

УДК 575.1

# Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы в плюрипотентных стволовых клетках человека не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории

А. В. Панова, Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселёв, А. Н. Богомазова\*

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

\*E-mail: bogomazova@vigg.ru

Поступила в редакцию 20.12.2012

**РЕФЕРАТ** В женских соматических клетках млекопитающих работает эпигенетический механизм дозовой компенсации, включающий инактивацию одной из двух X-хромосом через формирование факультативного гетерохроматина. В отличие от плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) мыши, статус X-хромосомы в плюрипотентных клетках человека является эпигенетически пластичным признаком. Известно, что для гетерохроматина свойственна поздняя репликация в поздней S-фазе клеточного цикла после репликации эухроматина. Это характерно и для факультативного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы. Принято считать, что неактивная X-хромосома в клетках млекопитающих всегда имеет большую конденсацию в интерфазном ядре. Предполагается, что именно плотная упаковка определяет позднюю репликацию инактивированной X-хромосомы. Методом полнохромосомной ДНК-гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах мы показали, что ПСК человека с инактивированной X-хромосомой могут иметь как релаксированную, так и компактную хромосомную территорию неактивной X-хромосомы. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы также не зависит от степени компактизации ее хромосомной территории. Тем не менее для перехода X-хромосомы к активному состоянию при ее реактивации и для синхронной репликации необходимым условием является декомпактизация хромосомной территории X-хромосомы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** репрограммирование, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, хромосомные территории, X-хромосома, поздняя репликация.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; H3K27me3 – трижды метилированный лизин 27 гистона H3; H3K4me2 – дважды метилированный лизин 4 гистона H3; H3K9me3 – трижды метилированный лизин 9 гистона H3; Xi – инактивированная X-хромосома; Xa – активная X-хромосома; FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*; BrdU – 5-бromo-2-дезоксисуридин.

## ВВЕДЕНИЕ

Структура хроматина и архитектура ядра являются важнейшими элементами регуляции основных ядерных генетических процессов: транскрипции и репликации. Известно, что хромосомы в интерфазном ядре занимают определенные, не перекрывающиеся друг с другом области, формируя так называемые хромосомные территории, причем более плотно упакованный гетерохроматин располагается преимущественно в периферийной и приядрышковой зонах ядра [1]. Репликация деконденсированного эухроматина и плотно упакованного гетерохроматина разнесена и в пространстве, и во времени. Репликация декон-

денсированного эухроматина происходит в начале S-фазы, в то время как зоны конденсированного хроматина реплицируются в конце S-фазы [2]. Т. Ryba и соавт. предположили, что поздняя репликация плотно упакованных хроматиновых доменов может быть обусловлена трудным доступом к этим регионам факторов инициации репликации [3].

Один из примеров массивного гетерохроматинного домена внутри ядра в женских соматических клетках млекопитающих – инактивированная X-хромосома, которая в результате действия механизмов дозовой компенсации утрачивает способность к транскрипции, формирует компактное

тельце Барра на периферии ядра и реплицируется в конце S-фазы [4].

Интересную возможность для изучения связи различных эпигенетических состояний хроматина, организации хромосомных территорий в интерфазном ядре и регуляции репликации предоставляет вариабельность статуса инактивации X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека [5–7].

В настоящее время описаны линии женских эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека с двумя активными X-хромосомами, с одной инактивированной X-хромосомой, а также линии ЭСК человека с инактивированной X-хромосомой без классических цитологических признаков инактивации. По поводу индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека на сегодня нет однозначного мнения о возможности полной реактивации X-хромосомы и долговременного поддержания этого активного статуса в культуре, но, несомненно, X-хромосома при репрограммировании претерпевает ряд значительных эпигенетических изменений, связанных, по крайней мере, с частичной реактивацией [8–10]. Целью нашего исследования стал поиск взаимосвязи между временем репликации X-хромосом в ПСК человека с разным статусом инактивации X-хромосомы и степенью компактизации их хромосомных территорий.

Наши результаты показывают, что репликация неактивной X-хромосомы в поздней S-фазе клеточного цикла может быть не связана с компактной организацией хромосомной территории, и поздно реплицирующаяся и транскрипционно неактивная X-хромосома в женских ПСК может находиться в релаксированном состоянии. Тем не менее при переходе X-хромосомы в активное состояние, сопровождающееся синхронизацией репликации гомологичных X-хромосом, происходит релаксация ее хромосомной территории.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные культуры

Линии ЭСК человека hESM01, hESM04 описаны ранее [11]. Линия HUES 9 любезно предоставлена ее автором Дугласом Мелтоном (Гарвардский университет, США) [12]. Линия эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) получена согласно [13]. Линии ИПСК, клоны iPS-6, iPS-7 с неполным репрограммированием и клон iPS-12 с полным репрограммированием получены из клеток HUVES с помощью лентивирусной трансфекции четырьмя факторами транскрипции: KLF4, OCT4, SOX2 и C-MYC [14], и описаны в [15]. Линия ИПСК MA-02

получена из фибробластов кожи по ранее описанной методике [16].

