показано, что воздействие бисфенола А (БФА) в предимплантационном периоде приводит к полногеномному снижению количества модификаций гистонов H3K27me2 по сравнению с контролем. На сегодняшний день в медико-биологических базах данных нет информации о роли лактоферрина (ЛФ) как нормализатора эпигеномных нарушений под влиянием БФА.

Цель настоящего исследования – изучить влияние сочетанного действия БФА и апо-лактоферрина (апо-ЛФ) на модификацию гистонов H3K27me2, которая является маркером Polysomb-зависимого гетерохроматина. Сравнение эпигеномного статуса зародышей проводили через 24 часа культивирования в среде, содержащей 50 мкМ БФА и 50 мкМ БФА + 50 мкг/мл апо-ЛФ, путем измерения интенсивности флуоресценции антител к H3K27me2 в интерфазных ядрах бластомеров двухклеточных зародышей мыши.

Воздействие БФА на зародыши в предимплантационном периоде приводит к общегеномному снижению (в 1,3 раза) количества репрессивных модификаций гистонов H3K27me2 по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). Добавление в среду с БФА апо-ЛФ человека уменьшало (в 1,2 раза) негативный эффект БФА, тем самым приблизив значения общегеномного содержания H3K27me2 к значениям интактного контроля. Это может быть связано со способностью ЛФ взаимодействовать с ферментами, участвующими в процессах метилирования. Таким образом, наши результаты *in situ* показали, что воздействие БФА на двухклеточные зародыши нарушает процесс гетерохроматинизации в ядрах бластомеров, а апо-ЛФ человека частично нивелирует эпигенетическое воздействие БФА и приводит к нормализации эпигенетического статуса зародышей.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022-0012 (рег. № НИОКТР 122020300196-4).

**Связь активности YAP с паттерном пролиферации кератиноцитов  
в коже человека**

О.Л. Черкашина\*<sup>1</sup>, А.А. Цитрина<sup>2</sup>, Д.С. Аболин<sup>1</sup>, А.В. Косых<sup>3</sup>, Е.А. Воротеляк<sup>1</sup>,  
Е.П. Калабушева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт нанонауки имени Ильзы Кац, Беэр-Шева, Израиль;

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

\* *olgalcher@gmail.com*

Путь YAP способен активировать пролиферацию в ходе регенерации кожи, однако чрезмерную активацию связывают с гиперпролиферацией и опухолевыми процессами. Интерес представляет связь распределения активного ядерного YAP с паттерном деления клеток. Исходная модель пролиферации описывает эпидермальную пролиферативную единицу, более поздние предполагают наличие одной или нескольких популяций стволовых клеток, делящихся с разной скоростью. Понимание связи YAP с паттерном пролиферации позволит точнее описать морфогенез кожи.

Для исследования регенерации использовали модель ксенотрансплантации кожи человека мышам с иммунодефицитом с введением метки BrdU за неделю до взятия биопсии. Биопсию брали на 40, 75, 110 сутки. В программе QuPath разработали протокол анализа изображений иммуногистохимического окрашивания антителами против BrdU, Ki67, YAP, полученные данные обрабатывали статистически. Пространственную экспрессию генов на срезах кожи человека изучали при помощи метода Visium (10X Genomics).

При регенерации кожи в ксенотрансплантате на 40 сутки эпидермис гипертрофирован, что сопровождается активацией YAP. К 110 суткам активный YAP выявляется только в базальном слое эпидермиса, толщина эпидермиса уменьшается. Однако активность YAP увеличена по сравнению с нормой, базальный слой эпидермиса гипертрофирован.

Поскольку активация YAP может стимулировать пролиферацию, был сопоставлен паттерн пролиферации и паттерн распределения клеток с активным YAP. Медленно делящиеся клетки, сохраняющие метку BrdU, расположены между эпидермальными гребнями. Клетки, активно размывающие метку, локализуются как в эпидермальных гребнях, так и между ними. YAP был распределен равномерно по базальному слою эпидермиса, при этом выявляется кластер клеток с повышенным содержанием ядерного YAP, локализующихся в эпидермальных гребнях. Паттерн распределения YAP в большей степени соотносится с распределением активно делящихся клеток, размывающих BrdU.

