

*На правах рукописи*

**ПАНОВА Александра Витальевна**

**Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной  
X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках  
человека *in vitro***

Специальность 03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории генетики развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

**Научный  
руководитель:**

доктор биологических наук, профессор,  
**КИСЕЛЕВ Сергей Львович**, заведующий  
лабораторией, Институт общей генетики им.  
Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

**Официальные  
оппоненты:**

доктор биологических наук, доцент,  
**СТРЕЛЬНИКОВ Владимир Викторович**,  
заведующий лабораторией, ФГБНУ «Медико-  
генетический научный центр», г. Москва

доктор биологических наук, профессор,  
**ЗАКИЯН Сурен Минасович**, заведующий  
лабораторией эпигенетики развития  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Федеральный  
исследовательский центр Институт цитологии и  
генетики Сибирского отделения Российской  
академии наук», г. Новосибирск

**Ведущая  
организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт химической  
биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии  
наук, г. Новосибирск

Защита состоится «22» марта 2018 г. в \_\_ часов \_\_ минут на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) – клетки, способные дать начало всем тканям будущего организма, являются уникальным объектом для изучения процессов раннего эмбрионального развития, дифференцировки, регуляции работы генов, эпигенетических механизмов развития. Если для многих видов млекопитающих, таких как мышь, крыса и другие, доступны методы работы с эмбрионами, то для изучения человека ПСК становятся уникальным объектом, поскольку дают возможность как изучения фундаментальных процессов генетической и эпигенетической регуляции, так и практического применения. Впервые ПСК были выведены в культуру как линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши в 1981 году, а человека – в 1998 году (Evans & Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). Особенностью ЭСК является то, что нетрансформированные клетки могут неограниченно пролиферировать в культуре, сохраняя свойство плюрипотентности. В 2006 году была разработана технология генетического репрограммирования, позволяющая получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток взрослого организма (Takahashi & Yamanaka, 2006). ИПСК обладают теми же свойствами, что и ЭСК: являются плюрипотентными и обладают способностью к самообновлению *in vitro*. Наличие дозовой компенсации в женских клетках млекопитающих даёт возможность изучения эпигенетических процессов: на ранних этапах эмбрионального развития происходит каскад событий, приводящих к гетерохроматинизации одной из двух X-хромосом в соматических клетках. До сих пор открытым является вопрос о взаимосвязи состояния активности X-хромосомы и состояния плюрипотентности: ПСК человека могут обладать как полностью неактивной, так и двумя активными X-хромосомами, хотя в ПСК мыши с генотипом XX всегда присутствуют две активные X-хромосомы. Причина такой вариабельности состояния инактивации X-хромосомы человека неясна. Одним из объяснений таких различий между ПСК мыши и человека может служить недавнее предположение о том, что ПСК мыши находятся в «более плюрипотентном», так

называемом наивном состоянии. А ПСК человека, находясь, в так называемом, праймированном состоянии, схожем с состоянием клеток эпибласта мыши после имплантации бластоцисты, когда уже наблюдается инактивация X-хромосомы (Nichols & Smith, 2009). При этом возможность получения ПСК человека в наивном состоянии и статус X-хромосомы в этих клетках до сих пор недостаточно изучены. Помимо этого, недостаточно изучен вопрос об эпигенетических характеристиках, присущих неактивной X-хромосоме человека в плюрипотентном состоянии. Как правило, при изучении инактивации X-хромосомы анализируются такие характеристики, как экспрессия гена *XIST*, запускающего инактивацию, гистоновая модификация H3K27me3 на X-хромосоме, характерная для неактивного хроматина. Однако, такие характеристики, как время репликации X-хромосомы, и недавно обнаруженная модификация цитозина, характерная для стадии активного деметилирования ДНК – 5-гидроксиметилцитозин – остаются не изученными в ПСК человека. Кроме фундаментальных вопросов, касающихся эпигенетического статуса X-хромосомы, встаёт вопрос возможности регулирования состояния X-хромосомы при использовании ПСК для дальнейшего практического применения.

**Цель данного исследования** – изучение особенностей эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских линиях плюрипотентных стволовых клеток человека и возможности его регулирования.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать особенности инактивации X-хромосомы в линиях ЭСК человека с генотипом XX.
2. Изучить время репликации и распределение районов активного деметилирования ДНК по наличию 5-гидроксиметилцитозина на неактивной X-хромосоме в линиях ЭСК человека.
3. Изучить особенности инактивации X-хромосомы и возможности её реактивации в линиях ЭСК при эпигенетическом репрограммировании до наивного состояния.

4. Исследовать особенности инактивации X-хромосомы в различных линиях ИПСК и возможности её реактивации при эпигенетическом репрограммировании до наивного состояния.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Линии эмбриональных и репрограммированных ПСК человека с генотипом XX проявляют вариабельность по функциональному и эпигенетическому состоянию инактивированной X-хромосомы.
2. При генетическом или эпигенетическом репрограммировании время репликации участков X-хромосомы и распределение маркера активного деметилирования ДНК 5-гмЦ отражает районы реактивации и может являться маркером состояния X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека.
3. Эпигенетическое репрограммирование плюрипотентных стволовых клеток человека до наивного состояния приводит к потере маркера неактивного хроматина H3K27me3 на X-хромосоме, потере экспрессии гена *XIST*, а также реактивация обширных районов X-хромосомы, однако этот процесс является необратимым.

**Научная новизна.** Впервые показано, что время репликации X-хромосомы отражает районы реактивации и может являться маркером состояния X-хромосомы в ПСК человека. Впервые показано, что распределение маркера активного деметилирования 5-гидроксиметилцитозина совпадает с эухроматиновыми районами и участками ранней репликации и может служить маркером состояния X-хромосомы в ПСК человека. Показано, что степень компактизации территории X-хромосомы в интерфазном ядре не коррелирует с состоянием инактивации X-хромосомы в ПСК человека. На коллекции линий ПСК человека (5 линий ЭСК и 3 линии ИПСК), полученных в разных лабораториях мира, показано, что эпигенетическое репрограммирование до наивного состояния не приводит к полной реактивации X-хромосомы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты данного исследования вносят вклад в понимание эпигенетических механизмов регуляции

дозовой компенсации X-хромосомы на ранних этапах развития человека, дают возможность более точно характеризовать эпигенетическое состояние X-хромосомы, что является актуальной задачей при моделировании X-сцепленных заболеваний, где необходима точная характеристика состояния X-хромосомы как в ИПСК, так и после дифференцировки. Практическая ценность работы заключается в разработке технологии культивирования ПСК человека в наивных условиях, приближающих клетки *in vitro* к их природному аналогу *in vivo*.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Chromatin, Replication and Chromosomal Stability (Copenhagen, 2013), The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, (Osaka, 2014), VI съезде ВОГиС (Ростов-на-Дону, 2014), International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting (Stockholm, 2015), III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, 2017).

**Личный вклад автора.** Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Культивирование клеточных линий проводилось совместно с Лагарьковой М.А., Некрасовым Е.Д., Филоненко Е.С. Эксперименты по иммуногистохимическому окрашиванию, флуоресцентной гибридизации *in situ* и определению времени репликации проводились совместно с Богомазовой А.Н.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 98 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение и выводы. Диссертация содержит 24 рисунка и 6 таблиц. Библиографический указатель содержит 87 источников.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 5 тезисов докладов и материалов конференций.