Линии ПСК культивировали в среде mTeSR1 (StemCell Technologies) на чашках Петри, покрытых матригелем (Matrigel, BD). Линию HUVES культивировали в DMEM/F12 с добавлением 15% FBS, 5 нг/мл hrbFGF (Peprotech), 20 нг/мл hrVEGF (Peprotech), 1% заменимых аминокислот, 2 мМ L-глутамин, 50 ед./мл пенициллина и 50 нг/мл стрептомицина (все от Hyclone). Все клеточные линии культивировали в 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С.

### Иммуноокрашивание

Иммуноокрашивание ядер и метафазных хромосом проводили, как описано [8]. Использовали первичные антитела: поликлональные антитела кролика к H3K27me3 (Millipore, разведение 1 : 500), поликлональные антитела кролика к H3K4me2 (Abcam, 1 : 200) и моноклональные антитела мыши к H3K4me2 (Abcam, 1 : 100), поликлональные антитела кролика к H3K9me3 (Abcam, 1 : 200). Использовали вторичные козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1 : 1000) или вторичные козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1 : 1000). ДНК ядер и метафазных хромосом окрашивали DAPI, наносили на препарат Vectashield (Vector Laboratories), покрывали препарат покровным стеклом.

### РНК-FISH

РНК-FISH проводили, как описано в [17], с флуоресцентно мечеными ДНК-пробами ВАС-клонов (Empire Genomics). Использовали следующие ВАС-клоны: RP11-13M9 для локуса XIST и RP11-1104L9 для локуса POLA1.

### Гибридизация *in situ* с полнохромосомной пробой (пейнтинг)

Для приготовления препаратов интерфазных ядер клетки обрабатывали трипсином (0.05% Trypsin, Hyclone). Трипсин инактивировали с помощью FBS (Hyclone). Обрабатывали гипотоническим раствором (0.075 М KCl) в течение 18 мин при 37 °С. Клетки фиксировали двумя фиксаторами (смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 6 : 1 и в соотношении 3 : 1 соответственно). Фиксированные клетки хранили в фиксаторе (3 : 1) при –20 °С. Суспензию фиксированных клеток наносили на холодное мокрое стекло, готовые препараты сушили на воздухе в течение 1 сут. Для улучшения качества FISH препараты инкубировали в 0.25% параформальдегиде в течение 10 мин при комнатной температуре, предобработанные препараты дегидратировали последовательно в 70, 80 и 96% этаноле, а затем обра-

батывали 0.002% раствором пепсина (Sigma) в 0.01 M HCl в течение 30 с при 37°C и снова дегидратировали в этаноле. Денатурацию проводили в 70% формамиде в двукратном SSC-буфере в течение 5 мин при 75°C с последующей дегидратацией в этаноле. Полнохромосомные пробы к хромосомам X и 8 были произведены компанией MetaSystems. Далее препараты окрашивали DAPI, наносили на препарат Vectashield (Vector Laboratories), покрывали препарат покровным стеклом.

### Детекция времени репликации с использованием 5-бромо-2-дезоксигидроуридина (BrdU)

Клетки инкубировали в присутствии 5-бромо-2-дезоксигидроуридина в конечной концентрации 1 мкМ в течение 20 мин за 6–10 ч до фиксации. Колцемид (Demicolcine solution, Sigma) в конечной концентрации 0.2 мкг/мл добавляли в среду с культивируемыми клетками за 1 ч до фиксации. Препараты метафазных хромосом готовили так же, как описано выше для интерфазных ядер. Для денатурации ДНК препараты метафазных хромосом обрабатывали 70% формамидом в двукратном SSC-буфере в течение 5 мин при 75°C, далее их дегидратировали в этаноле и инкубировали с первичными мышинными антителами к BrdU (Sigma, 1 : 1000) в течение 2 ч при 37°C. Отмывку производили в растворе PBS–0.1% Твин-20. Затем препараты инкубировали с вторичными козыми антителами к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1 : 1000), в течение 1 ч при комнатной температуре и окрашивали DAPI. Идентификацию X-хромосомы проводили по инвертированному DAPI-бэндингу или с помощью FISH с X-специфической пробой.

