

# ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС X-ХРОМОСОМ В ЛИНИЯХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Грачева Е.А.

Новосибирский государственный университет

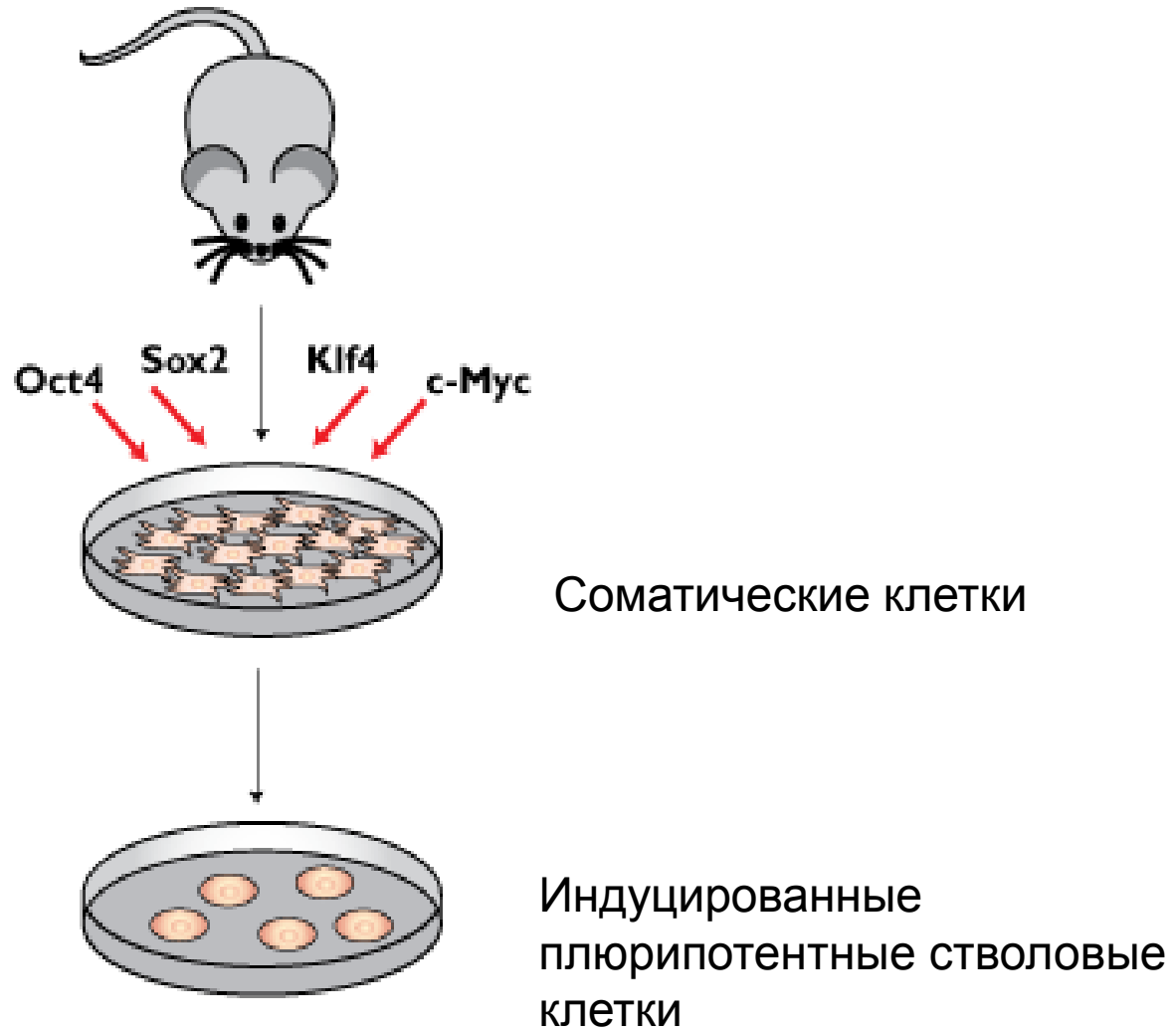
Факультет Естественных Наук

Кафедра цитологии и генетики

Лаборатория Эпигенетики развития ИЦИГ СО РАН

Научный руководитель: к.б.н., Шевченко А.И.

# Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК)



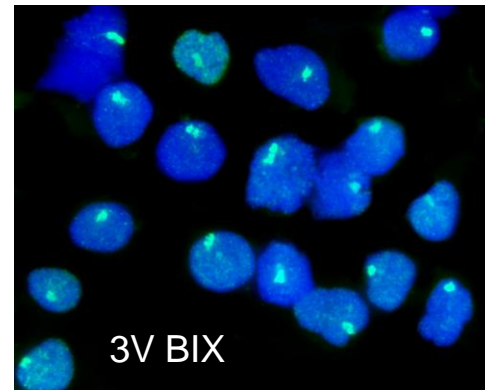
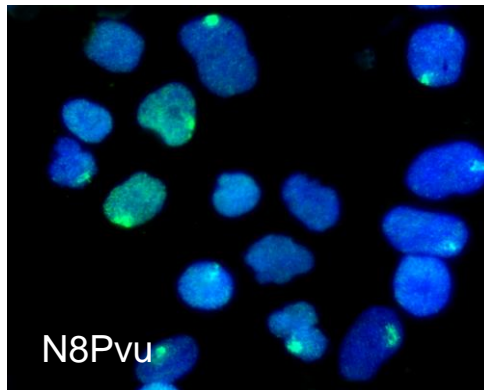
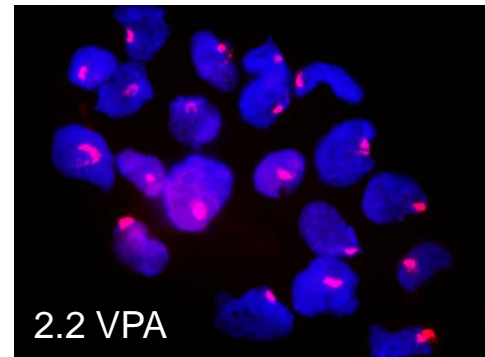
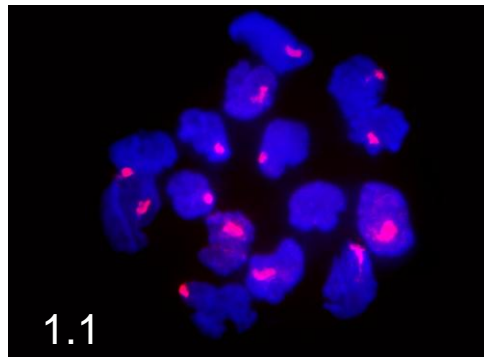
Цель работы:

Исследование эпигенетического статуса X-хромосом в линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека

# Задачи:

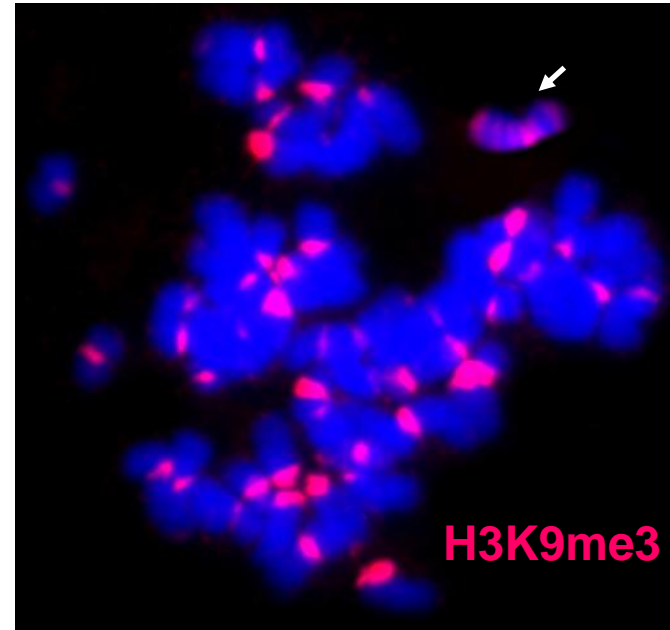
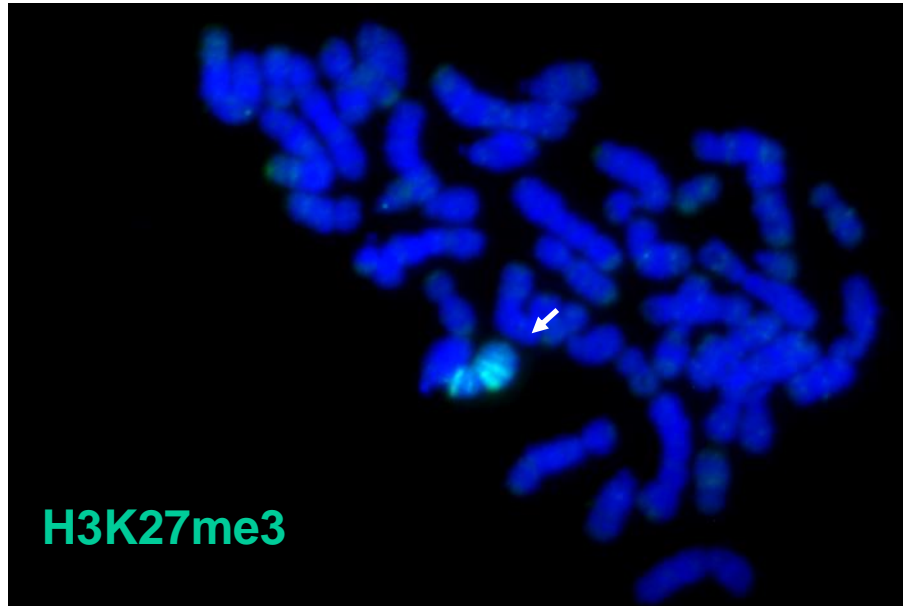
1. Исследовать модификации хроматина на X-хромосомах в линиях ИПСК человека;
2. Сравнить экспрессию гена *XIST* и профиль метилирования его промотора в ИПСК, ЭСК и дифференцированных клетках человека;
3. Исследовать влияние веществ, влияющих на сигнальные пути дифференцировки (PD0325901, CHIR99021) на состояние неактивной X-хромосомы в линиях ИПСК человека.