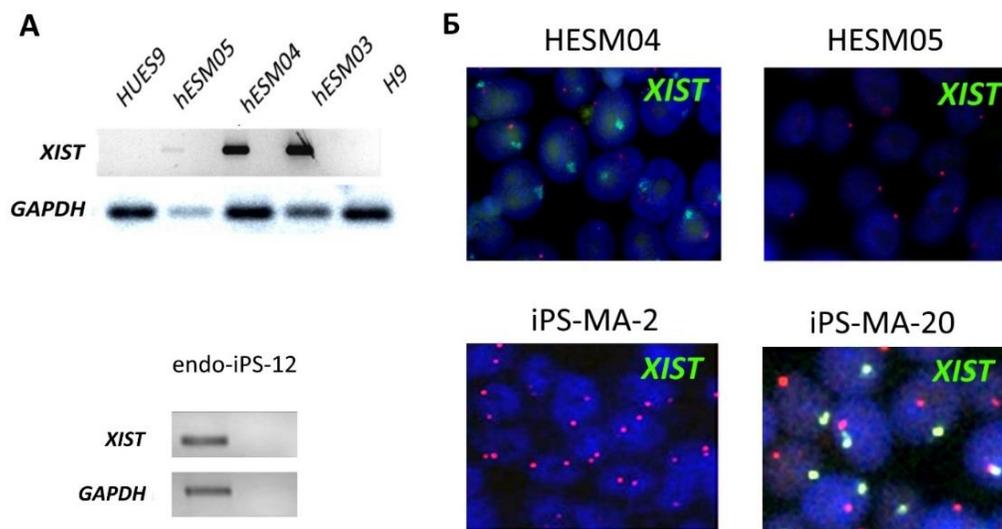
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные методы исследования включали: культивирование линий ЭСК человека, переданных для исследований из Университета Висконсина, США (линия H9), Д. Мелтона, США (линия HUES9), а также линий, полученных в лаборатории ранее (линии ЭСК HESM03, HESM04, HESM05) (Киселев С.Л. с соавт., 2006), культивирование пациент-специфичных линий ИПСК в бесфидерных условиях или на фидере, культивирование ПСК в наивных условиях, иммуногистохимическое окрашивание, ДНК- и РНК-флуоресцентная гибридизация *in situ*, определение времени репликации с помощью пульс-мечения модифицированным нуклеозидом, анализ степени компактизации территорий X-хромосом, ПЦР, ПЦР в реальном времени, спонтанная дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ В ПСК ЧЕЛОВЕКА (ЭСК И ИПСК)

**Экспрессия гена *XIST*.** Инактивация X хромосомы в женских клетках начинается с экспрессии гена *XIST*. Для определения экспрессии гена *XIST* было использовано два экспериментальных подхода. Метод ОТ-ПЦР позволяет обнаружить наличие транскриптов гена *XIST* (Рис.1А), однако наличие фрагментов РНК гена не несет информации о функциональной активности гена. Для подтверждения функциональности РНК гена *XIST* был использован метод РНК-FISH. Он позволяет детектировать молекулы РНК гена *XIST* в виде компактно расположенных многочисленных молекул, покрывающих неактивную X-хромосому и формирующих «облако» (Рис.1Б). Проведенный анализ женских линий ЭСК человека показал, что линии HESM03, HESM04 экспрессируют ген *XIST*, а линии HESM05, H9 и HUES9 не экспрессируют его. Проведенный анализ линий ИПСК человека показал, что линии endo-iPS-12, iPS-MA-20 экспрессируют ген *XIST*, а изогенные линии iPS-MA-1, iPS-MA-2 не экспрессируют его. Таким образом, несмотря на идентичность культивирования различных линий ПСК, мы наблюдаем

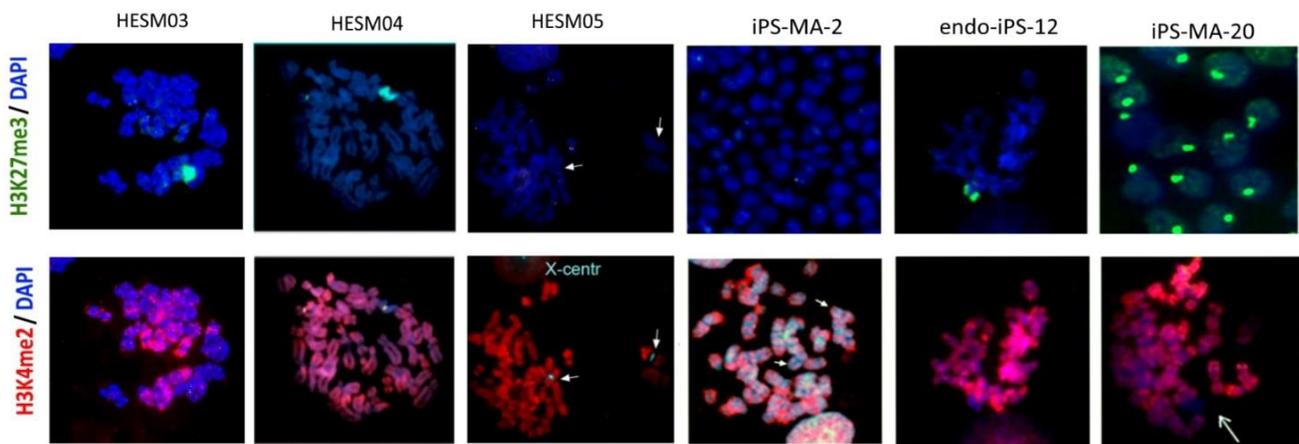


**Рисунок 1.** Анализ экспрессии гена *XIST* в ЭСК и ИПСК человека. А. Экспрессия гена *XIST* с помощью ОТ-ПЦР. Б. Детекция транскрипта гена *XIST* (зелёным цветом), покрывающего инактивированную X-хромосому с помощью метода FISH.

вариабельность между линиями по экспрессии гена *XIST*, запускающего процесс инактивации X-хромосомы (Рис.1А, Б).

**Гистоновые модификации X-хромосомы.** Основной модификацией, характерной для инактивированной X-хромосомы, является наличие трех метильных групп у лизина в 27 положении, входящего в состав гистона H3 (H3K27me3). Как и в случае с экспрессией *XIST*, при анализе гистоновых модификаций мы наблюдали два типа клеточных линий: линии, в которых X-хромосома была обогащена H3K27me3 гистоновой модификацией: HESM03, HESM04; и линии без обогащения гистоновой модификацией H3K27me3: HESM05, HUES9 (Рис.2). Кроме этого было проведено окрашивание на маркер активного хроматина: двойное метилирование лизина, входящего в состав гистона H3 и находящегося в четвертом положении (H3K4me2). Оказалось, что в случае обогащения X-хромосомы модификацией H3K27me3, в линиях HESM03, HESM04 наблюдалось отсутствие марки активного хроматина H3K4me2 (Рис.2). При анализе гистоновых модификаций в репрограммированных клетках (ИПСК) мы наблюдали два типа клеточных линий: линии, в которых X-хромосома была обогащена H3K27me3 гистоновой модификацией: iPS-MA-20,