При изучении транскриптома кожи человека в пространстве методом Visium удается выявить участки в эпидермисе, характеризующиеся дифференциальной экспрессией маркеров эпидермальных гребней и межгребневой области, таких как KRT15/Col17a1. При этом наблюдается повышение экспрессии элементов сигнального пути YAP в эпидермальных гребнях. >>

Роль клеток, сохраняющих метку, требует более подробного изучения, в то время как активность YAP может быть связана с клетками, размывающими метку, расположенными как в эпидермальных гребнях, так и между ними.

*Работа поддержана грантом РФФ №21-74-30015.*

---

*Устный доклад*

**От понимания структуры и динамики хроматина к разработке методов эпигенетической инженерии на основе dCas-белков**

А.К. Шайтан\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* *alex@intbio.org*

Регуляция работы геномов эукариотических организмов на эпигенетическом уровне лежит в основе их функционирования, позволяет управлять развитием клеток и организмов, изменять экспрессию генов в ответ на изменение внешних факторов и сигналов. В основе эпигенетических механизмов лежит множество физических и биохимических взаимодействий между молекулами ДНК/РНК и белками хроматина. В отличие от «дискретной», «цифровой» природы хранения и обработки генетической информации в ходе базовых молекулярно-биологических процессов (репликации, транскрипции, трансляции), процессы эпигенетической регуляции осуществляются «аналоговым» образом через структурно-динамические изменения в хроматине опосредуемые химической модификацией ДНК и белков, работой ремоделлеров хроматина, изменением экспрессии различных белков хроматина и их вариантных форм. В последние годы в области изучения и направленного воздействия на эпигенетическую регуляцию появился мощный инструмент, основанный на применении каталитически неактивных Cas-белков (dCas), которые могут доставлять к заданным областям генома различные эффекторные белки хроматина, некодирующие РНК, изменять структуру петель в хроматине.

В данном докладе будет рассказано о современных представления о физико-химических основах функционирования хроматина, дан обзор современных методов воздействия на эпигеном с помощью конструкций на основе dCas-белков, будут обсуждаться вопросы эффективного дизайна конструкций на основе dCas-белков, гидовых РНК, функционализированных РНК и белковыми доменами для воздействия на структуру хроматина.

*Данная работа была поддержана Министерством Науки и Высшего Образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539).*

**Генетические подходы к моделированию оверэкспрессии различных генов в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и получение генномодифицированных макрофагов человека**

О.Н. Шевелева\*<sup>1</sup>, Н.Н. Буторина<sup>1</sup>, В.И. Кузьева<sup>1</sup>, С.П. Медведев<sup>2</sup>, Е.А. Протасова<sup>1</sup>,  
И.В. Лядова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН,  
Новосибирск, Россия

\* *on\_sheveleva@mail.ru*

Генетическая модификация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека открыла новые возможности в моделировании заболеваний и коррекции генетических дефектов, приводящих к разным заболеваниям (Zhang et al., 2011; Freedman et al., 2015; Jehuda et al., 2018; Higo et al., 2021). Одной из самых распространенных и универсальных технологий генетической коррекции в настоящее время является применение системы CRISPR/Cas9. Чаще всего этот подход используется для редактирования гена, нарушения в котором являются причиной изучаемого заболевания (Torres-Ruiz et al., 2017; Karimian et al., 2019; Gupta et al., 2019). Работ посвященных созданию моделей с оверэкспрессией целевых белков в литературе немного. При этом такой подход мог бы помочь изучению внутриклеточных механизмов регуляции клеточной активности и в поиске методов лечения для целого ряда заболеваний (Kim et al., 2012, Liu et al., 2020).