### Микроскопия и фотографирование

Препараты метафазных хромосом и интерфазных ядер анализировали на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss). Цветные фотографии микрообъектов в псевдоцветах получали с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss).

### Сравнение степени компактизации хромосом, расчет дисперсии

Для объективного сравнения степени компактизации двух X-хромосом в каждой отдельной клетке мы использовали программу, специально разработанную для данного эксперимента. Объяснение алгоритма обсчета приведено ниже.

Рассмотрим канал микрофотографии интерфазных ядер, в котором хранится информация о яркости свечения окрашенных хромосомных территорий.

Пусть  $x, y$  – координаты на плоскости точек изображения, а  $P_s(x, y)$  – функция яркости точки изо-

бражения от координаты. Сначала отсекали фоновый уровень свечения линейным преобразованием:

$$P(x, y) = k \cdot P_s(x, y) + b.$$

Обозначим область изображения, в которой находится анализируемая хромосомная территория, как  $G$ . Для каждой хромосомной территории вычисляли параметры  $P_0, x_0, y_0$  следующим образом:

$$P_0 = \iint_G P(x, y) dx dy$$

$$x_0 = \frac{1}{P_0} \iint_G (x \cdot P(x, y)) dx dy$$

$$y_0 = \frac{1}{P_0} \iint_G (y \cdot P(x, y)) dx dy.$$

После чего выполняли замену переменных  $P(x, y) \rightarrow P(r, \varphi)$  согласно формулам перехода, приведенным ниже:

$$\begin{cases} x - x_0 = r \cdot \cos(\varphi) \\ y - y_0 = r \cdot \sin(\varphi). \end{cases}$$

Данная замена переменных есть не что иное, как переход в полярные координаты с центром в точке  $(x_0, y_0)$ .

Затем проводили усреднение функции  $P(r, \varphi)$  по переменной  $\varphi$  таким образом –  $P(r, \varphi) \rightarrow P(r)$ . Формула усреднения приведена ниже.

$$P(r) = \frac{\int_0^{2\pi} P(r, \varphi) d\varphi}{2\pi}$$

Функцию  $P(r)$  нормировали  $P(r) \rightarrow P_n(r)$ .

$$P_n(r) = \frac{P(r)}{\int_r P(r) dr}$$

Функцию  $P_n(r)$  аппроксимировали нормальным распределением  $N(r)$  методом наименьших квадратов:

$$N(r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2}},$$

т.е. подбирали такое значение  $\sigma$ , при котором:

$$\int_r (P_n(r) - N(r))^2 dr \rightarrow \min.$$

Таблица 1. Сводная таблица оценки статуса X-хромосом в плюрипотентных и соматических клетках человека, использованных в работе

Линия клеток	H3K4me2, марка активного хроматина	H3K27me3, марка гетерохроматина	H3K9me3, марка гетерохроматина	PHK-FISH		Статус X-инактивации
				XIST-облако	Экспрессия <i>POLA1</i>	
HUES 9	+	-	Отдельные бэнды	-	Биаллельная	XaXa*
hESM01	+	-	+	-	Моноаллельная	XaXi *
hESM04	-	+	+	+	Моноаллельная	XaXi
iPS MA-02	+	-	-	-	Биаллельная	XaXa
HUVEC	-	+	+	+	Моноаллельная	XaXi
iPS-6	-	+	+	+	То же	XaXi
iPS-7	-	+	+	+	«-»	XaXi
iPS-12	+	+	+	+	«--»	XaXi

\*XaXa – линии с двумя активными X-хромосомами, XaXi – линии, в которых одна X-хромосома неактивна.

Параметр  $\sigma^2$  является дисперсией нормального распределения, именно он выдавался программой в качестве результата анализа и далее использовался для оценки компактизации хромосомных территорий. В работе получены значения  $\sigma^2$  для каждой фотографии X-хромосомы каждого ядра во всех линиях клеток.

Для каждого отдельно взятого ядра рассчитывали отношение дисперсии хромосомы с большим значением  $\sigma^2$  к дисперсии с меньшим значением  $\sigma^2$ . В качестве контроля и определения пороговых значений отношения дисперсий двух хромосом  $\sigma_1^2/\sigma_1^2$  использовали сравнение со значением  $\sigma_1^2/\sigma_1^2$  для двух аутосом в одной клетке. В результате сравнения аутосом было выявлено пороговое значение  $\sigma_1^2/\sigma_1^2 = 2.1$ . Таким образом, все клетки со значением  $\sigma_1^2/\sigma_1^2 \leq 2.1$  для X-хромосом считались обладателями двух декомпактизованных (релаксированных) хромосомных территорий. В результате анализа отношения дисперсий X-хромосом в плюрипотентных клетках (линия, описанная ранее как линия с одной неактивной X-хромосомой, hESM04 [11]) выявлено и второе пороговое значение  $\sigma_1^2/\sigma_1^2 = 3$ . Таким образом, все

