



УДК 576.536;577.29;612.086.2

# ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГИСТОНОВОЙ МОДИФИКАЦИИ НЗК9me3 В ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЬЦАХ С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СЕНСОРА MPP8-GREEN

© 2025 г. А. И. Степанов\*, \*\*, Е. Б. Жигмитова\*\*\*, Э. Б. Дашинимаев\*\*\*,  
А. А. Галиакберова\*\*\*, Л. В. Путляева\*, \*\*, К. А. Лукьянов\*\*, Н. Г. Гурская\*, \*\*, \*\*\*, #

\* Сколковский институт науки и технологии, Центр молекулярной и клеточной биологии,  
Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30/1

\*\* Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*\* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
Научно-исследовательский институт трансляционной медицины,  
Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 28.10.2024 г.

После доработки 11.11.2024 г.

Принята к публикации 13.11.2024 г.

Эпигенетические гистоновые модификации играют ключевую роль в дифференцировке стволовых клеток в различные типы клеток. Способность индуцированных плорипотентных стволовых клеток (иПСК) к дифференцировке оценивается методом формирования эмбриоидных телец, который широко используется и распространен в исследованиях иПСК. В данной работе мы использовали стабильную линию иПСК с генетически кодируемым сенсором MPP8-Green для визуализации гистоновой модификации НЗК9me3 при формировании эмбриоидных телец. Мы выявили две группы клеток на основе распределения НЗК9me3 в сформировавшихся эмбриоидных тельцах, используя сенсор MPP8-Green. Данная работа демонстрирует, что сенсор MPP8-Green может быть использован для отслеживания динамики НЗК9me3 во время спонтанной дифференцировки и формирования эмбриоидных телец. С использованием сенсора мы выявили две группы клеток с различным распределением НЗК9me3 и показали возможность применения подобных генетически кодируемых инструментов для выявления различий в паттернах эпигенетических модификаций при спонтанной дифференцировке иПСК.

**Ключевые слова:** иПСК, эмбриоидные тельца, гистоны, метилирование, эпигенетическая регуляция, флуоресцентная микроскопия

**DOI:** 10.31857/S0132342325010064, **EDN:** LZMZHL

## ВВЕДЕНИЕ

Участки хроматина приобретают уникальные черты эпигенетического ландшафта за счет комбинации посттрансляционных модификаций гистонов. Эти ковалентные модификации носят динамический характер, изменяясь как на протяжении клеточного цикла, так и в ходе различных процес-

сов, требующих геномной реорганизации, таких как морфогенез и дифференцировка, адаптация к стрессовым условиям и старение [1–3]. Эпигенетические модификации, влияющие на регуляцию экспрессии генов, играют ключевую роль в дифференцировке стволовых клеток в различные типы клеток [3–5]. Одна из самых распространенных эпигенетических модификаций – это модифи-

Сокращения: НЗК9me3 – эпигенетическая модификация Lys9 гистона Н3; MPP8 – М-фазный фосфопротеин 8; иПСК – индуцированные плорипотентные стволовые клетки.

# Автор для связи: (эл. почта: gurskayanadja@gmail.com).

кация Lys9 гистона H3 (H3K9me3), которая отвечает за подавление транскрипции генов и клеточную идентичность [6]. Эта модификация участвует в формировании гетерохроматина, что приводит к снижению экспрессии генов, обеспечивая клеточную стабильность и идентичность.

Одно из ключевых направлений в изучении гистоновых модификаций – флуоресцентная микроскопия, которая сосредоточена на визуализации данных модификаций [7]. Традиционно для этих целей используются антитела против различных гистоновых модификаций, но необходимость фиксации клеток при окрашивании представляет собой значительное ограничение для изучения динамики этих процессов. В последнее время генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры на основе природных “ридерных” доменов [8], которые специфически связываются с гистоновыми модификациями, приобретают все большую популярность. Эти сенсоры позволяют наблюдать изменения в гистоновом коде в живых клетках. Существуют различные варианты таких сенсоров, состоящих из “ридерных” доменов, связанных с флуоресцентными белками. Например, для визуализации модификации H3K9me3 используется сенсор на основе хромодомена и “теневого” хромодомена (chromodomain and chromo shadow domain) белка HP1a, который позволяет отслеживать изменения в реальном времени [9].

