

УДК 57.017.642:576.3+602.9:577.112.823

Эпигенетика плюрипотентных клеток

С. П. Медведев^{1,2,3}, Е. А. Покушалов², С. М. Закиян^{1,2,3*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10²Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина Минздравсоцразвития Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.08.2012

РЕФЕРАТ Плюрипотентность клеток поддерживается сложнейшей системой, включающей генетический и эпигенетический уровни. Исследования последних лет показывают, что генетический уровень, включающий транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК, тесно взаимодействует с системой ферментов и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Взаимодействие этих двух систем формирует уникальное состояние хроматина, существующее в плюрипотентных клетках. В представленном обзоре рассмотрены особенности эпигенетики эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Особое внимание уделено взаимодействию транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG с белками группы Polycomb и другими молекулами, участвующими в регуляции структуры хроматина. Обсуждено участие транскрипционных факторов системы поддержания плюрипотентности в процессе инактивации X-хромосомы. Рассмотрены также эпигенетические события, происходящие при репрограммировании соматических клеток к плюрипотентному состоянию, и проблемы, связанные с «эпигенетической памятью».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ковалентные модификации гистонов, метилирование ДНК, плюрипотентность, эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМО – дифференциально метилированные области; ВКМ – внутренняя клеточная масса; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентность – это свойство клеток дифференцироваться в производные всех трех первичных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы, а также образовывать во время эмбрионального развития клетки-предшественники функциональных гамет. Плюрипотентными являются клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) и эпибласта предимплантационных эмбрионов млекопитающих [1]. В онтогенезе из плюрипотентных клеток формируется взрослый организм. Однако эти клетки не способны дать начало внезародышевым органам и тканям.

Из клеток внутренней клеточной массы предимплантационных эмбрионов получают эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [2–4]. При сохранении оптимальных условий культивирования ЭСК в течение продолжительного времени могут сохранять ряд свойств, присущих клеткам внутренней клеточной массы и эпибласта эмбриона, в том числе плюрипо-

тентность [2–4]. Плюрипотентность ЭСК делает их перспективными объектами для фундаментальных и прикладных исследований. ЭСК используют в качестве модельных систем при изучении процессов, происходящих в раннем эмбриогенезе млекопитающих, а также для моделирования заболеваний *in vitro*. Кроме того, плюрипотентные клетки служат перспективным источником материала для заместительной клеточной терапии [5–7].

После того как были получены первые линии ЭСК мыши и человека, началось изучение молекулярно-генетических основ поддержания недифференцированного, плюрипотентного состояния ЭСК. На сегодняшний день известно, что поддержание плюрипотентного статуса клеток предимплантационных эмбрионов и ЭСК обеспечивается сложной системой поверхностных клеточных белков, их молекулярных сигнальных путей и транскрипционных факторов, иницирующих транскрипцию генов-мишеней. Подсистема так называемых «внешних

регуляторов плюрипотентности» включает в себя несколько сигнальных путей, основными из которых являются каскады, запускаемые белками LIF, BMP4, TGF β , активином A, NODAL и bFGF (FGF2) [1].

Другая подсистема, регулирующая плюрипотентность ЭСК, – подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности» – транскрипционных факторов, действующих в ядрах клеток. К числу ключевых регуляторов в данной подсистеме относятся факторы OCT4, NANOG и SOX2 [8, 9].

В 2006 году группа японских ученых опубликовала в журнале «Cell» результаты своих экспериментов по репрограммированию соматических клеток мыши в плюрипотентное состояние [10]. Это стало одним из наиболее ярких открытий последнего десятилетия в области клеточной биологии. Клетки, полученные в результате репрограммирования соматических клеток, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) [10].

Развитие технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток животных и человека открыло новые возможности изучения динамики эпигенетических событий, происходящих при репрограммировании, и особенностей эпигеномов плюрипотентных клеток. К настоящему времени известно множество хорошо воспроизводимых способов получения ИПСК из широкого спектра соматических клеток. Большая часть исследователей используют для репрограммирования определенный набор генов, большинство из которых кодируют факторы транскрипции. Это такие гены, как *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* и *Lin28* [10–13]. Кроме того, показано, что ИПСК мыши и человека можно получить с помощью микроРНК [14, 15]. ИПСК успешно получены из соматических клеток различного типа. Впервые ИПСК получили из фибробластов различного происхождения, позже из кератиноцитов, меланоцитов, клеток крови, нейтральных стволовых клеток, β -клеток поджелудочной железы, В-лимфоцитов и других клеток [16–22]. Таким образом, можно заключить, что ИПСК могут быть получены из клеток, происходящих из всех трех первичных зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы), хотя эффективность и динамика получения стабильных линий ИПСК существенно зависят от использованного способа и типа соматических клеток [14, 23]. ИПСК, получающиеся в результате прямого репрограммирования, имеют ряд общих свойств, что делает их столь перспективными моделями для исследований в области биологии плюрипотентных клеток, а также дает возможность использовать эти клетки для моделирования заболеваний человека и в регенеративной медицине [6, 7]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки по своим свойствам очень близки