В охарактеризованных линиях ИПСК обнаружены маркеры, свидетельствующие о наличии неактивной X-хромосомы



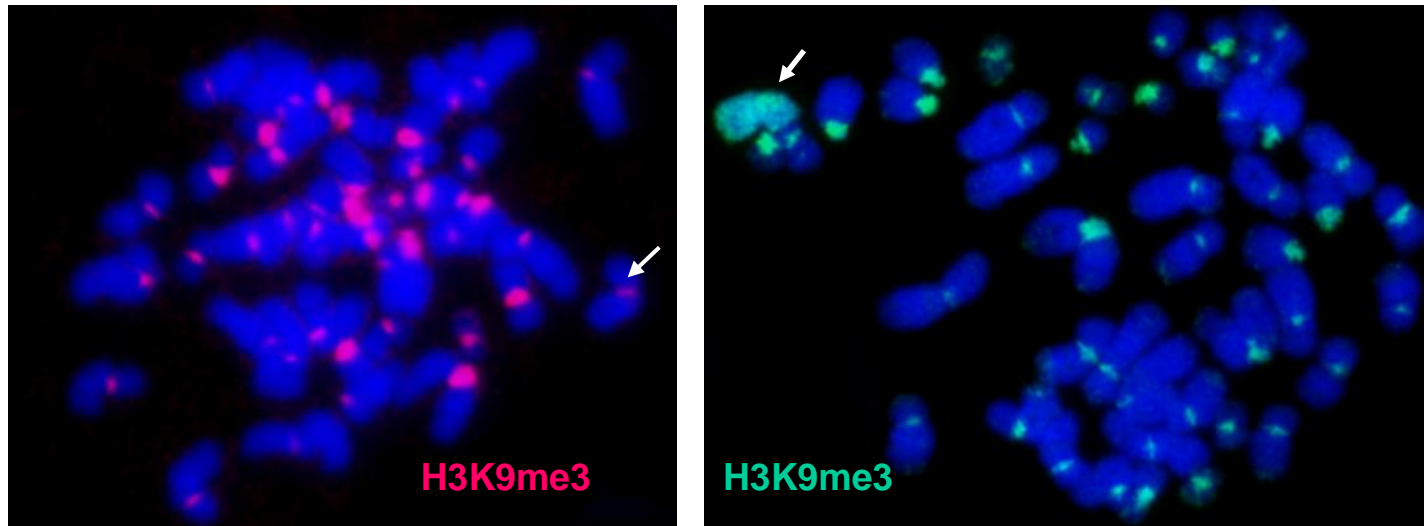
Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер клеток линий 1.1, 2.2 VPA, N8Pvu, 3VBIX ИПСК человека антителами к H3K27me3 (зеленый сигнал). Ядра окрашены DAPI (синий сигнал).

В охарактеризованных линиях ИПСК обнаружены маркеры, свидетельствующие о наличии неактивной X-хромосомы



Неактивная X-хромосома (указана стрелкой) в ИПСК человека, полученных из нейральных стволовых клеток.