Способность индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) к дифференцировке оценивается методом формирования эмбриоидных телец, который широко используется и распространен в исследовании иПСК [10, 11]. Эмбриоидные тельца представляют собой трехмерные образования, возникающие из иПСК в результате спонтанной дифференцировки, они содержат клетки трех зародышевых листков: мезодермы, эктодермы и эндодермы. Этот метод позволяет моделировать ранние стадии эмбрионального развития и исследовать механизмы клеточной дифференцировки и организации тканей. Для выявления ключевых событий дифференцировки большое значение имеет отслеживание происходящих в ходе этого процесса изменений эпигенетической модификации гистонов.

В данной работе мы использовали линию иПСК, стабильно экспрессирующую генетически кодируемый флуоресцентный сенсор MPP8-Green, распознающий эпигенетическую модификацию

H3K9me3, для дифференцировки и формирования эмбриоидных телец, демонстрируя возможность визуализации изменений в гистоновой модификации H3K9me3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами была создана стабильная линия иПСК KUIFMSi004-A-1 с использованием лентивирусной трансдукции с использованием плазмида EF1-MPP8-mNeonGreen-NLS-MPP8 на основе родительской линии KUIFMSi004-A [12]. Данный сенсор MPP8-Green – генетически кодируемый эпигенетический репортер для визуализации гистоновой модификации H3K9me3. Сенсор представляет собой белок слияния двух копий природного “ридерного” домена M-фазного фосфопротеина 8 (MPP8) [13] и зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen. Клеточная линия KUIFMSi004-A-1 позволила нам визуализировать модификации гистонов H3K9me3 в процессе индуцированной нейрональной дифференцировки иПСК в нейральные клетки предшественники [12].

В ходе данной работы мы использовали клеточную линию KUIFMSi004-A-1 для моделирования процесса спонтанной дифференцировки иПСК. Колонии клеток культивировали до формирования эмбриоидных телец, которые затем помещали в среду для дифференцировки. Спустя две недели, для подтверждения успешного образования эмбриоидных телец, мы провели окрашивание антителами к различным маркерам эктодермы, энто-дермы и мезодермы (рис. 1), что подтвердило успешное формирование эмбриоидных телец. Окрашивание антителами к  $\alpha$ -фетопротеину и FOXA2 свидетельствует о формировании энто-дермы, десмин и гладкомышечный актин указывают на мезодерму, а PAX6 и нестин – это маркеры эктодермы.

Для визуализации гистоновой модификации H3K9me3 в живых клетках мы провели флуоресцентную микроскопию с использованием света с длиной волны 485 нм для возбуждения флуоресценции сенсора. Было обнаружено, что в процессе спонтанной дифференцировки большинство клеток сохраняет стабильную экспрессию сенсора, что позволяет визуализировать эпигенетический ландшафт H3K9me. На полученных изображениях мы наблюдали различное распределение гистоновой модификации H3K9me3 по сравнению с исходными иПСК (рис. 2а). Среди различных