клетки со значением  $\sigma_1^2/\sigma_1^2 \geq 3$  для X-хромосом считались обладателями одной компактной и одной релаксированной хромосомной территории. На основе этого анализа были получены данные, приведенные в табл. 2 ниже. В каждой линии клеток анализировали от 50 до 100 ядер.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика статуса инактивации X-хромосомы в ЭСК и ИПСК человека

Статус X-хромосом во всех использованных в работе линиях клеток был охарактеризован ранее при помощи обычных критериев: наличия/отсутствия облака XIST-PHK в интерфазном ядре, наличия/отсутствия фокального окрашивания антителами к H3K27me3 в интерфазных ядрах; моноаллельной/биаллельной экспрессии гена *POLA1*. Данные, в том числе опубликованные нами ранее для некоторых линий [8, 11], обобщены в табл. 1. Основным и определяющим критерием состояния X-хромосом была моноаллельная или биаллельная экспрессия гена *POLA1*.

Как видно из *табл. 1*, не полностью репрограммированные, так называемые несовершенные клоны ИПСК iPS-6 и iPS-7 проявляли все признаки инактивированной X-хромосомы, как и исходные соматические клетки: облако XIST-РНК и фокус H3K27me3 в интерфазном ядре; в них наблюдалась моноаллельная экспрессия гена *POLA1*. Полностью репрограммированный клон iPS-12 проявлял признаки частичной реактивации по наличию H3K4me2 на обеих X-хромосомах [8], но имел моноаллельную экспрессию *POLA1*. Линия ЭСК hESM01 содержала транскрипционно неактивную X, но утратила такие маркеры инактивации, как облако XIST-РНК и фокус H3K27me3 в интерфазных ядрах.

Линию ИПСК MA-02 и линию ЭСК HUES 9 по всем этим критериям можно отнести к линиям с активной X-хромосомой. В этих линиях не выявлено XIST-облака методом РНК-FISH; фокального окрашивания антителами к H3K27me3 в интерфазных ядрах; наблюдалось окрашивание антителами к маркеру активного хроматина H3K4me2 на обеих X-хромосомах и биаллельная экспрессия гена *POLA1*. Следует отметить, что реактивация X-хромосомы при репрограммировании клеток человека – довольно редкое событие. Большинство клонов, получаемых при обычном репрограммировании, имеют одну X-хромосому в неактивном состоянии [9, 18 и собственные наблюдения].

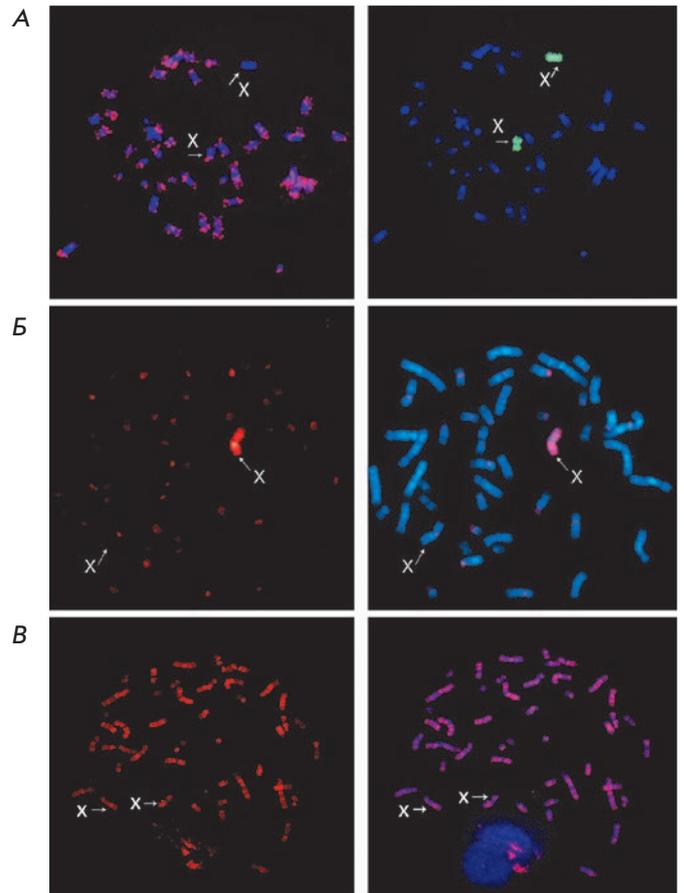
Во всех приведенных в *табл. 1* линиях ЭСК и ИПСК проведен анализ времени репликации X-хромосом.