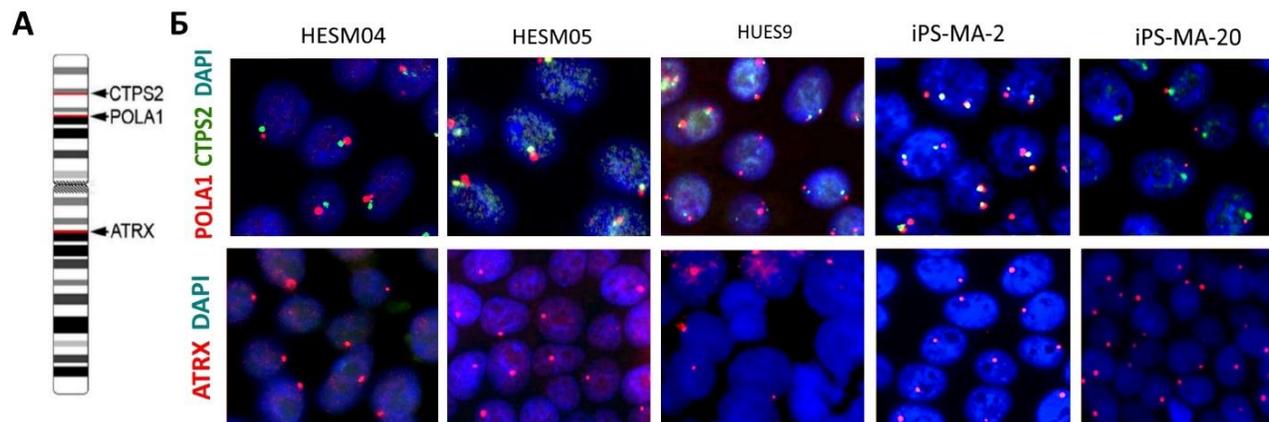
endo-iPS-12, и линии без обогащения на H3K27me3, т.е. обе X-хромосомы окрашиваются с той же интенсивностью, что и аутосомы в клетке: iPS-MA-2. В линиях ИПСК, как и в ЭСК, в случае обогащения X-хромосомы модификацией H3K27me3, наблюдалось отсутствие марки активного хроматина H3K4me2 на инактивированной X-хромосоме (Рис.2). Таким образом, не смотря на идентичность культивирования линий ПСК, мы наблюдаем вариабельность между линиями по наличию на X-хромосоме гистоновых модификаций активного (H3K4me2) и неактивного (H3K27me3) хроматина. Следует отметить, что в клеточных линиях с X-хромосомой, обогащением маркой H3K27me3, наблюдалась экспрессия гена *XIST* (линии HESM03, HESM04, endo-iPS-12, iPS-MA-20), а в линиях без H3K27me3 – экспрессии гена *XIST* не наблюдалось (линии HUES9, HESM05, iPS-MA-2).



**Рисунок 2.** Характеристика состояния хроматина X-хромосомы в ЭСК и ИПСК человека. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами на гистоновую модификацию неактивного хроматина H3K27me3 (зелёный) и на гистоновую модификацию активного хроматина H3K4me2 (красный).

**Экспрессия X-сцепленных генов.** Для определения транскрипционной активности генов, расположенных на X-хромосоме, нами были выбраны три гена, не расположенных в псевдоаутосомных районах и не избегающих X-инактивацию: *POLA1*, *CTPS2*, *ATRX* (Рис.3А). При наличии полностью инактивированной X-хромосомы в клетке экспрессируется лишь один из аллелей каждого из этих

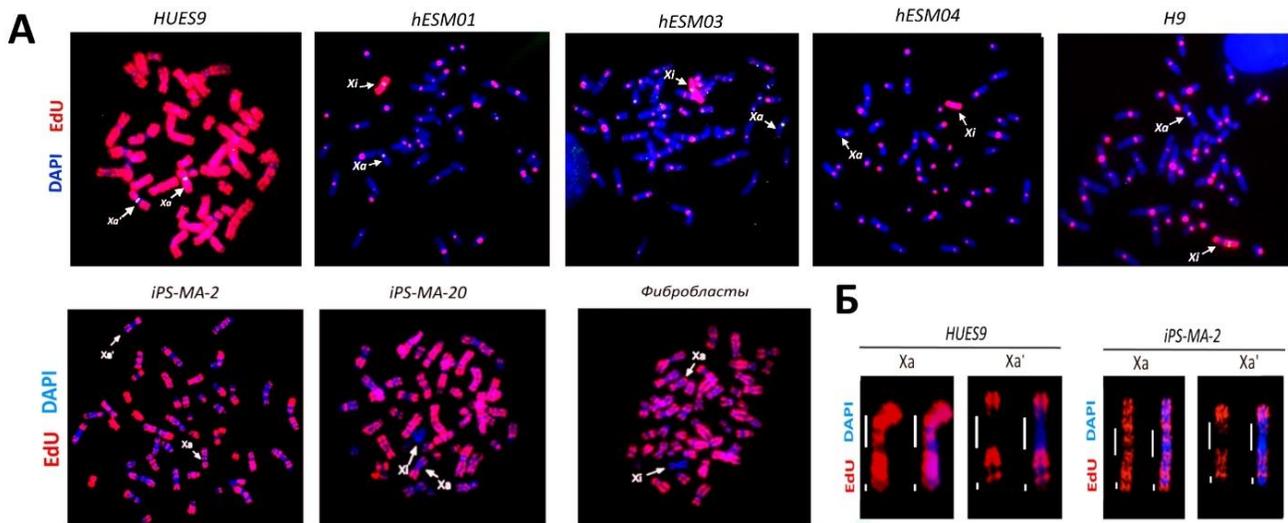
генов. В случае биаллельной экспрессии генов можно сделать вывод о том, что районы локализации этих генов на обоих X-хромосом активны. На транскрипционную активность этих генов были охарактеризованы три линии ЭСК (HESM04, HESM05 и HUES9) и две изогенные линии ИПСК (iPS-MA-2 и iPS-MA-20) с помощью метода флуоресцентной гибридизации с РНК *in situ*. Для линий HESM04 и iPS-MA-20 в интерфазном ядре детектировалось по одному точечному сигналу для каждого из трёх генов (Рис.3Б), что говорит о моноаллельной экспрессии *POLA1*, *CTPS2*, *ATRX* в этих клеточных линиях. В этих же линиях экспрессировался ген *XIST*, присутствовало окрашивание на марку неактивного хроматина H3K27me3, что в совокупности говорит об инактивации X хромосомы в клетках этих линий. Для линий ЭСК HUES9 и ИПСК iPS-MA-2 в интерфазном ядре детектировалось по два точечных сигнала гибридизации генов *POLA1* и *CTPS2* (Рис.3Б), что говорит о биаллельной экспрессии этих генов в линиях HUES9 и iPS-MA-2. Однако, при гибридизации РНК с пробой к гену *ATRX* в этих линиях присутствовало лишь по одному точечному сигналу в каждой клетке



**Рисунок 3.** Изучение аллельной экспрессии генов с X хромосом в ЭСК и ИПСК человека. А. Положение генов *POLA1*, *CTPS2*, *ATRX* на X-хромосоме. Б. Экспрессия X-сцепленных генов *POLA1*, *CTPS2*, *ATRX* методом FISH. Экспрессия гена детектируется в виде одного точечного сигнала в ядре в случае моноаллельной экспрессии, и в виде двух точечных сигналов в ядре в случае биаллельной экспрессии каждого гена.