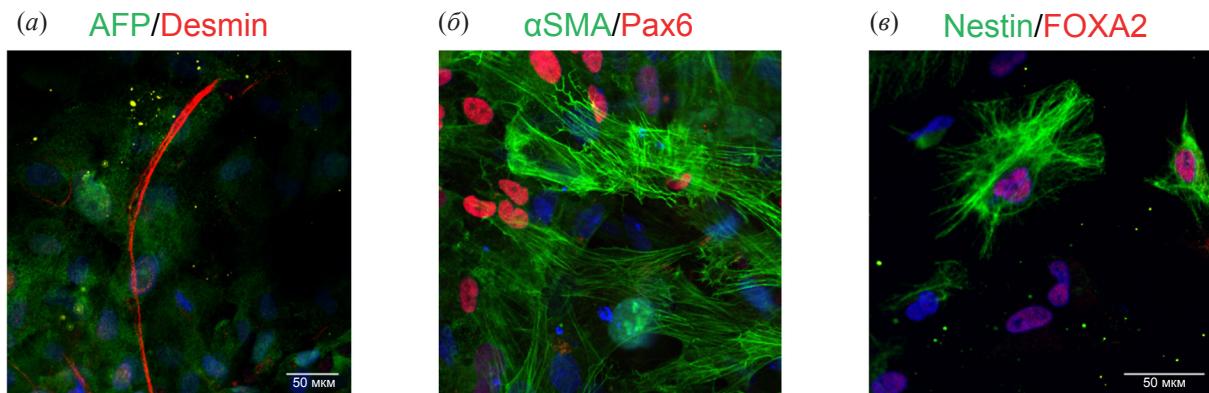


Рис. 1 Флуоресцентная микроскопия иммуноокрашенных дифференцированных клеток, демонстрирующих маркеры энодермы (a), мезодермы (b) и эктодермы (c); (a) –  $\alpha$ -фетопротеин (AFP) – зеленый канал флуоресценции, десмин (Desmin) – красный канал; (b) – гладкомышечный актин ( $\alpha$ SMA) – зеленый канал, Pax6 – красный канал; (c) – нестин (Nestin) – зеленый канал, FOXA2 – красный канал.

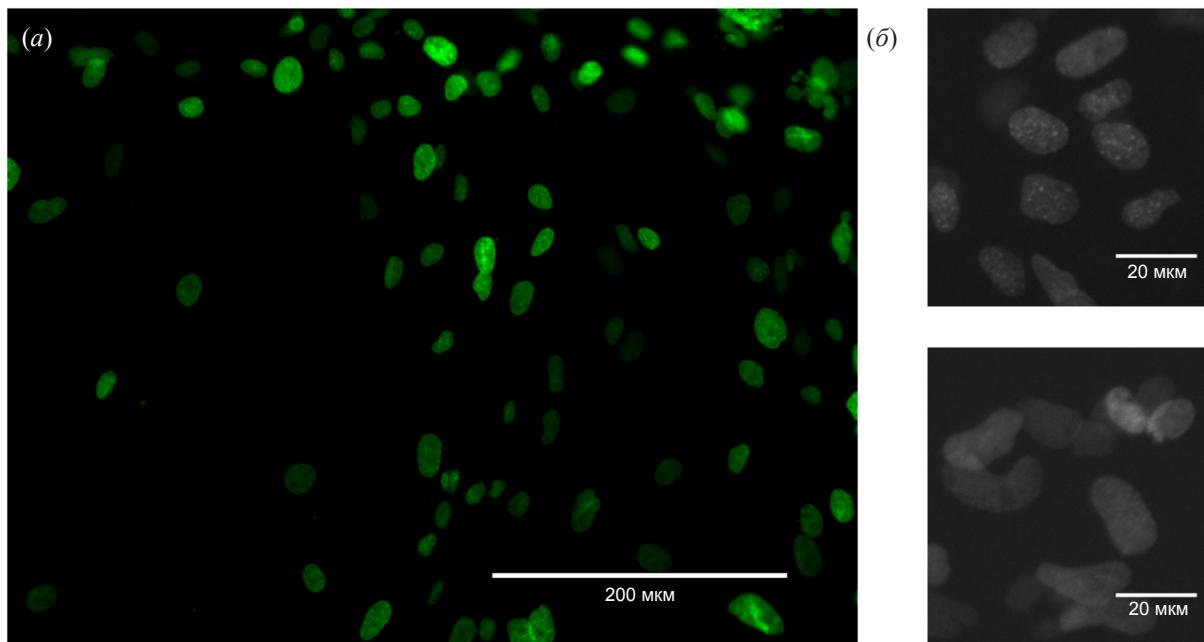


Рис. 2. (a) – Флуоресцентная микроскопия MPP8-Green в сформировавшихся эмбрионидных тельцах; (б) – флуоресцентная микроскопия двух различных групп дифференцированных клеток: сверху клетки с эпигенетическими “точками”, снизу клетки с диффузным распределением сенсора.