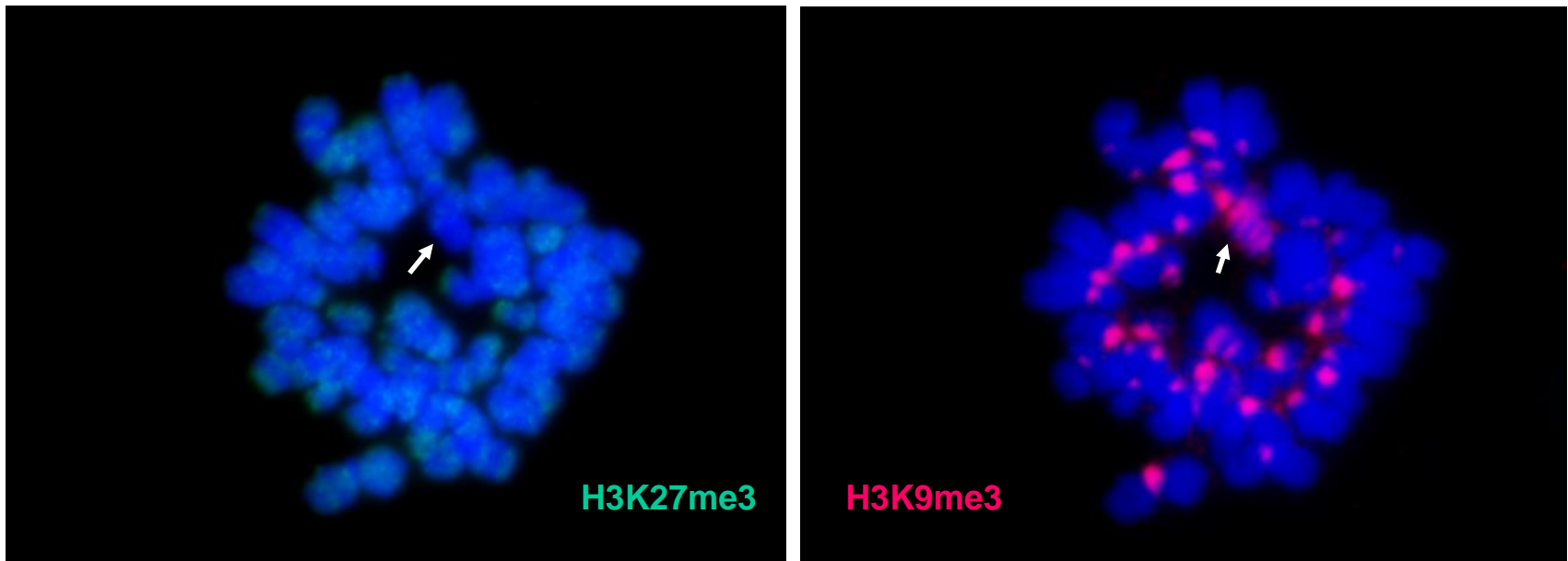
Модификации неактивного хроматина на неактивной X-хромосоме в ИПСК человека могут перераспределяться



Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом линий ИПСК человека антителами к H3K4me2