### Время репликации X-хромосом

Известно, что для гетерохроматина свойственна поздняя репликация, а именно, репликация в поздней S-фазе клеточного цикла после репликации эухроматина. В частности, это характерно и для факультативного гетерохроматина инактивированной X-хромосомы [2]. Для определения времени репликации X-хромосом в S-фазе клеточного цикла был проведен эксперимент по включению BrdU в ново-синтезируемые цепи ДНК при репликации.

После фиксации клеток и приготовления препаратов метафазных хромосом включенный BrdU выявляли с помощью иммуоцитохимического окрашивания антителами против BrdU.

Мы получили картины поздней репликации X-хромосомы во всех линиях с инактивированной X-хромосомой, как в соматических клетках HUVEC, так и в линиях ЭСК (hESM01 и hESM04) и ИПСК (iPS-6, iPS-7, iPS-12). На *рис. 1* показаны два типа включения BrdU в цепи ДНК, наблюдаемые при поздней репликации X-хромосомы. В первом варианте наблюдается включение BrdU во все хромосо-



**Рис. 1.** Определение времени репликации X-хромосом в ПСК человека. Хромосомы X обозначены буквами и указаны стрелками. А, Б – Репрезентативные фотографии асинхронной репликации гомологичных X-хромосом. Репликация неактивной X-хромосомы в поздней S-фазе клеточного цикла. Показаны метафазы клеток линии hESM04. А – BrdU (красный, левая фотография) включен во все хромосомы, кроме одной. На правой фотографии показаны результаты гибридизации этой же метафазы с пробой на X-хромосому (показано зеленым). Хромосомы окрашены синим (DAPI). Б – Включение BrdU (красный, левая фотография) только в одну из хромосом. На этой же метафазе наблюдается включение BrdU в прицентромерный гетерохроматин. На правой фотографии показано совмещение окрашивания BrdU с окрашиванием DAPI (синий), которое использовалось для идентификации X-хромосом. В – Репрезентативная фотография синхронной репликации гомологичных X-хромосом у линий плюрипотентных клеток с двумя активными X-хромосомами. Показана метафаза ЭСК HUES 9. Включение BrdU (красный, левая фотография) происходит во все хромосомы, нет включения в прицентромерные участки хромосом. На правой фотографии показано совмещение окрашивания BrdU с окрашиванием DAPI (синий), которое использовали для идентификации X-хромосом

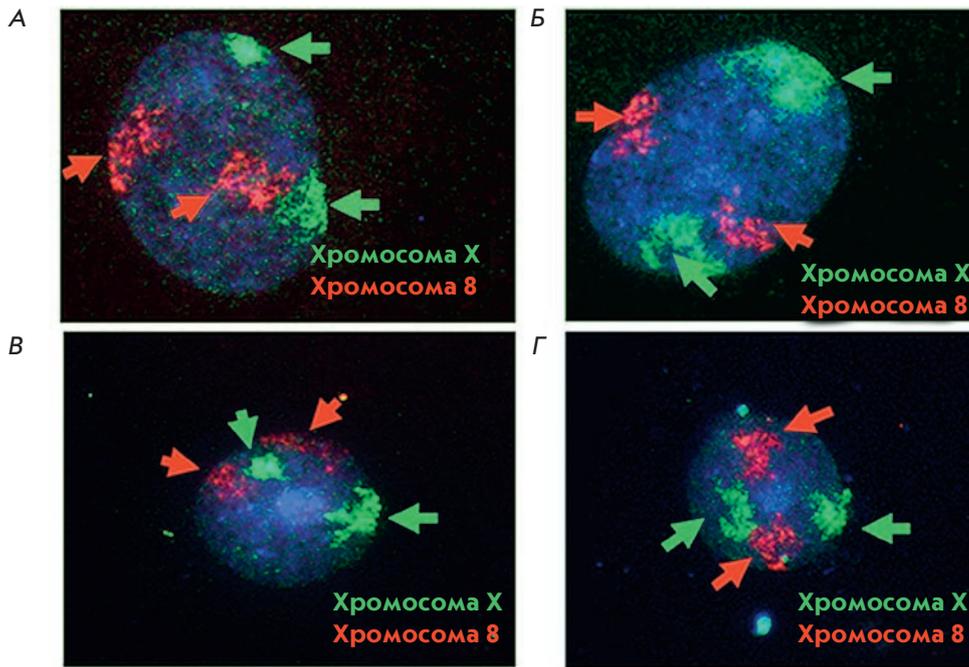


Рис. 2. Пример двух типов компактизации X-хромосом у ПСК человека. А, В – ядро с одной обширной и одной компактной территорией X-хромосомы (на примере линии ЭСК hESM04); Б, Г – две обширные релаксированные территории X-хромосомы (на примере линии ИПСК МА-02). Территории X-хромосом окрашены зеленым цветом; хромосомы 8 – красным, тотальная ДНК ядра – синим цветом (DAPI); зелеными стрелками показаны X-хромосомы, красными – хромосомы 8.