эпигенетических распределений мы выделили две группы: специфическое распределение Н3К9me3 с характерными эпигенетическими точками и диффузное распределение сенсора по всему ядру (рис. 2б). Таким образом, мы показали, что сенсор MPP8-Green может быть использован для отслеживания Н3К9me3 во время спонтанной дифференцировки и формирования эмбрионидных телец. Более того, мы смогли выделить две группы с различным распределением Н3К9me3.

Стволовые клетки представляют собой важный инструмент в современной биологии и медицине, открывая новые горизонты для регенеративной терапии и моделирования заболеваний [14]. Их уникальная способность к самовозобновлению и дифференцировке в различные клеточные типы позволяет использовать данную модель клеток во многих областях научных исследований. Одно из важных свойств плюрипотентных стволовых клеток – их способность формировать эмбрионидные тельца [10, 15]. Эти трехмерные структуры клеток

образуются при спонтанной дифференцировке индуцированных плорипотентных стволовых клеток. Они служат мощным инструментом для моделирования ранних этапов эмбрионального развития и исследования дифференцировки в три зародышевых слоя: эктодерму, мезодерму и эндодерму. Такие исследования важны для разработки новых методов лечения различных заболеваний, а также для исследования процессов дифференцировки. Более того, эмбриоидные тельца позволяют тестировать влияние различных химических соединений на развитие клеток, что способствует созданию более эффективных и безопасных химических соединений.

Эмбриоидные тельца формируются в результате процесса спонтанной дифференцировки иПСК, отследить который достаточно сложно, т.к. одновременно происходит множество процессов, в которых участвуют различные гены, а также эпигенетическая регуляция этих генов [15]. Один из видов эпигенетической регуляции – регуляция на уровне гистонов, а именно посттрансляционных модификаций гистонов. *N*-концевые концы гистонов содержат различные комбинации ковалентных посттрансляционных модификаций, которые участвуют в создании уникального пространственно-временного состояния хроматина живой клетки. Совокупность эпигенетических модификаций образует уникальный код, считывание которого выполняет группа белков, “ридеров”, передающих эпигенетическую информацию другим регуляторным механизмам клетки. Каждый “ридерный” белок имеет в своем составе HMRD-домен, узнающий определенную эпигенетическую модификацию гистона. Нами были разработаны различные сенсоры для визуализации H3K9me3 с использованием природного “ридерного” домена MPP8 [12, 16]. Комбинируя визуализацию и мультипараметрический анализ Microscopic Imaging of Epigenetic Landscapes (MIEL) [12], мы разработали новый метод LiveMIEL, который позволяет отслеживать гистоновые модификации и выявлять изменения H3K9me3, которые невозможно увидеть невооруженным глазом.

В данной работе мы показали распределение эпигенетического ландшафта H3K9me3 с помощью сенсора MPP8-Green в эмбриоидных тельцах. В отличие от традиционного метода иммуноокрашивания, который требует фиксации клеток, наш сенсор позволяет отслеживать динамику