(Рис.3Б), что говорит о моноаллельной экспрессии гена *ATRX*. Таким образом, при анализе экспрессии X-сцепленных генов в линиях ЭСК и ИПСК человека обнаружили, вариабельность между линиями по экспрессии генов, локализованных на инактивированной X-хромосоме. Нужно отметить, что для линии ЭСК HESM05 в интерфазном ядре детектировалось по одному точечному сигналу для каждого из трёх генов (Рис.3Б), что говорит о моноаллельной экспрессии генов *POLA1*, *CTPS2*, *ATRX* в этой клеточной линии, и соответственно полностью инактивированной X-хромосоме, несмотря на отсутствие *XIST* и H3K27me3 в этой линии. В связи с этим задачей исследования стал поиск дополнительных эпигенетических характеристик, демонстрирующих инактивацию X-хромосомы в женских ПСК человека.

**Время репликации неактивной X-хромосомы.** Активная X-хромосома реплицируется одновременно с аутосомами, в то время как инактивированная X-хромосома реплицируется позднее. Это является функциональным параметром, характеризующим ее активность. Для изучения времени репликации X-хромосомы был использован метод введения модифицированного нуклеозида 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) - аналога тимидина, встраивающегося вместо него в новую цепь ДНК во время репликации. Клетки были пульс-мечены с помощью EdU, а встроившийся в цепь ДНК EdU выявлялся на метафазных хромосомах с помощью клик-реакции с флуоресцирующим азидом. При сравнении двух X-хромосом и аутосом одной клетки в линиях с инактивированной X-хромосомой, чётко детектируется включение EdU в одну из X-хромосом и эухроматиновые районы аутосом, отражая раннюю S-фазу клеточного цикла. Вторая X-хромосома не включает EdU, это означает, что её репликация происходит в более поздней S-фазе. Было показано, что в линиях HESM05, HESM03, HESM04, H9 и iPS-MA-20 две X-хромосомы реплицировались асинхронно (Рис.4А). Однако, в линиях ЭСК HUES9 и ИПСК iPS-MA-2 паттерн включения EdU в цепи ДНК двух X-хромосом в одной и той же клетке очень схож (Рис.4Б), т.е. репликация обеих X-хромосом происходила синхронно. Более позднюю репликацию имели только два района: дистальная часть

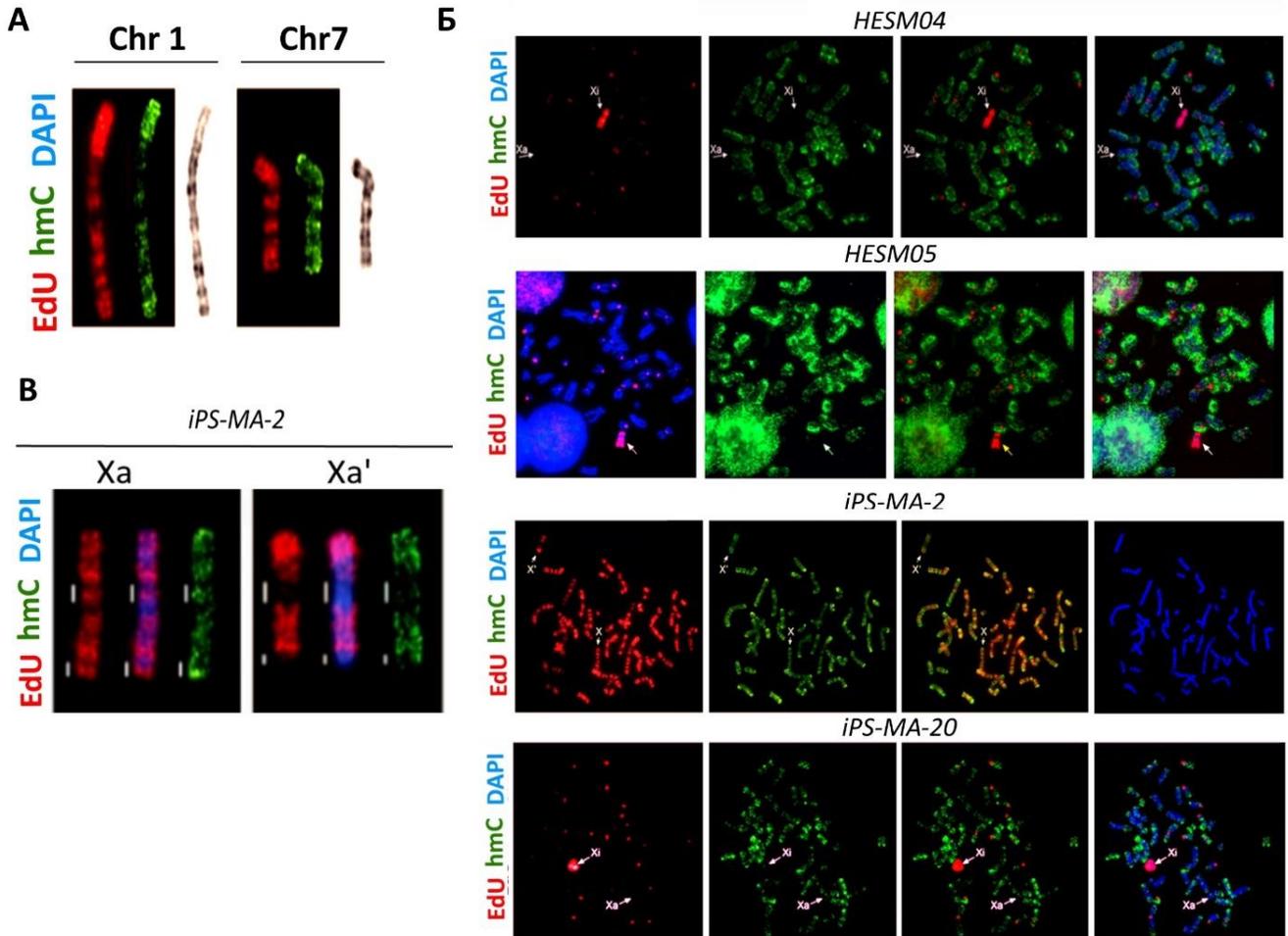


**Рисунок 4.** Изучение времени репликации X-хромосомы в ЭСК и ИПСК человека. А. Пульс-меченные линии ПСК. Красным цветом показано включение EdU в цепь ДНК. Линии HUES9 и iPS MA 2 обнаруживает синхронную репликацию двух X-хромосом каждой клетки. Б. линий Синхронная репликацию двух X-хромосом в каждой клетки указанных линий за исключением двух районов X-хромосомы с асинхронной репликацией: перичентромерный район и дистальная часть q-плеча одной из X-хромосом.

q-плеча и перичентромерный район (Рис.4Б). Таким образом, в линиях ЭСК HUES9 и ИПСК iPS-MA-2 наблюдается частично синхронная репликация двух X-хромосом. В линиях HESM05, HESM03, HESM04, H9 детектируется асинхронная репликация X-хромосом в каждой клетке.