мы, кроме одной из X-хромосом (рис. 1А). Во втором варианте BrdU включается в прицентромерный гетерохроматин, а также в р- и q-плечи одной из хромосом метафазной пластинки – одной из X-хромосом, согласно результатам FISH или инвертированного DAPI-бэндинга (рис. 1В). Одновременная репликация с прицентромерным конститутивным гетерохроматином подтверждает, что наблюдаемый тип включения BrdU соответствует репликации в поздней S-фазе.

Гомологичные X-хромосомы в линиях ПСК с двумя активными X-хромосомами (HUES 9, МА-02) реплицируются почти синхронно, поэтому гомологичные хромосомы практически неотличимы друг от друга по характеру включения BrdU. На рис. 1В показан пример синхронной репликации X-хромосом.

Далее было решено оценить корреляцию между временем репликации X-хромосом и степенью компактизации их хромосомных территорий.

**Степень компактизации X-хромосом в интерфазном ядре не всегда коррелирует со статусом X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека и временем их репликации**

Для определения степени конденсации хроматина мы сравнивали между собой территории двух X-хромосом одного ядра на плоских препаратах интерфазных ядер. Данный метод приготовления препаратов уже использовали ранее для исследования территорий хромосом [19]. В качестве контроля рас-

пределения хромосом на препарате мы использовали одновременное сравнение с аутосомой (хромосомой 8). Аутосомы в клетках млекопитающих находятся в одинаковом эпигенетическом состоянии, и размеры их территорий не различаются. Сравнение территорий хромосом осуществляли с помощью алгоритма (см. «Экспериментальную часть») и сравнения значений дисперсий для каждой индивидуальной хромосомы. Степень компактизации X-хромосомных территорий внутри одного ядра сравнивали с использованием ядер, на которых отчетливо выявляли две несмыкающиеся зоны гибридизации с ДНК-пробой к X-хромосоме. Ядра плюрипотентных клеток распределялись на два типа без промежуточных форм: (1) ядра с одной обширной территорией X-хромосомы с низкой плотностью окраски и одной компактной территорией с высокой плотностью окраски (рис. 2А,В); (2) ядра с двумя обширными территориями X-хромосом с одинаковой плотностью окраски (рис. 2Б,Г). Результаты анализа распределения ядер плюрипотентных клеток по степени компактизации X-хромосом представлены на рис. 3. Показано соотношение (%) компактных и релаксированных территорий во всех линиях клеток. Хромосомные территории в плюрипотентных клетках с двумя активными X-хромосомами в подавляющем большинстве просчитанных ядер (более 90%) были релаксированными.

В линиях клеток, где процесс репрограммирования не завершился полностью, т.е. в клонах, не являющихся истинно плюрипотентными (iPS-6