к эмбриональным стволовым клеткам, которые получают из предимплантационных эмбрионов мыши и человека. Клетки этих двух типов обладают сходной морфологией, чувствительностью к факторам роста и сигнальным молекулам, паттерну экспрессии генов и дифференцировки [24]. В частности, ИПСК могут образовывать при дифференцировке *in vitro* эмбрионидные тельца, состоящие из производных всех трех зародышевых листков. Кроме того, ИПСК человека могут образовывать тератомы, а ИПСК мыши дают химеры, а при инъекции в тетраплоидные бластоцисты даже способны формировать целый организм [25–27]. Совершенно очевидно, что все эти свойства, характерные для плюрипотентных клеток, определяются особым состоянием эпигенома, которое у ЭСК «наследуется» от клеток внутренней клеточной массы эмбрионов, а в случае ИПСК формируется в процессе репрограммирования.

Исследования последних лет показывают, что транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК тесно взаимодействуют с системой ферментов и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Это взаимодействие формирует уникальное состояние хроматина в плюрипотентных клетках.

В данном обзоре рассмотрены особенности эпигеномов эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Особое внимание уделено взаимодействию транскрипционных факторов OCT4, SOX2 и NANOG с белками группы Polycomb и другими молекулами, участвующими в регуляции структуры хроматина. Обсуждено участие транскрипционных факторов системы поддержания плюрипотентности в процессе инактивации X-хромосомы. Кроме того, рассмотрены эпигенетические события, происходящие при репрограммировании соматических клеток к плюрипотентному состоянию, и проблемы, связанные с «эпигенетической памятью».

БИВАЛЕНТНЫЕ ДОМЕНЫ ХРОМАТИНА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Бивалентными доменами называют области хроматина, обогащенные одновременно метками активного и неактивного хроматина – H3K4me3 и H3K27me3 [28]. Эти домены обнаружены в ЭСК мыши и человека [28–31]. Гены, точки старта транскрипции которых ассоциированы с бивалентными доменами, характеризуются низким уровнем транскрипции, несмотря на присутствие метки активного хроматина H3K4me3, что говорит о «доминировании» H3K27me3 над H3K4me3. В бивалентных доменах обнаружен высокий уровень варианта H2AZ гистона H2A [32]. Большинство бивалентных доменов ас-

социированы с точками начала транскрипции генов, связанных с развитием, например, транскрипционных факторов семейств HOX, SOX, FOX, PAX, IRX и POU [28]. В ходе дифференцировки большинство бивалентных доменов превращаются в моновалентные, содержащие либо H3K27me3, либо H3K4me3, в зависимости от типа дифференцированных производных [28, 33]. Однако часть доменов остается в бивалентном состоянии и присутствует в эпигеномах клеток-предшественников [33, 34]. В целом существование бивалентных доменов и сохранение меток активного хроматина в промоторных областях генов, вовлеченных в поддержание недифференцированного состояния, позволяют быстро переключать программу транскрипции генов при дифференцировке в те или иные производные.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ С БЕЛКАМИ ГРУППЫ POLYCOMB И ФАКТОРАМИ, РЕМОДЕЛИРУЮЩИМИ ХРОМАТИН

Существование в ЭСК так называемого «открытого» хроматина и одновременная надежная репрессия генов дифференцировки обеспечиваются системой взаимодействий как на уровне белок–ДНК, так и на уровне белок–белок. Изучение протеома плюрипотентных клеток и, в частности, белков, образующих основную систему поддержания плюрипотентности (OCT4, NANOG, SOX2), показало, что белки не только взаимодействуют между собой, регулируя транскрипцию множества генов, но и образуют сложную сеть взаимодействий с другими транскрипционными факторами и белками, участвующими в модификациях и ремоделировании хроматина. Белки, вовлеченные в поддержание плюрипотентности, взаимодействуют с компонентами таких белковых комплексов, как PRC1 и 2, BAF, NuRD и др. [35–38].