**Гидрокси метлирование ДНК.** Недавно был описан механизм активного деметилирования ДНК (Ito et al., 2010; Stroud et al., 2011), приводящий к окислению 5-метилцитозина в последовательности ДНК и образованию 5-гидрокси метилцитозина (5-гмЦ). Было показано, что модификация ДНК 5-гмЦ практически не обнаруживается в районах гетерохроматина в ЭСК человека (Szulwach et al., 2011). Мы предположили, что в случае инактивной X-хромосомы районы гетерохроматина, которые реплицируются в поздней S-фазе клеточного цикла, будут иметь низкий уровень 5-гмЦ, а обогащение районов 5-гмЦ модификацией будет отражать процессы активного деметилирования и реактивацию этих районов. Мы проанализировали распределение 5-гмЦ на аутосомах и

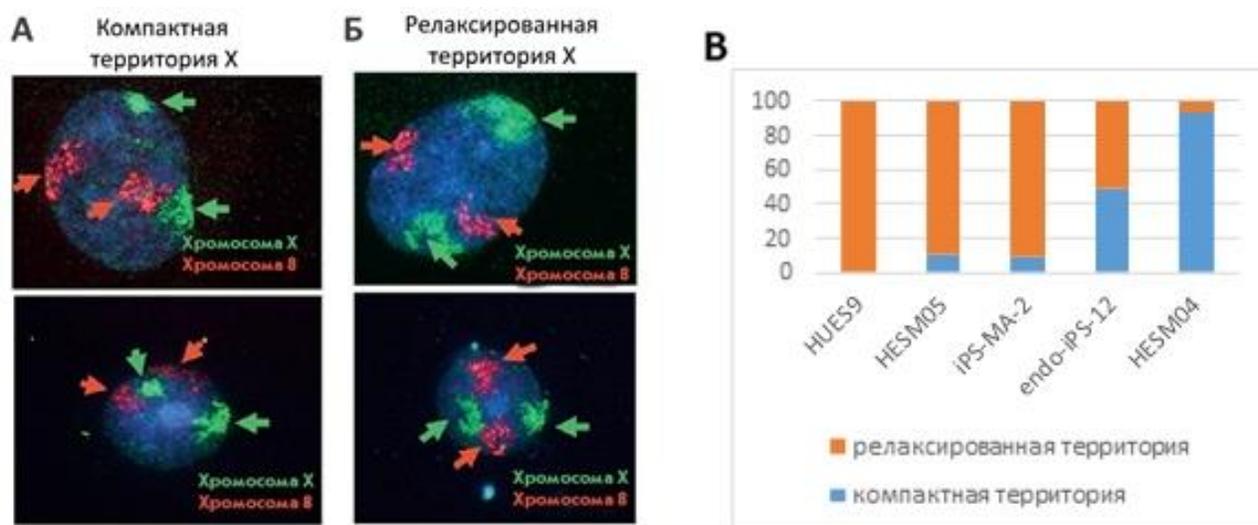
X-хромосомах в линиях ПСК человека. Для анализа распределения 5-гмЦ на хромосоме, находящейся на стадии метафазы, использовали антитела, высокоспецифические для данной модификации. В результате нами было показано, что в линиях ЭСК HESM04, HESM05 и ИПСК iPS-MA-20 одна из X-хромосом практически не окрашивалась на 5-гмЦ (Рис.5Б). При одновременном анализе



**Рисунок 5.** Изучение районов активного деметилирования и репликации X-хромосомы в ПСК человека. А. Паттерн времени репликации (включения EdU) и окрашивания на 5-гмЦ в аутосомах (Хромосома 1 и 7) обнаруживает корреляцию ранней репликации и районов активного деметилирования (5-гмЦ). Б. Паттерн времени репликации (включение EdU) и окрашивания на 5-гмЦ в линиях с неактивной X-хромосомой (HESM04, HESM05, iPS-MA-20) и двумя частично активными X-хромосомами (iPS-MA-2). Наблюдается отсутствие 5-гмЦ на поздно реплицирующемся гетерохроматине инактивированной X-хромосомы. В. Паттерн времени репликации (включения EdU) и окрашивания на 5-гмЦ в двух X-хромосомах линии iPS-MA-2.

времени репликации и паттерна распределения 5-гмЦ X-хромосома без модификации 5-гмЦ реплицировалась в поздней S-фазе клеточного цикла. В целом, при анализе аутосом и X-хромосом было обнаружено, что рано реплицирующиеся районы подвергались активному деметилированию, приобретая большое количество модификации 5-гмЦ, в то время как поздно реплицирующиеся регионы не приобретали модификацию 5-гмЦ, оставаясь гиперметилированными. Это особенно хорошо видно на примере аутосом 1 и 7, у которых ярко выраженные гетерохроматиновые G-бэнды поздно реплицируются и не окрашиваются на 5-гмЦ (Рис.5А). Синхронная репликация обеих X-хромосом и появление 5-гмЦ, как результат активного деметилирования, свидетельствует о транскрипционной активности этих участков ДНК и наблюдалась в линиях ЭСК HUES9 и ИПСК iPS-MA-2 (Рис.5В). Активное деметилирование ДНК (обогащение 5-гмЦ) отсутствовало в районах, которые реплицировались в поздней S-фазе: дистальный конец q-плеча и перичентромерный район одной из X-хромосом в каждой клетке. Надо отметить, что район p-плеча, где располагаются биаллельно экспрессирующиеся *POLA1* и *CTPS2* (Рис.3А), окрашивался на 5-гмЦ на обеих X-хромосомах, свидетельствуя об активных процессах снятия метилирования ДНК в этом регионе хромосомы. Перичентромерный район X-хромосомы, который реплицировался асинхронно, соответствовал локализации гена *ATRX*, экспрессирующегося моноаллельно, не содержал повышенного количества 5-гмЦ, и, следовательно, не подвергался активному деметилированию (Рис.5В). Таким образом, рано реплицирующиеся районы эухроматина коррелируют с районами, содержащими метку активного деметилирования ДНК и транскрипционной активностью, что подтверждается биаллельной экспрессией X-сцепленных генов. Отсутствие 5-гмЦ, как маркера активного деметилирования, может служить признаком инактивированной X-хромосомы и коррелирует с отсутствием экспрессии с этого аллеля.

**Хромосомные территории как отражение эпигенетической активности X-хромосомы.** В клеточном ядре хромосомы занимают определённые



**Рисунок 6.** Изучение хромосомных территорий в ПСК человека. А и Б. Типы компактизации территорий X-хромосом. Аутосомы окрашены красным цветом. X-хромосомы – зелёным. В. Соотношения ядер с компактной территорией и релаксированной территорией X-хромосомы в линиях ПСК человека.

неперекрывающиеся территории. При этом считается, что неактивный гетерохроматин более плотно упакован и более компактизован в ядре. В соматических клетках млекопитающих инактивированная X-хромосома утрачивает способность к транскрипции и формирует компактное тельце Барра на периферии ядра. В нашей работе для сравнения территорий X-хромосом в линиях ПСК внутри одного ядра выбирались ядра, на которых отчетливо выявляли две непересекающиеся зоны FISH гибридизации с ДНК-пробой к X-хромосоме. В результате сравнения территорий, занимаемых X-хромосомой в ядрах клеток различных линий ПСК, оказалось, что клетки распределились на два основных типа: (1) клетки, которые имели ядра с одной обширной территорией X-хромосомы и низкой плотностью окраски и одной компактной территорией с высокой плотностью окраски (Рис.6А), и (2) ядра с двумя обширными территориями X-хромосом с одинаковой плотностью окраски (Рис.6Б). В линиях ПСК с частично активной X-хромосомой большая часть клеток имела ядра с двумя релаксированными территориями X-хромосомы (линии HUES9 и iPS-MA-2), а в линии с неактивной X-хромосомой (HESM04) в 93% случаев обнаруживались ядра с компактной

территорию X-хромосомы (Рис.6В). В случае линии endo-iPS-12 и HESM05, несмотря на наличие неактивной X-хромосомы, больше 50% (для endo-iPS-12) и 90% (для HESM05) ядер имели две релаксированные территории X-хромосом. Таким образом, степень компактности территории X-хромосомы в ПСК человека не коррелирует с эпигенетическими особенностями X-хромосомы и ее активностью.