H3K9me3 при формировании эмбриоидных телец. В предыдущей работе было показано, что сенсор не влияет на процесс направленной дифференцировки иПСК в индуцированные нейроны, и его экспрессия сохраняется без отрицательных последствий для судьбы дифференцированных клеток [12]. В данной работе мы также не обнаружили влияния сенсора на процесс спонтанной дифференцировки. Наши результаты показали, что в ходе спонтанной дифференцировки и формирования эмбриоидных телец экспрессия сенсора сохраняется, хотя небольшое количество клеток утрачивает экспрессию. Кроме того, в сформировавшихся эмбриоидных тельцах были выявлены две группы клеток с резко различающимся эпигенетическим ландшафтом, специфичным к H3K9me3. Первая группа характеризуется распределением H3K9me3, характерным для иПСК, с выраженным эпигенетическим “точками”. Вторая группа состоит из клеток, в ядрах которых замечено диффузное распределение сенсора без хроматиновых “точек”. Известно, что H3K9me3 является маркером транскрипционно неактивных генов [6, 18]. Исследуемый нами процесс спонтанной дифференцировки сопровождается активацией транскрипции различных генов, предположительно снижая общий уровень метилирования в ядре. Возможно, в силу этого формируются группы клеток с диффузным распределением сенсора по всему ядру клетки. В идеальном варианте мы хотели бы проследить за динамикой H3K9me3 на протяжении всего процесса формирования эмбриоидных телец, чтобы выявить ключевые моменты изменения эпигенетического ландшафта данной гистоновой модификации. Однако, поскольку процесс формирования эмбриоидных телец занимает около трех недель, ежедневный мониторинг изменений H3K9me3 достаточно трудоемкий. Мы надеемся, что в будущих исследованиях мы научимся отслеживать динамику H3K9me3 в течение длительных клеточных процессов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Работа со стволовыми клетками.** Для культивирования иПСК (получение линии KU1FMSi004-A-1 описано в работе [12]) чашки Петри покрывали раствором матригеля (Corning, США). Клетки культивировали в среде mTESR1 (Stem Cell Technologies, Канада) при 37°C в CO<sub>2</sub>-

инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> и 100%-ной влажности. Клетки пассировали при достижении 80%-ной конфлюентности. Для этого использовали раствор аккутазы (Corning, США), затем осадок клеток промывали последовательно раствором Дульбекко (DPBS) без кальция и магния (ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин в центрифуге 5702 (Eppendorf, Германия). Осадок клеток ресуспендировали в среде mTESR1, в среду добавляли ROCKi (Y27632, Sigma-Aldrich, США) в количестве 5 мкМ.

**Получение лентивируса и трансдукция.** Лентивирусы были получены в клетках HEK293T (10<sup>6</sup> клеток в 10-см чашке Петри) путем котрансфекции двумя упаковочными плазмидами (R8.91 и pVSVG) в следующих количествах: 10 мкг ДНК лентивирусного вектора, 4 мкг R8.91 и 1 мкг pVSVG. В качестве трансфекционного реагента использовали PEI 25K (Polysciences, США). Клетки HEK293T трансфицировали путем липофекции в течение 4 ч, затем среду аспирировали и добавляли 4 мл полной ростовой среды (DMEM (ПанЭко, Россия), 10%-ная фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия), 1 мМ Glutargo (Corning, США), 1 мМ пируват натрия (Gibco, США), пенициллин-стрептомицин (50 ед./мл; 50 мкг/мл) (Gibco, США)). Сбор лентивирусных комплексов осуществляли через 48 ч после трансфекции, центрифугировали в течение 5 мин при комнатной температуре, стерилизовали через фильтр 0.45 мкм и подвергали ультрацентрифугированию при 20 000 g (Beckman, США).

**Эмбриоидные тельца.** ИПСК пассировали и пересаживали в плотности 5 × 10<sup>5</sup> на 6-см чашку Петри, покрытую матригелем. Клетки культивировали в mTESR1 (StemCellTechnologies, США) до получения колоний небольшого размера в течение 3–4 сут. После кратковременной обработки диспазой (Dispase, кат. № 17105041; ThermoFisher, США) колонии клеток помещали в чашки Петри с низкой адгезией (Ultra-Low Culture Dish, кат. № 3261; Corning, США) и инкубировали в mTESR1 в течение 2 сут, затем постепенно заменяли среду на специальную, имеющую следующий состав: DMEM/F12, смесь незаменимых аминокислот (NEAA), 20% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США), 10 мМ пирувата натрия (Gibco, США), 1 мМ Glutargo (Corning, США) и 100 ед./мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептоми-

цина. После культивирования в течение 10 сут сформированные шарообразные колонии переносили на 8-луночные планшеты, предварительно покрытые матригелем, и культивировали в течение 7–10 сут до получения прикрепленных сформированных колоний.