БЕЛКИ ГРУППЫ POLYCOMB. КОМПЛЕКСЫ PRC1 И 2

Белки группы Polycomb – эволюционно консервативное семейство регуляторов структуры хроматина. Функция белков этой группы заключается в установлении и поддержании транскрипционного сайленсинга гомеозисных генов [39–41].

У млекопитающих известно два комплекса, относящихся к семейству Polycomb: PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) и PRC2, которые выполняют важнейшие функции в эмбриональном развитии, а также в поддержании самообновления и нормальной дифференцировки стволовых клеток.

Комплекс PRC1 млекопитающих состоит из нескольких субъединиц, гомологи которых имеются у дрозофилы: CBX1, 2 и 3, MEL18, BMI1, RING1A

(RING1), RING1B (RNF2) и PRC1, 2 и 3. Функцией PRC1 считается поддержание генов в репрессированном состоянии, которое первоначально устанавливается комплексом PRC2. Реализуется данная функция благодаря активности субъединиц RING1A и 1B, которые являются E3-лигазами и осуществляют моноубиквитинирование гистона H2A в положении K119 (H2AK119Ub1) [42–44]. Мыши с мутациями в генах субъединицы PRC1 (кроме RING1B) остаются жизнеспособными, что может говорить о существовании дублирующих механизмов либо об избыточности функции PRC1 для нормальной регуляции эмбрионального развития [45]. Однако установлено, что компоненты комплекса PRC1, например BMI1, необходимы для функционирования нескольких типов региональных стволовых клеток (гемопоэтических, нейтральных, стволовых клеток легких и кишечника) [46–49]. Интересно, что функция BMI1 и PRC1 в региональных стволовых клетках сводится, по всей видимости, к контролю системы регуляции уровня активных форм кислорода в митохондриях [50]. Кроме того, отсутствие RING1A и 1B вызывает спонтанную дифференцировку ЭСК мыши и активацию генов, связанных с дифференцировкой клеток и развитием. Интересно, что промоторы большого числа генов, репрессируемых PRC1, связываются с транскрипционным фактором OCT4, который также принимает участие в репрессии транскрипции этих генов. При этом связывание PRC1 с генами-мишенями зависит от OCT4, тогда как связывание OCT4, напротив, не зависит от PRC1 [51]. Протеомные исследования показывают, что RING1B (RNF2) физически взаимодействует с транскрипционным фактором NANOG в ЭСК [37]. Эти факты указывают на тесную связь между системой транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентность, и системой регуляторов структуры хроматина, в частности PRC1.

Недавно была обнаружена новая функция белков CBX, компонентов комплекса PRC1, в регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК мыши [52, 53] (рис. 1). У млекопитающих известно пять белков CBX, ассоциированных с PRC1 – CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 и CBX8 [54]. С использованием методов ChIP-Seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием обогащенной ДНК) и коиммунопреципитации было показано, что в недифференцированных ЭСК мыши 97% сайтов связывания белка CBX7 содержат комплексы PRC1 и PRC2, а 86% из них также маркированы H3K27me3. Несколько сайтов, расположенных в пределах генов, связаны с развитием, например, сайты в кластере генов семейства HOX [52].

При помощи количественного протеомного анализа также показано, что в недифференцированных ЭСК