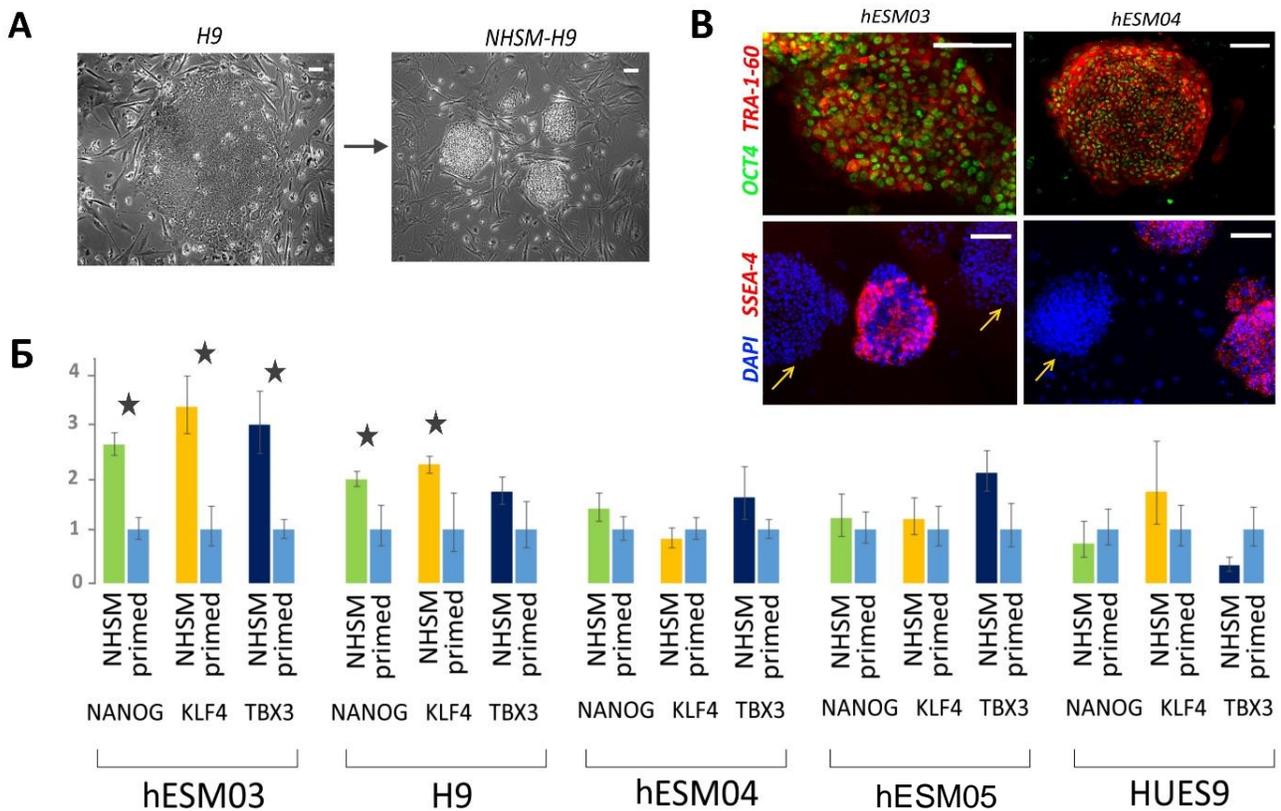
### **ИНАКТИВАЦИЯ X-ХРОМОСОМЫ В ПСК ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ ДО НАИВНОГО СОСТОЯНИЯ**

ПСК человека очень схожи функционально и на молекулярном уровне с стволовыми клетками эпибласта мыши (ЭпиСК) (Brons et al., 2007; Tesar et al. 2007). Считается, что эти клетки находятся в праймированном состоянии, которое отлично от наивного, истинно плюрипотентного, состояния ПСК, как, например, ЭСК мыши (Nichols and Smith, 2009). В ЭпиЭСК мыши, как и во многих линиях ЭСК человека, одна из X-хромосом инактивирована, в то время как в ЭСК мыши обе X-хромосомы активны. Если изменить условия культивирования, с помощью ингибирования одних сигнальных путей и активации других, оказывается возможным перевести ЭпиЭСК мыши в наивное состояние. То же относится и к ЭСК человека (Gafni et al 2013, Theunissen et al 2014, Takashima et al 2014). Задачей нашего исследования являлось изучение возможности реактивации инактивированной в праймированных клетках X-хромосомы при переводе ПСК человека в наивное состояние.

#### **Характеристика линий ПСК человека, культивируемых в наивных условиях.**

Для получения линий ПСК человека в наивном состоянии мы использовали среду NHSM (Naïve Human Stem cell Medium, аналог коммерческой среды RSeT™ Medium), описанную ранее и содержащую факторы роста bFGF, LIF и ингибиторы четырёх сигнальных путей: ERK1/2, GSK3 $\beta$ , JNK и p38 (Gafni et al 2013). Клеточные линии ЭСК культивировались в среде NHSM на фидере примерно 45-55 дней. Первые морфологические изменения детектировались через 4-6 дней после замены стандартной среды на NHSM: колонии клеток приобрели чёткие границы и куполообразную форму (Рис.7А). В отсутствие ингибитора ROCK-киназы (ROCKi),