Неактивная X-хромосома указана стрелкой

## Модификации неактивного хроматина на неактивной X-хромосоме в ИПСК человека могут теряться

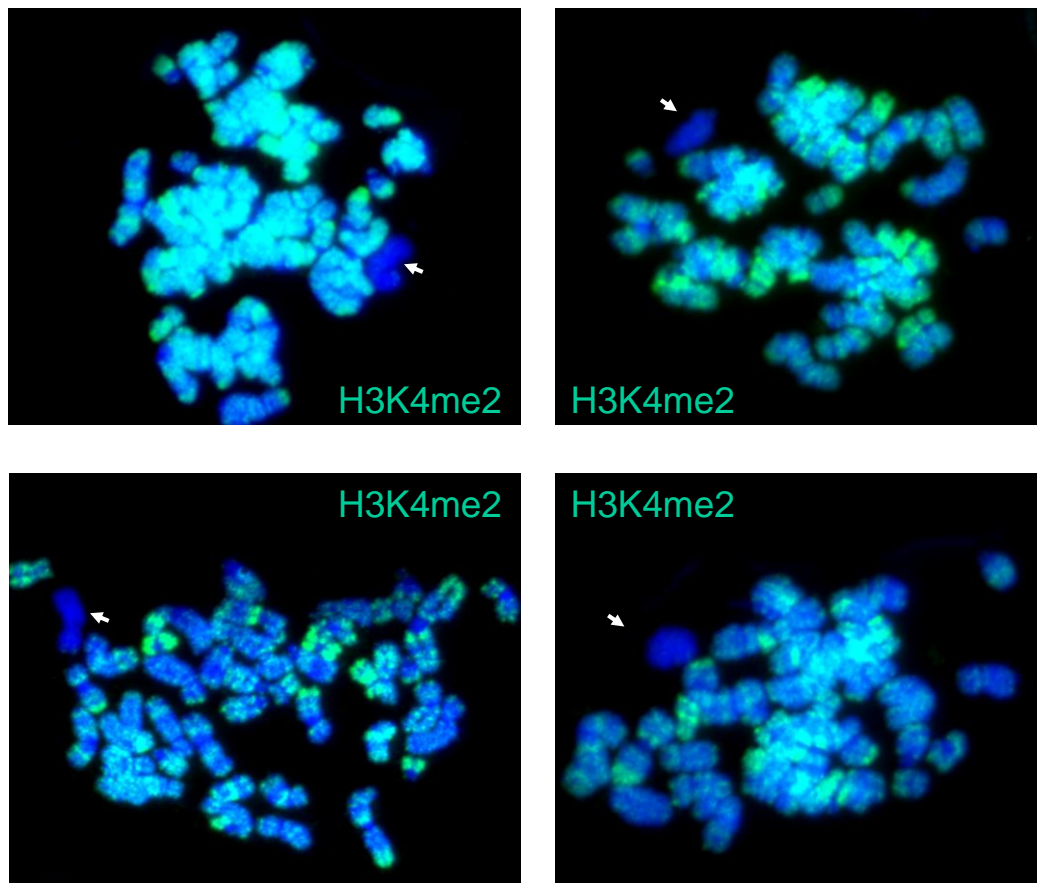


Иммунофлюоресцентное окрашивание метафазных препаратов линии ИПСК человека антителами к H3K27me3 (зеленый сигнал) и H3K9me3 (красный сигнал).

Неактивная X-хромосома указана стрелкой

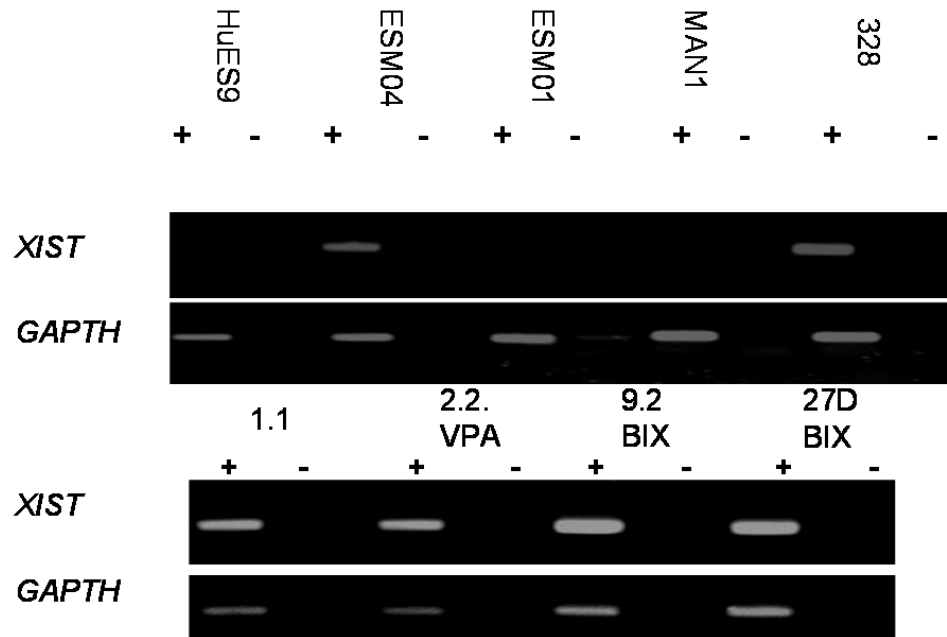