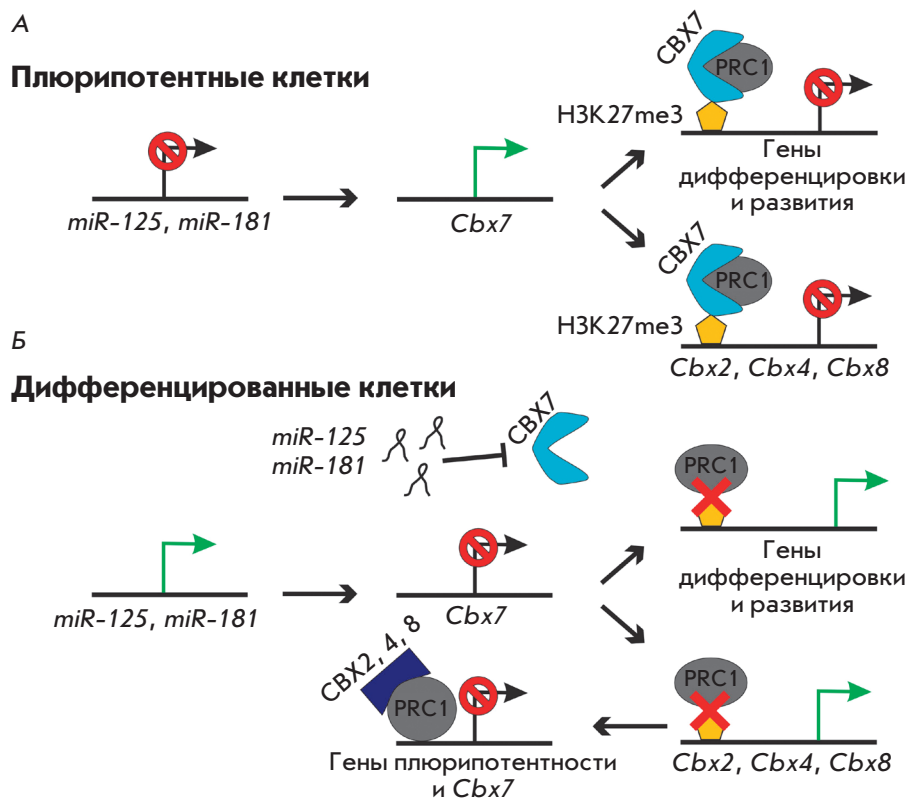


Рис. 1. Модель, иллюстрирующая роль белков СВХ в регуляции функции PRC1 в плюрипотентных клетках и при дифференцировке. А – В плюрипотентных клетках комплекс СВХ7 / PRC1 связывается с регуляторными областями генов, связанных с развитием и дифференцировкой, а также генов, кодирующих белки СВХ2, 4 и 8, подавляя их транскрипцию. При этом связывание комплекса зависит от присутствия метки H3K27me3, устанавливаемой комплексом PRC2. Б – Во время дифференцировки активируется экспрессия микроРНК *miR-125* и *miR-181*, которые подавляют экспрессию СВХ7. Исчезновение комплекса СВХ7 / PRC1 вызывает активацию генов дифференцировки, а также генов *Cbx2*, 4 и 8. Комплекс PRC1 с белками СВХ2, СВХ4 и СВХ8 подавляет транскрипцию генов, ответственных за поддержание плюрипотентности, и гена *Cbx7* [55]

мышь только СВХ7 сококалится с H3K27me3, в то время как в дифференцированных клетках и фибробластах с данной модификацией гистона взаимодействуют СВХ2 и СВХ8 [53]. Кроме того, методом иммунопреципитации хроматина установлено, что СВХ7 в комплексе с PRC1 взаимодействует с промоторами генов *Cbx2*, *Cbx4* и *Cbx8*, подавляя их транскрипцию в ЭСК [52]. Во время дифференцировки, напротив, в комплекс с PRC1 вступают СВХ2, СВХ4 и СВХ8, которые могут участвовать в репрессии *Cbx7* [52, 53]. Подавление экспрессии *Cbx7* в ЭСК приводит к повышению экспрессии генов *Cbx2*, *Cbx4* и *Cbx8*, нарушению морфологии ЭСК и спонтанной дифференцировке. Эктопическая повышенная экспрессия *Cbx7* подавляет дифференцировку и инактивацию X-хромосомы в клетках самок, а также усиливает их самообновление [53]. Кроме того, в подавлении транскрипции *Cbx7* участвуют микроРНК *miR-125* и *miR-181*, что подтверждает важную роль микроРНК в регуляции действия белков Polycomb [53]. Таким образом, в регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК принимает участие динамическая система комплексов PRC1 с белками СВХ, которые взаимно регулируют друг друга. Действие этих комплексов контролируется PRC2 (H3K27me3), а их комбинации меняются в зависимости от статуса клетки (рис. 1).

Белковый комплекс PRC2 млекопитающих содержит субъединицы EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12) и EZH1 (Enhancer of Zeste 1) или EZH2 (Enhancer of Zeste 2). Субъединица EZH2 – белок с SET-доменом, который входит в состав белков, функционирующих как гистон-метилтрансферазы, осуществляя ди- и триметилирование остатка K27 гистона H3 (H3K27me2/3). В отличие от PRC1, мутации генов субъединиц PRC2 вызывают значительные нарушения эмбрионального развития и приводят к гибели эмбриона [45, 56, 57]. Например, в эмбрионах, мутантных по гену *Eed*, отсутствует метилирование H3K27, нарушена гастрюляция (изменен паттерн первичной полосы в переднезаднем направлении), гипертрофирована внезародышевая мезодерма и недоразвита эмбриональная мезодерма [57, 58]. Однако из мутантных по *Eed* бластоцист можно получить ЭСК, которые обладают свойством плюрипотентности, хотя и склонны к спонтанной дифференцировке [59]. Сходная ситуация отмечена и у мутантов по *Suz12*. Наблюдается гибель эмбрионов мыши, мутантных по *Suz12*, но можно успешно получить ЭСК. Хотя ЭСК, полученные из мутантных эмбрионов, имеют высокий уровень транскрипции генов дифференцировки, они не образуют нейроны при дифференцировке *in vitro* и очень слабо – производные энтодермы при форми-