В своих исследованиях мы сосредоточились на изучении макрофагов с оверэкспрессией генов, которые кодируют белки, участвующие в воспалении и иммунном ответе (кателицидин, A20 и интерферон  $\beta$ ). Поскольку получение генетически-модифицированных макрофагов непростая задача из-за их устойчивости к трансфекции и способности элиминировать чужеродную ДНК, мы получали макрофаги из генетически-модифицированных иПСК человека. На моделях с оверэкспрессией таргетных белков в иПСК и при их дифференцировке нам удалось обнаружить различную динамику экспрессии A20 в ходе гемопоэза (Sheveleva et al., 2023) и влияние интерферона  $\beta$  на спонтанную дифференцировку иПСК. В ходе исследований мы апробировали два разных подхода к редактированию – с использованием конститутивного (PGK) и контролируемого (TRE) промоторов. Оверэкспрессия таргетного гена под конститутивным промотором позволяла получить стабильную экспрессию, уровень которой практически не изменяется при дифференцировке иПСК, однако он был сильно ниже, чем с доксициклин-контролируемым промотором. В свою очередь, экспрессия под доксициклин-контролируемым промотором позволяла «включать» экспрессию таргетного гена в нужный момент, но была не такой стабильной и сильно снижалась при дифференцировке иПСК в макрофаги.

Рассмотренные подходы позволяют получать макрофаги с экспрессией определенного биологически активного фактора и в перспективе могут быть использованы для терапии инфекционных заболеваний и заболеваний, связанных с нарушением функции фагоцитов.

*Работа осуществлялась при поддержке Минобрнауки РФ, проект №075-15-2021-1075.*

## Изучение неспецифического взаимодействия SpCas9 с ДНК при помощи методов молекулярной динамики

В.А. Яковлев<sup>1</sup>, Н.В. Кристовский\*<sup>1</sup>, Г.А. Армеев<sup>1</sup>, А.К. Шайтан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* *krist179@mail.ru*

Повторяющиеся последовательности CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), разделённые уникальными спейсерными последовательностями, играют важную роль в защитных механизмах прокариот от вирусов. Вблизи них находится регион ДНК, кодирующий Cas-белки (CRISPR-associated proteins). Эти белки привлекли внимание исследователей из-за своей способности специфически связываться с ДНК и осуществлять её разрезание благодаря эндонуклеазной активности.

За последние два десятилетия были получены структуры и изучены механизмы взаимодействия Cas-белков с ДНК. Также разработаны модифицированные dCas-белки (dead), у которых деактивированы эндонуклеазные домены путём введения точечных мутаций в структуру белка. Высокая специфичность связывания Cas-белков с ДНК обусловлена двухэтапным механизмом взаимодействия с целевой ДНК. Первым этапом является поиск и взаимодействие Cas-белка со специфической последовательностью на нецелевой цепи ДНК, известной как PAM (protospacer adjacent motif). На втором этапе взаимодействия белок претерпевает конформационные перестройки, и гидовая РНК (гРНК) комплементарно связывается с целевой цепью ДНК, в результате чего формируется тернарный комплекс Cas9/ДНК/гРНК. Однако, последние исследования подчёркивают важность взаимодействий с участком ДНК, расположенным после PAM-сайта в направлении 3'&apos; конца нецелевой цепи (пост-PAM), для распознавания Cas-белком PAM-сайта.

В нашей работе мы использовали метод молекулярной динамики для моделирования механизмов взаимодействия dSpCas9 (PDB ID: 5Y36) с ДНК. Также мы моделировали системы, состоящие из двух dSpCas9, расположенных на расстоянии 10 и 14 нуклеотидов в положении PAM-in. Расчеты траекторий молекулярной динамики проводились с использованием программного пакета GROMACS, с использованием силового поля AMBER ff14SB с parmbsc1 ДНК и с коррекциями параметров ионов CUFIX. Суммарно было промоделировано 2,5 мкс для 5-ти систем. В ходе анализа траекторий были продемонстрированы взаимодействия лизина 1153 из петли P1 домена с малой бороздкой ДНК. Для систем состоящих из двух структур dSpCas9 в положении PAM-in показано кратковременное взаимодействие петли P1 домена с гРНК соседней структуры dSpCas9, а также стабильное взаимодействие петли P1 домена с соседней структурой dSpCas9, затрудняющее пост-PAM взаимодействие. Полученные результаты подкрепляют литературные данные и дополняют их новыми типами взаимодействий.

*Данная работа была поддержана Министерством Науки и Высшего Образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-539).*