На неактивной X-хромосоме в линиях ИПСК не обнаружено маркеров активного хроматина



Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом линий ИПСК человека антителами к H3K4me2 (неактивная X-хромосома обозначена стрелкой)

# Исследованные линии ИПСК экспрессируют ген *XIST*



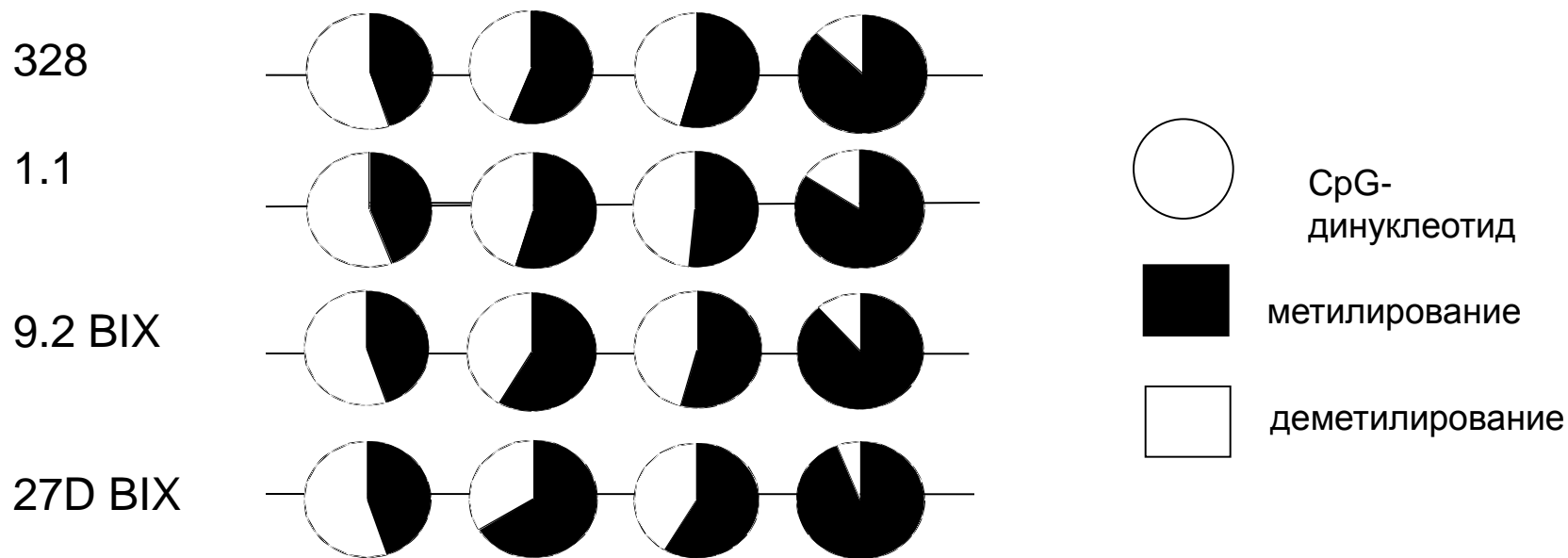
HuES9, ESM04, ESM01 – линии эмбриональных стволовых клеток человека