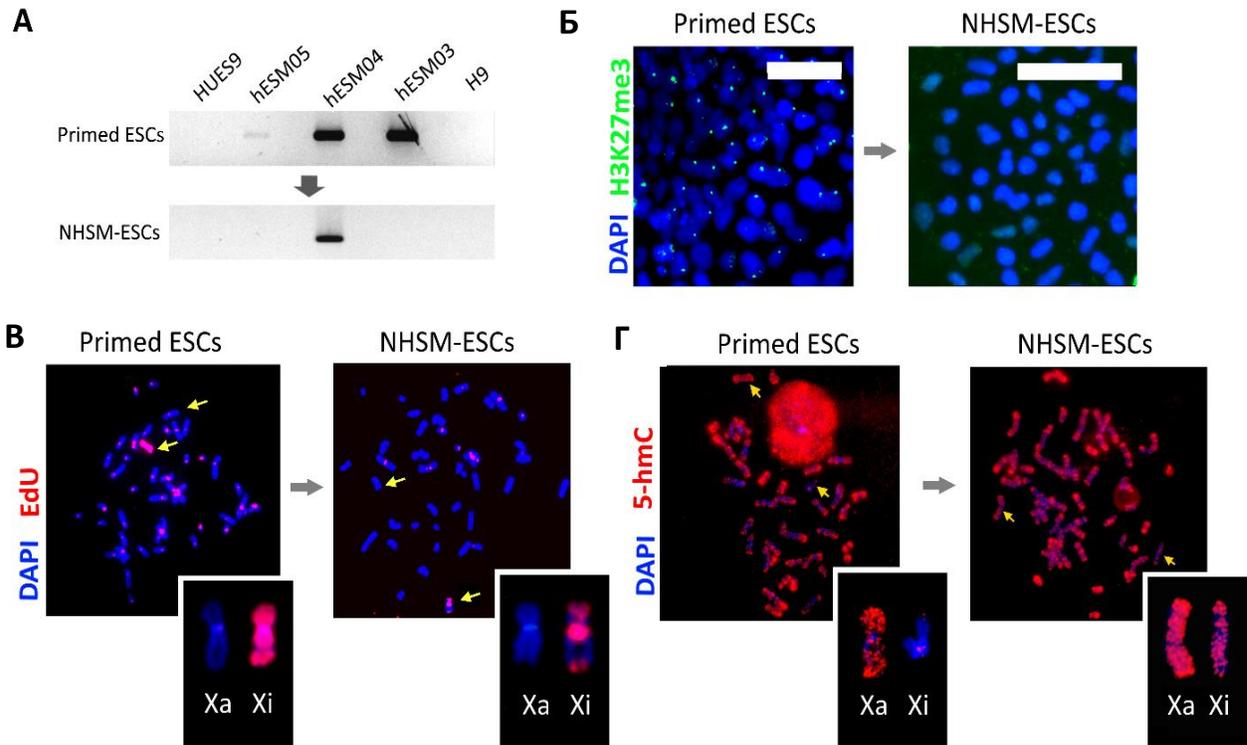
добавляемой для ингибирования апоптоза, ЭСК человека обладают слабой клоногенностью и практически не выживают при пересеве с разбиением колоний до единичных клеток. В случае же культивирования на среде NHSM, клетки успешно пересевались с помощью трипсина в течение 10 пассажей без добавления ROCKi. Исключением была линия HESM04, которая пересевалась с помощью трипсина лишь в присутствии ROCKi. Для того, чтобы охарактеризовать степень перехода в наивное состояние с помощью ПЦР в реальном времени нами была оценена экспрессия генов, которые считаются индикаторами наивного состояния (Valamehr



**Рисунок 7.** Характеристика ЭСК человека в наивных условиях. А. Морфология ЭСК в праймированных условиях (слева) и наивных NHSM условиях (справа). Б. Относительная экспрессия генов, характерных для наивного плюрипотентного состояния. В. Иммуноцитохимическая характеристика линий ЭСК в наивных условиях на маркеры плюрипотентности OCT4, TRA-1-60, SSEA-4. Наблюдается гетерогенность колоний по SSEA-4 в линиях HESM03 и HESM04 (негативные по наличию SSEA-4 колонии отмечены стрелками).

et al. 2014; Theunissen et al. 2014). Оказалось, что экспрессия генов *NANOG*, *KLF4*, *TBX3*, ассоциированных с наивным состоянием, возросла в линиях HESM03 и H9, в то время как в линиях HESM04, HUES9 и HESM05 уровень экспрессии генов достоверно не изменился (Рис.7Б), что свидетельствует о разной восприимчивости линий ЭСК к среде NHSM и способности переходить в наивное состояние, которая может быть обусловлена как генетическими, так и эпигенетическими факторами. При культивировании в среде NHSM клеточные линии сохраняют основные маркеры плюрипотентности, такие как Oct3/4, TRA1-60 и т.д. (Рис.7В). Однако, в клеточных линиях HESM03 и HESM04 мы обнаружили, что характерный для ЭСК человека поверхностный маркер SSEA-4 значительно изменил характер проявления. Часть колоний клеточных линий стали негативны по наличию SSEA-4 (Рис.7В). Необходимо отметить, что наивные ЭСК мыши не имеют этого поверхностного маркера. Таким образом, эпигенетическое репрограммирование с помощью условий внешней среды привело к морфологическим изменениям во всех пяти клеточных линиях. Однако, лишь в двух линиях NHSM-HESM03 и NHSM-H9, детектировалось увеличение экспрессии генов, ассоциированных с наивным состоянием, способность к выживанию при пересеве с разбиением колоний до единичных клеток, а в клетках линии NHSM-HESM03 исчезал поверхностный антиген SSEA-4

**Экспрессия гена *XIST* после культивирования в NHSM условиях.** Проведенный анализ показал, что после 10 пассажей культивирования в NHSM условиях в линиях HESM05, H9 и HUES9 экспрессия гена *XIST* отсутствовала и в обычных условия культивирования, и в наивных условиях среды. В линии HESM04 экспрессия *XIST* детектировалась как до, так и после культивирования в NHSM (Рис.8А). Исходно в линии HESM03 детектировалась экспрессия *XIST*, однако, в NHSM условиях экспрессия гена прекращалась. Таким образом, после культивирования в наивных условиях, несмотря на произошедшие морфологические и функциональные характеристики клеточных линий, гетерогенность между линиями в отношении экспрессии гена *XIST* сохранялась.



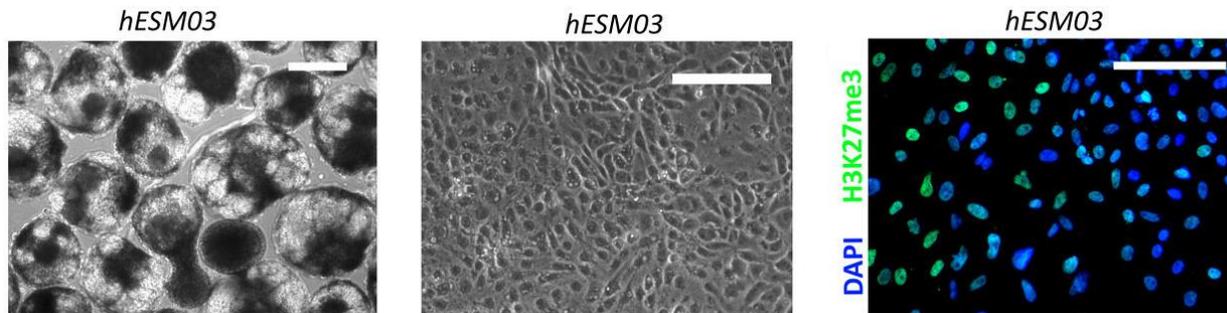
**Рисунок 8.** Характеристика статуса инактивации X-хромосомы в ЭСК в NHSM-условиях. А. Экспрессия гена *XIST* в праймированных и в NHSM-условиях в ЭСК человека. Б. Потеря фокального окрашивания на H3K27me3 в линии HESM03 в наивных условиях. В. Паттерн реактивации неактивной X-хромосомы в наивных условиях. Г. Паттерн окрашивания на 5-гмЦ в наивных условиях.

**Гистоновые модификации после культивирования в NHSM условиях.** После 10 пассажей культивирования в среде NHSM обогащение одной из X хромосом гистоновой модификацией H3K27me3 детектировалась лишь в линии HESM04 (Рис.8Б). Линии H9, HUES9, hESM05 не изменили паттерн окрашивания на данную модификацию. При этом если в исходной линии hESM03 детектировалось обогащение X-хромосомы модификацией H3K27me3, то культивирование в среде NHSM привело к тому, что обогащение отсутствовало. Таким образом, после культивирования в наивных условиях мы наблюдаем, что, не смотря на произошедшие морфологические и функциональные характеристики клеточных линий, изменения условия культивирования не привели, в основном, к изменению обогащения гистоновой модификацией H3K27me3, кроме линии HESM03.

