

**Влияние генов ZIC2, 3, 5 на индукцию плюрипотентности в фибробластах
кожи человека при помощи системы CRISPR/dCas9-SunTag-VP64**

Научный руководитель – Дашинимаев Эрдэм Баирович

Овчинникова Виктория Юрьевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический
факультет, Москва, Россия

E-mail: ovchinnikovav97@bk.ru

В настоящее время ИПСК человека [1] рассматриваются в качестве перспективного источника различных типов клеток для регенеративной биомедицины, а также в качестве удобных моделей изучения каскадов транскрипционных факторов поддержания плюрипотентности. Целью данной работы является изучение влияния экспрессии генов ZIC2, ZIC3, ZIC5 на индукцию и поддержание плюрипотентности в клетках человека.

Для активации генов ZIC в соматических клетках нами была выбрана трансактиваторная система CRISPR/dCas9-SunTag-VP64 - модифицированная версия комплекса редактирования генома CRISPR/Cas9 [2] с повышенной эффективностью благодаря системе SunTag-VP64 [3-4], присоединяющей несколько вирусных активаторных белков VP16 к промотеру гена-мишени, направление на который осуществляется при помощи химерной гидовой РНК (sgRNA). Помимо sgRNA на каждый промотер генов ZIC2, ZIC3, ZIC5 нами были использованы гидовые РНК для активации генов плюрипотентности OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 [5]. Lentivirusные частицы, содержащие все компоненты системы, трансдуцировались в иммортализованные фибробласты кожи человека. Далее был определен уровень экспрессии целевых генов при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени.

Нами были получены результаты, подтверждающие доказательство принципа работы всей выбранной нами экспериментальной системы, например, было зарегистрировано повышение экспрессии генов плюрипотентности в целевых клетках по сравнению с негативными контролями. В настоящий момент времени мы приступили к более детальному анализу влияния реактивации генов ZIC2, ZIC3, ZIC5 на экспрессию генов плюрипотентности в фибробластах кожи человека.

Источники и литература

- 1) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131:861–872.
- 2) Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., charpentier e. // Science. 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
- 3) Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging // Cell. 2014 Oct 23. 159(3):635-46.
- 4) Liu P, Chen M, Liu Y, Qi LS, Ding S. CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency // Cell Stem Cell. 2018 Feb 1;22(2):252-261

- 5) Balboa, D. et al. Conditionally stabilized dCas9 activator for controlling gene expression in human cell reprogramming and differentiation // Stem Cell Rep. 2015. 5, 448–459.