MAN№1 – линия эмбриональных фибробластов (46, XY)

328 – исходная культура нейральных стволовых клеток человека

1.1, 9.2 BIX, 27D BIX – линии ИПСК

# Уровень метилирования промотора гена *XIST* совпадает у исходной культуры нейральных стволовых клеток и линий ИПСК.



328 – исходная культура нейральных стволовых клеток человека

1.1, 9.2 ВІХ, 27D ВІХ – линии ИПСК

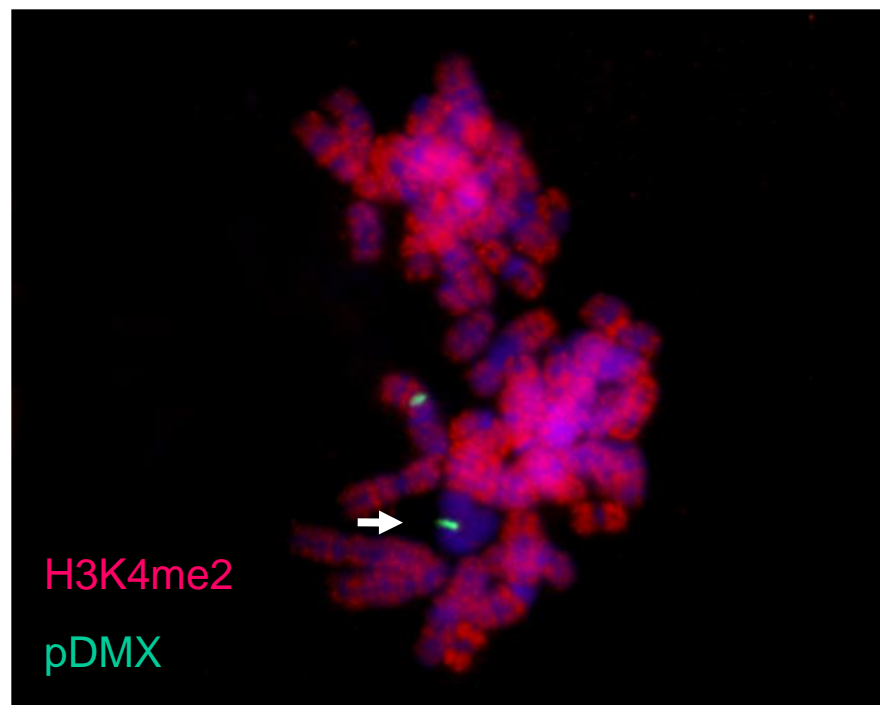
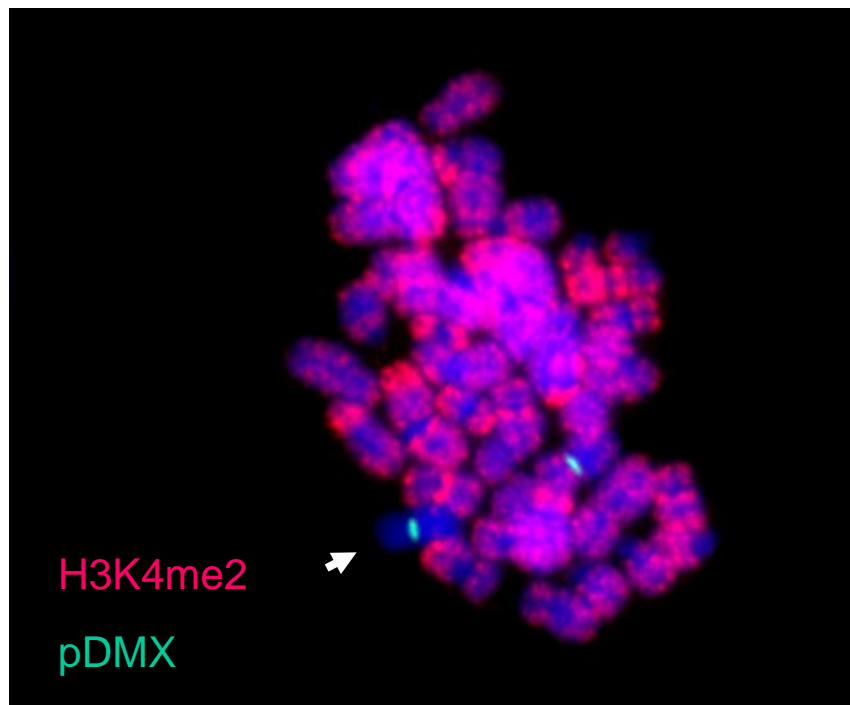
# Схема получения ИПСК из клеток амниотической жидкости и плаценты человека