**Окрашивание антителами.** Для окрашивания антителами клетки фиксировали 4%-ным забуференным формальдегидом в течение 15 мин. Подготовку клеток к окрашиванию проводили с помощью 0.1%-ного Тритона X-100 (Хеликон, Россия), забуференного фосфатным буфером, блокировка в 1%-ном БСА (Sigma, США), разведенном в фосфатном буфере. Первичные антитела разводили в фосфатном буфере с 0.02% БСА и инкубировали 12 ч при 7°C. После 3-кратного промывания фосфатным буфером добавляли вторичные антитела, разведенные в 1000 раз, на 1 ч и краситель DAPI на 15 мин.

Для окрашивания на маркеры дифференцировки использовали следующие антитела: антидесмин, кролик (Rabbit anti-Desmin, Abcam, США, кат. № Ab15200), анти-α-фетопротеин, мышь (Mouse anti-αFP, Abcam, США, кат. № Ab3980), анти-PAX6, кролик (Rabbit anti-PAX6, Белкиантителя, Россия, кат. № PAH446Ra01), анти-FOXA, кролик (Rabbit anti-FOXA, Sigma-Aldrich, США, кат. № 07633), антинестин, мышь (Mouse Anti-Nestin, BioLegend, Китай, кат. № 656801), антигладкомышечный актин, мышь (Mouse anti-αSMA, Sigma-Aldrich, США, кат. № A5228).

**Микроскопия.** Микроскопию проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) на базе инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer.Z1 Zeiss, оснащенного шестью лазерными линиями (633, 594, 561, 543, 514, 488 и 405 нм), пятью объективами (EC Plan-Neofluar 5×/0.16, EC Plan-Neofluar 10×/0.3, PL APO 20×/0.8, PL APO 40×/0.95, PL APO 63×/1.4 Oil DIC) и LSM-программным обеспечением ZEN 2. Были использованы следующие полосы пропускания: DAPI 410–579 нм, FITC/eGFP 493–579 нм, TurboFP635 582–754 нм, Alexa Fluor-594 585–733 нм.

Флуоресцентную микроскопию живых клеток проводили на инвертированном микроскопе NIB610-FL (Nexscope, Китай) с использованием светодиодного возбуждения в области 485 и 405 нм и объектива с увеличением 20×. Также

использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп BZ-9000 (Keyence, Япония).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линия iPSC, стабильно экспрессирующая флуоресцентный сенсор эпигенетической модификации MPP8-Green, сохраняет способность к спонтанной дифференцировке. Было показано, что при спонтанной дифференцировке клетки продолжают экспрессировать сенсор. Визуализация паттернов экспрессии сенсора позволила выделить в эмбриональных тельцах как минимум две популяции клеток, отличающихся по паттерну метилирования К3 гистона H3 (H3K9me3). Было показано, что с помощью сенсора MPP8-Green можно проводить детальный анализ эпигенетических изменений гистонов на уровне отдельных живых клеток и их субпопуляций. Таким образом, использование генетически кодируемых сенсоров, таких как MPP8-Green, представляет собой эффективный инструмент для изучения эпигенетических изменений в живых клетках, который в совокупности с алгоритмом обработки изображений LIVEMIEL может значительно продвинуть знания в области биологии стволовых клеток.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00141).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – НГГ; экспериментальные работы – АИС, ЕБЖ, ААГ, ЭБД, ЛВП; написание статьи – АИС, НГГ; администрирование проекта – НГГ, КАЛ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

## ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bou Kheir T., Lund A.H.* // Essays Biochem. 2010. V. 48. P. 107–120.  
<https://doi.org/10.1042/bse0480107>
2. *Crouch J., Shvedova M., Thanapaul R.J.R.S., Botchkarev V., Roh D.* // Cells. 2022. V. 11. P. 672.  
<https://doi.org/10.3390/cells11040672>
3. *Jambhekar A., Dhall A., Shi Y.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. P. 625–641.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1>
4. *Millán-Zambrano G., Burton A., Bannister A.J., Schneider R.* // Nat. Rev. Genet. 2022. V. 23. P. 563–580.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
5. *Bannister A.J., Kouzarides T.* // Cell Res. 2011. V. 21. P. 381–395.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
6. *Nicetto D., Zaret K.S.* // Curr. Opin. Genet. Dev. 2019. V. 55. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.013>
7. *Stepanov A.I., Besedovskaya Z.V., Moshareva M.A., Lukyanov K.A., Putlyanova L.V.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 8988.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23168988>
8. *Yin M., Wu J., Workman J.L., Li B.* // Cell Res. 2011. V. 21. P. 564–578.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.42>
9. *Sánchez O.F., Mendonça A., Min A., Liu J., Yuan C.* // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 13250–13259.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01413>
10. *Brickman J.M., Serup P.* // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2017. V. 6.  
<https://doi.org/10.1002/wdev.259>
11. *Dar A., Gerecht-Nir S., Itskovitz-Eldor J.* // Chapter 27. Human Vascular Progenitor Cells. In: *Essentials of Stem Cell Biology (Second Edition)* / Eds. Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomas E.D., Thomson J., Wilmot I. San Diego: Academic Press, 2009. P. 227–232.
12. *Stepanov A.I., Shuvaeva A.A., Putlyanova L.V., Lukyanov D.K., Galiakberova A.A., Gorbachev D.A., Maltsev D.I., Pronina V., Dylov D.V., Terskikh A.V., Lukyanov K.A., Gurskaya N.G.* // Cell Mol. Life Sci. 2024. V. 81. P. 381.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-024-05359-0>
13. *Müller I., Moroni A.S., Shlyueva D., Sahadevan S., Schoof E.M., Radzishevskaya A., Højfeldt J.W., Tatar T., Koche R.P., Huang C., Helin K.* // Nat. Commun. 2021. V. 12. P. 3034.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23308-4>
14. *Cerneckis J., Cai H., Shi Y.* // Signal Transduct. Target Ther. 2024. V. 9. P. 112.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01809-0>

15. Lin Y., Chen G. // Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media. 2014. In: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008.
16. Stepanov A.I., Zhurlova P.A., Shuvaeva A.A., Sokolinskaya E.L., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Putlyayeva L.V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2023. V. 687. P. 149174. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.149174>
17. Farhy C., Hariharan S., Ylanko J., Orozco L., Zeng F.Y., Pass I., Ugarte F., Forsberg E.C., Huang C.T., Andrews D.W., Terskikh A.V. // eLife. 2019. V. 8. P. e49683. <https://doi.org/10.7554/elife.49683>
18. Becker J.S., Nicetto D., Zaret K.S. // Trends Genet. 2016. V. 32. P. 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>

## Visualization of H3K9me3 in Embryoid Bodies Using Genetically Encoded Fluorescent Sensor MPP8-Green

**A. I. Stepanov\*, \*\*, E. B. Zhigmitova\*\*\*, E. B. Dashinimaev\*\*\*, A. A. Galiakberova\*\*\*, L. V. Putlyayeva\*, \*\*, K. A. Lukyanov\*\*, and N. G. Gurskaya\*, \*\*, \*\*\*, #**

# *E-mail: gurskayanadya@gmail.com*

\* Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoi bul. 30/1, Moscow, 121205 Russia

\*\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*\* Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

Epigenetic histone modifications play a key role in the differentiation of stem cells into various cell types. The ability of induced pluripotent stem cells (iPSCs) to differentiate is assessed using the embryoid body formation method, which is widely used and prevalent in iPSC research. In this study, we utilized a stable line of iPSCs with a genetically encoded sensor MPP8-Green to visualize the histone modification H3K9me3 during embryoid body formation. We identified two groups of cells based on the distribution of H3K9me3 in the formed embryoid bodies, using the MPP8-Green sensor. This study demonstrates that the MPP8-Green sensor can be used to track the dynamics of H3K9me3 during spontaneous differentiation and embryoid body formation. Using the sensor, we identified two groups of cells with different distributions of H3K9me3 and showed the potential application of such genetically encoded tools to reveal differences in patterns of epigenetic modifications during the spontaneous differentiation of iPSCs.

*Keywords:* iPSC, embryoid bodies, histones, methylation, epigenetic regulation, fluorescence microscopy