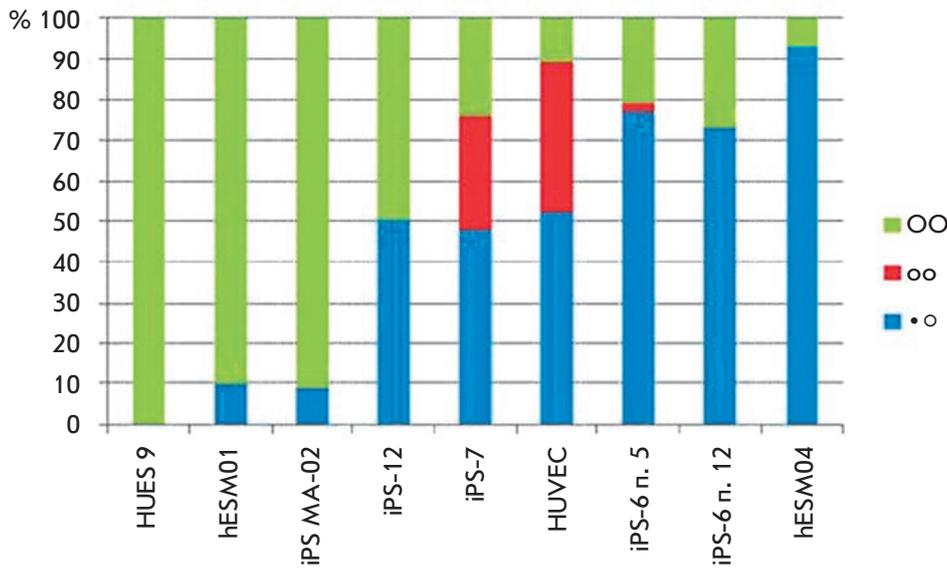


Рис. 3. Процентное соотношение ядер с разной степенью компактизации хромосомных территорий в ПСК человека и линии эндотелиальных клеток HUVEC. OO – ядра, несущие две декомпактизированные (релаксированные) хромосомные территории (обозначены на диаграмме зеленым цветом); •O – ядра, несущие одну компактную и одну релаксированную хромосомную территорию (синий цвет); oo – «соматический» тип компактизации с ядрами, несущими две небольшие компактные хромосомные территории (красный цвет).

и iPS-7), наблюдался также третий тип состояния конденсированности хроматина. В этом случае две территории X-хромосом слабо различаются по размеру и обе имеют большую степень конденсации хроматина, так же как и аутосомы в этих клетках и в преобладающей части клеток HUVEC, которые и были изначально объектом репрограммирования (рис. 3). Следует отметить, что в некоторых работах по изучению организации территорий X-хромосом в соматических клетках также не выявлено различий в объеме территорий активной и неактивной X-хромосомы [2, 20, 21]. Различие между соматическими и плюрипотентными клетками может объясняться значительно большей пластичностью ядерного хроматина в плюрипотентных клетках по сравнению с более компактным хроматином соматических клеток [1, 22]. Интересно отметить, что в процессе культивирования клона ИПСК iPS-6 с 5-го по 12-й пассаж клетки утратили хромосомную территорию «соматического» типа, и на более позднем пассаже большинство клеток имели одну компактную и одну релаксированную территорию X-хромосом.

Результаты сопоставления степени компактизации X-хромосом и времени их репликации представлены в табл. 2.

Большинство ядер в клетках линии hESM04 имели одну компактную и одну релаксированную территорию X-хромосомы (рис. 2), что сопровождалось выраженной асинхронной репликацией X-хромосом. Тем не менее корреляции между поздней асинхронной репликацией и компактностью хромосомной тер-

ритории Xi не наблюдалось в других линиях плюрипотентных клеток.

Как видно из табл. 2, несмотря на то, что линия ЭСК hESM01 имела обе X-хромосомные территории в релаксированном состоянии, репликация X-хромосом в этой линии происходила асинхронно, с репликацией одной из X-хромосом в поздней S-фазе. У клона ИПСК iPS-12 половина ядер имела две одинаковые X-хромосомные территории в релаксированном состоянии, тем не менее, несмотря на частичные цитологические признаки реактивации (наличие H3K4me2, табл. 1), одна из X-хромосом реплицировалась в поздней S-фазе во всех проанализированных клетках ( $N > 20$ ) и имела статус Xi.

Линии ЭСК HUES 9 и ИПСК MA-02, у которых гомологичные X-хромосомы реплицировались практически синхронно и ни одна из X-хромосом не характеризовалась поздней репликацией, имели две релаксированные территории X-хромосом (во всех ядрах в случае HUES 9 и в подавляющем большинстве ядер MA-02) (табл. 2).

Таким образом, суммируя данные, полученные на всех использованных в работе клеточных линиях, можно предположить, что статус Xi может сохраняться в плюрипотентных клетках без формирования классического «тельца Барра», т.е. компактно упакованной хромосомной территории. Тем не менее активный статус обеих X-хромосом и переход к синхронной репликации при репрограммировании требуют нахождения обеих X-хромосом в релаксированном состоянии в интерфазном ядре. При репрограммировании до плюрипотентного со-

**Таблица 2.** Сравнение компактизации хромосомных территорий X-хромосом в интерфазном ядре и времени их репликации

Линия клеток	•О, %*	оо, %*	ОО, %*	Репликация
HUES 9	0		100	Синхронная не поздняя
hESM04	93		7	Асинхронная, поздняя у Xi
hESM01	10		90	То же
HUVEC	52	37	11	«
iPS-7	48	28	24	«
iPS-6 п. 5	77	2	21	«
iPS-6 п. 12	73		27	«
iPS-12	50		50	«
iPS MA-02	3		97	Синхронная не поздняя

\*•О – ядра, несущие одну компактную и одну релаксированную хромосомные территории; оо – ядра, несущие две небольшие компактные хромосомные территории («соматический» тип компактизации); ОО – ядра, несущие две декомпактизированные (релаксированные) хромосомные территории.