Трансдукция ретровирусными конструкциями, содержащими гены *Oct4*, *Klf4*, *c-Myc* и *Sox2*

Отбор ЭСК-подобных колоний



ПреИПСК, полученные из клеток амниотической жидкости и плаценты, имеют неактивную X-хромосому

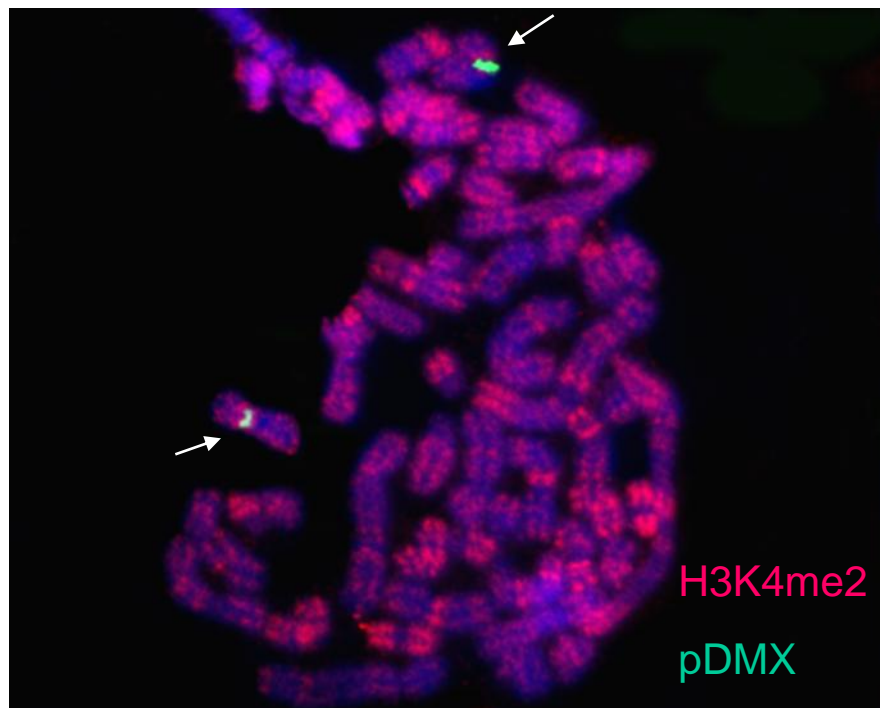


ПреИПСК, полученные из клеток амниотической жидкости

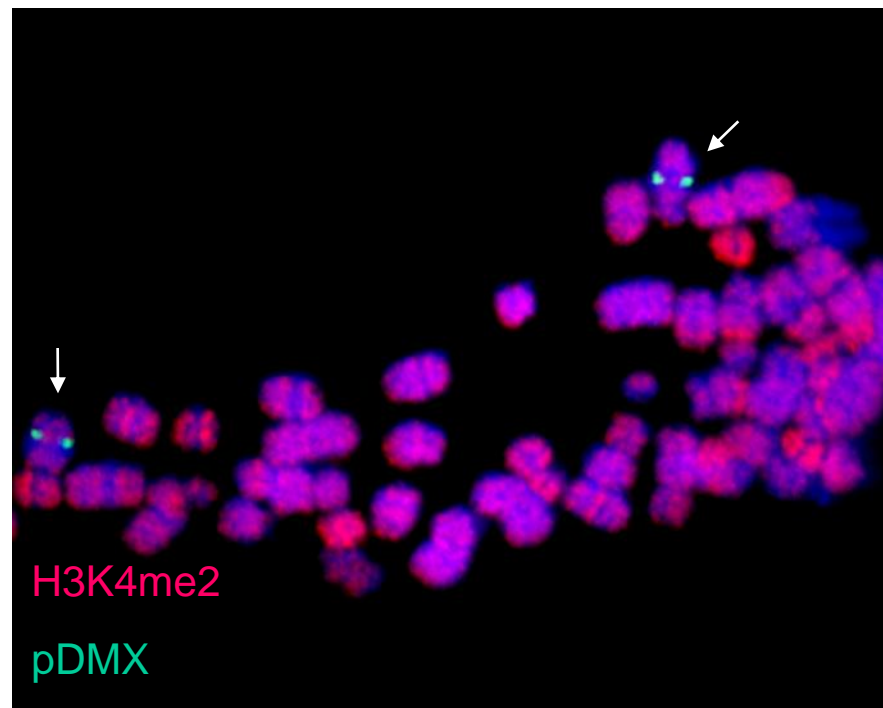
ПреИПСК, полученные из клеток плаценты

Неактивная X-хромосома указана стрелкой

При культивировании преИПСК в среде, содержащей ингибиторы сигнальных путей дифференцировки, наблюдается реактивация неактивной X-хромосомы



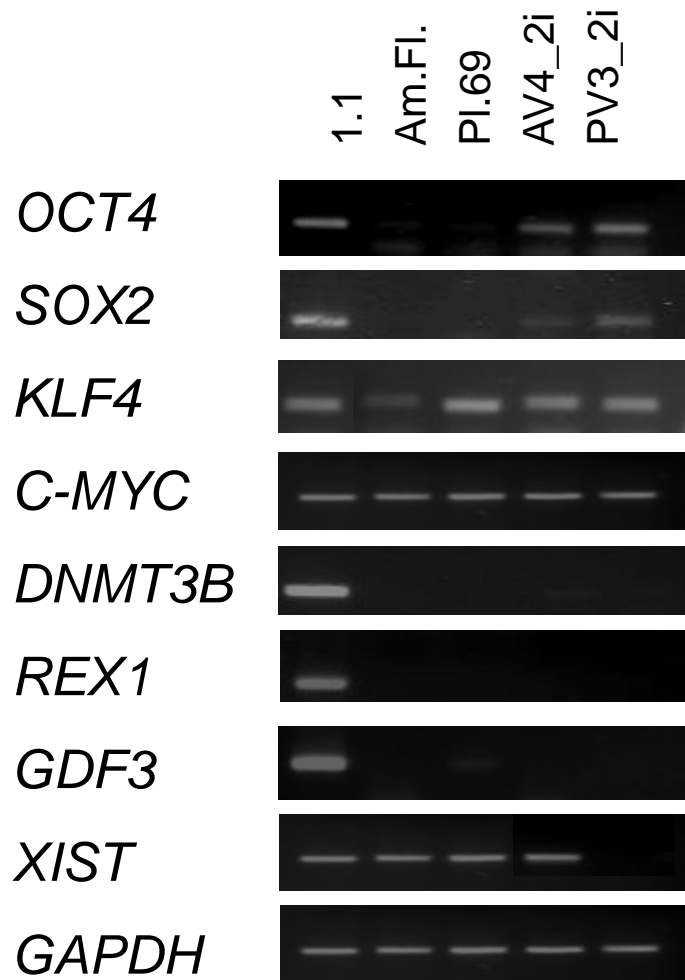
ПреИПСК, полученные из клеток амниотической жидкости



ПреИПСК, полученные из клеток плаценты

X-хромосомы указаны стрелками

# Исследованные линии преИПСК не обладают всеми признаками плюрипотентного состояния



1.1. – линия ИПСК человека (контроль)  
Am.FI. – культура клеток амниотической жидкости  
Pl.69 – культура клеток плаценты  
AV4\_2i – линия преИПСК, полученная из клеток амниотической жидкости  
PV3\_2i – линия преИПСК, полученная из клеток плаценты

# Выводы

В линиях ИПСК, полученных из нейральных стволовых клеток эмбриона женского пола с помощью плазмидных векторов, X-хромосома не реактивируется, что подтверждается как присутствием маркеров неактивного хроматина, экспрессией гена *XIST*, а также деметилированным состоянием его промотора. Применение химических веществ VIX01294 и VPA при получении ИПСК не способствует реактивации неактивной X-хромосомы.

При культивировании ИПСК модификации неактивного хроматина на неактивной X-хромосоме (H3K27me3, H3K9me3) могут утрачиваться, тем не менее, не приобретаются модификации, характерные для активного хроматина (H3K4me2)

При культивировании преИПСК, полученных из клеток амниотической жидкости и плаценты, в среде, содержащей вещества CHIR99021, PD0325901, LIF человека наблюдается реактивация неактивной X-хромосомы, которая происходит в клетках, недостигших плюрипотентного состояния.