**Время репликации X-хромосомы в NHSM-линиях ЭСК.** Оказалось, что в клетках двух линий ЭСК NHSM-hESM03 и NHSM-H9 на неактивной X-хромосоме появились новые бэнды с ранней репликацией: регион в центральной части р-плеча, и регион в центральной части q-плеча. Эти районы X-хромосомы реплицировались синхронно с активной X-хромосомой (Рис.8В). В линии HUES9 в наивных условиях паттерн репликации X-хромосом не изменился по сравнению с праймированными условиями: неактивная X-хромосома реплицировалась синхронно с активной за исключением двух районов. Паттерн репликации в линиях NHSM-hESM03 и NHSM-H9 схож с окрашиванием X хромосом в клетках HUES9, за исключением бэнды на р-плече, репликация которого в этих двух линиях сохранилась поздней, в отличие от HUES9. Таким образом, в наивных условиях культивирования мы не смогли обнаружить двух полностью активных X-хромосом ни в одной из клеточных линий. Таким образом, наивные условия культивирования привели к сдвигу времени репликации многих районов неактивной X-хромосомы, однако, полной реактивации X-хромосомы в ЭСК не произошло.

**Распределение 5-гмЦ на X-хромосоме в NHSM-линиях ЭСК человека.** При анализе изменения распределения маркера активного деметилирования на X хромосоме в линиях ПСК в наивном состоянии, наблюдалась существенная вариабельность как между клетками одной линии, так и между линиями NHSM-ЭСК. В некоторых линиях обогащение 5-гмЦ на неактивной X-хромосоме наблюдалось в тех же районах, которые начинали реплицироваться синхронно с активной X-хромосоме в наивном состоянии (Рис.8Г), а в некоторых линиях обогащения 5-гмЦ практически не наблюдалось.

**Инактивация X-хромосомы после спонтанной дифференцировки NHSM-линий ЭСК.** Случайная инактивация одной из активных X-хромосом в ПСК при дифференцировке является функциональных признаков наличия реактивированной X-хромосомы у клеток, культивируемых в наивных условиях. Дифференцировка *in vitro* проведена на линии NHSM-hESM03, продемонстрировавшая наибольшие изменения X-хромосомы в наивных условиях. Через 21 день спонтанной



**Рисунок 9.** *In vitro* дифференцировка линии ЭСК через формирование эмбрионных тел, а затем пересев на покрытую желатином поверхность. При дифференцировке фокального окрашивания на H3K27me3 не появляется, что говорит об отсутствии классического процесса инактивации X-хромосомы при дифференцировке ЭСК человека из наивных условий.

дифференцировки клетки анализировались на наличие обогащения X-хромосомы модификацией H3K27me3 (Рис.9). В дифференцированных клетках ни одна из X-хромосом не приобретала модификации H3K27me3, таким образом, мы не наблюдали классической инактивации X-хромосомы, как это наблюдается при дифференцировке наивных ЭСК мыши. Таким образом, эпигенетическим изменениям неактивной X-хромосомы в наивных условиях, не привели к полной реактивации X-хромосомы.

**Инактивация X-хромосомы в ИПСК человека, полученных при репрограммировании в наивных условиях.** Фибробласты кожи и клетки эндотелия человека были репрограммированы с использованием на начальных этапах культивирования среды NHSM. На 3-5 пассаже полученные линии ранних ИПСК были проанализированы на эпигенетическое состояние X-хромосомы. В проанализированных линиях ИПСК мы наблюдали вариабельность среди клеток каждой линии по наличию на X-хромосоме гистоновых модификаций, а именно: наблюдаются клетки как с наличием марки неактивного хроматина H3K27me3, так и без характерного окрашивания на H3K27me3. Также в линиях ИПСК, полученных в наивных условиях, мы наблюдали вариабельность времени репликации X-хромосомы между линиями и между клетками внутри одной линии. В целом, можно

сделать вывод, что при репрограммировании клеток в наивных условиях, в полученных ИПСК не наблюдалось единообразных признаков реактивации X-хромосомы.

### **ВЫВОДЫ**

1. Показано, что женские линии плюрипотентных стволовых клеток человека различаются между собой по эпигенетическому состоянию инактивированной X-хромосомы.
2. Впервые показано, что в плюрипотентных стволовых клетках человека время репликации участков X-хромосомы отражает районы реактивации и может являться маркером состояния X-хромосомы.
3. Показано, что в плюрипотентных стволовых клетках человека распределение модификации ДНК 5-гидроксиметилцитозина, маркера активного деметилирования ДНК, коррелирует с эухроматиновыми районами и участками ранней репликации и может служить индикатором инактивации X-хромосомы.
4. Впервые показано, что в плюрипотентных стволовых клетках человека степень компактизации территории X-хромосомы в интерфазном ядре не коррелирует с состоянием инактивации X-хромосомы.
5. Обнаружено, что эпигенетическое репрограммирование плюрипотентных стволовых клеток человека до наивного состояния сопровождается переходом хроматина в активное состояние (отсутствие *XIST*, потеря H3K27me<sub>3</sub>, сдвиг времени репликации), однако не приводит к полной реактивации X-хромосомы и последующей случайной инактивации при дифференцировке.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК:

1. А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв, А. Н. Богомазова. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории. Acta naturae. 2013. Т.5 № 2 (17). Стр. 55-63.
2. Bogomazova AN, Lagarkova MA, Panova AV, Nekrasov ED, Kiselev SL. Reactivation of X chromosome upon reprogramming leads to changes in the replication pattern and 5hmC accumulation. Chromosoma. 2014. V.123 (1-2), P.117-28.
3. Богомазова А.Н., Васина Е.М., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Лебедева О.С., Некрасов Е.Д., Панова А.В., Филоненко Е.С., Хомякова Е.А., Цховребова Л.В., Честков И.В., Шутова М.В. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования. // Генетика. 2015. Т. 1. № 4. С. 466.

### Тезисы докладов и материалы конференций:

1. Chromatin, Replication and Chromosomal Stability, 17-19 June 2013, Copenhagen, Denmark (poster presentation). Panova AV, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Nekrasov ED, Kiselev SL. Reactivation of X chromosome upon reprogramming leads to changes in the replication pattern and 5hmC accumulation.
2. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 16-18 January 2014, Osaka, Japan (oral poster presentation). Panova AV, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Nekrasov ED, Kiselev SL. Early replication accompanied by 5hmC accumulation is a robust marker of X chromosome reactivation in human female iPS cells.
3. IV съезд ВОГИС, 15-20 июня, 2014, Ростов-на-Дону, Россия (устный доклад). А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв,

А. Н. Богомазова. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории

4. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, 24-27 June 2015, Stockholm, Sweden (poster presentation). Alexandra V Panova, Alexandra N Bogomazova, Maria A Lagarkova, Sergei L Kiselev. PROLONGED FEMALE HUMAN ESC REPROGRAMMING BY NAÏVE CONDITIONS PARTLY REACTIVATES X CHROMOSOME
5. III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 15 - 18 ноября, 2017 Москва, Россия (постерная презентация). А. В. Панова, А. Н. Богомазова, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв. Эпигенетическое репрограммирование плюрипотентных стволовых клеток человека до «наивного» состояния.