стояния в тех случаях, когда происходит частичная или полная реактивация Xi, релаксация хромосомной территории происходит, скорее всего, раньше, чем исчезновение основных марок гетерохроматина H3K27me3 и H3K9me3, как видно на примере клона ИПСК iPS-12.

Ранее было показано, что длительное культивирование «несовершенных» ИПСК часто ведет к завершению репрограммирования, приобретению плюрипотентного состояния и потере характеристик соматических клеток. Изменение компактизации территорий X-хромосомы, которая произошла в процессе культивирования клона ИПСК iPS-6, показывает, что этот параметр может быть дополнительным маркером репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В наших исследованиях показано, что ПСК человека с инактивированной X-хромосомой могут иметь как релаксированную, так и компактную хромо-

сомную территорию неактивной X-хромосомы. Линии ЭСК, в которых обе X-хромосомы активны, или линии ИПСК, в которых X-хромосома реактивировалась в процессе репрограммирования, имеют декомпактизированные хромосомные территории X в интерфазном ядре.

Таким образом, можно заключить, что в ПСК человека существует механизм поддержания инактивированного состояния X-хромосомы, который не зависит напрямую от степени компактизации ее хромосомной территории в интерфазном ядре. Поздняя репликация инактивированной X-хромосомы также не зависит от степени ее компактизации.

С другой стороны, для перехода к активному состоянию X-хромосомы при ее реактивации и синхронной репликации необходима декомпактизация территории X-хромосомы.

*Работа поддержана Программой Правительства Москвы и РФФИ (гранты № 11-04-01212-а и 10-04-01736-а).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bártová E., Galiová G., Krejčí J., Harnicarová A., Strásák L., Kozubek S. // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 3690–702.
2. Visser A.E., Eils R., Jauch A., Little G., Bakker P.J., Cremer T., Aten J.A. // *Exp. Cell Res.* 1998. V. 243. P. 398–407.
3. Ryba T., Hiratani I., Lu J., Itoh M., Kulik M., Zhang J., Schulz T.C., Robins A.J., Dalton S., Gilbert D.M. // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 761–770.
4. Plath K., Mlynarczyk-Evans S., Nusinow D.A., Panning B. // *Annu. Rev. Genet.* 2002. V. 36. P. 233–278.
5. Hoffman L.M., Hall L., Batten J.L., Young H., Pardasani D., Baetge E.E., Lawrence J., Carpenter M.K. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 1468–1478.
6. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4820–4825.
7. Shen Y., Matsuno Y., Fouse S.D., Rao N., Root S., Xu R., Pel-

- legrini M., Riggs A.D., Fan G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 4709–4714.
8. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. P. 937–946.
9. Tchieu J., Kuoy E., Chin M.H., Trinh H., Patterson M., Sherman S.P., Aimiwu O., Lindgren A., Hakimian S., Zack J.A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. P. 329–342.
10. Marchetto M.C., Carromeu C., Acab A., Yu D., Yeo G.W., Mu Y., Chen G., Gage F.H., Muotri A.R. // *Cell*. 2010. V. 143. P. 527–539.
11. Lagarkova M.A., Ereemeev A.V., Svetlakov A.V., Rubtsov N.B., Kiselev S.L. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 284–293.
12. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. P. 1353–1356.
13. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 481–485.
14. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
15. Shutova M.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 2. P. 91–92.
16. Shutova M.V., Chestkov I.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Springer Protocols Handbook ser.* 2012. P. 133–149.
17. Bacher C.P., Guggiari M., Brors B., Augui S., Clerc P., Avner P., Eils R., Heard E. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. P. 293–299.
18. Bruck T., Benvenisty N. // *Stem Cell Res.* 2011. V. 6. P. 187–193.
19. Federico C., Cantarella C.D., Di Mare P., Tosi S., Saccone S. // *Chromosoma*. 2008. V. 117. P. 399–410.
20. Eils R., Dietzel S., Bertin E., Schröck E., Speicher M.R., Ried T., Robert-Nicoud M., Cremer C., Cremer T. // *Cell Biol.* 1996. V. 135. P. 1427–1440.
21. Teller K., Illner D., Thamm S., Casas-Delucchi C.S., Versteeg R., Indemans M., Cremer T., Cremer M. // *Nucleus*. 2011. V. 2. P. 465–477.
22. Meshorer E., Yellajoshula D., George E., Scambler P.J., Brown D.T., Misteli T. // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. P. 105–116.