Эмбриональные стволовые клетки

Дифференцированные клетки

PRC2

PRC1

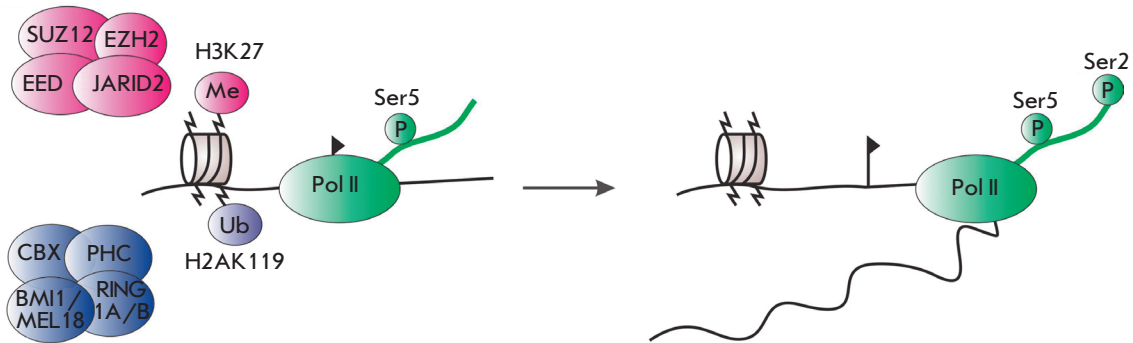


Рис. 2. Белок JARID2 необходим для привлечения Ser5-фосфорилированной формы РНК-полимеразы II в бивалентные домены эпигенома ЭСК мыши. В плюрипотентных клетках формирование «бивалентных доменов» нуждается в присутствии РНК-полимеразы II (Pol II), фосфорилированной по Ser5 (зеленый овал) в промоторных областях генов, экспрессия которых подавляется комплексом PRC2. Субъединицы комплекса PRC2 осуществляют метилирование H3K27, что, в свою очередь, привлекает комплекс PRC1, осуществляющий моноубиквитинирование H2AK119 [68]

ровании эмбрионных теллец [56]. Делеция гена *Ezh2* не приводит к каким-либо изменениям свойств ЭСК, полученных из мутантных эмбрионов, что можно объяснить действием субъединицы EZH1, также обладающей гистон-метилтрансферазной активностью и опосредующей установление метки неактивного хроматина в пределах генов-мишеней PRC2 [60].

Недавно обнаружили, что одной из субъединиц комплекса PRC2 является белок JARID2 из семейства JUMONJI C (JMJC). Белки семейства JUMONJI относятся к гистон-деметилазам, однако JARID2 не обладает такой активностью. Показано, что JARID2 необходим для эффективного связывания PRC1 и PRC2 с промоторами генов-мишеней, а паттерн связывания PRC2 и JARID2 с ДНК генов-мишеней в масштабе генома ЭСК мыши совпадает более чем на 90% [61–66]. Существует множество противоречивых экспериментальных данных о влиянии нокаута или нокдауна гена *Jarid2* на уровень H3K27me3 в промоторах генов-мишеней PRC2. В некоторых работах наблюдали понижение уровня H3K27me3 [63, 65, 66], тогда как сообщается и об отсутствии изменений [61], и о повышении уровня H3K27me3 [62]. Однако показано, что в ЭСК с дефицитом JARID2 нарушен или замедлен процесс дифференцировки, т.е. JARID2 каким-то образом влияет на плюрипотентность [62, 63, 66]. Кроме того, JARID2 совместно с белками MTF2 и esPRC2p48 способен усиливать эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из эмбриональных фибробластов мыши с помощью сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*

и *Klf4*. При этом нокаут генов, кодирующих JARID2, MTF2 и esPRC2p48, напротив, существенно подавляет репрограммирование [67].

Существует несколько гипотез о молекулярных основах влияния JARID2 на плюрипотентность клеток, ни одна из которых пока не нашла достаточных экспериментальных доказательств [68]. Возможно, что основная функция JARID2 заключается не в модулировании гистон-метилтрансферазной активности PRC2, а в привлечении особой иницирующей формы РНК-полимеразы II [66, 68] (рис. 2). У этой формы РНК-полимеразы фосфорилирован остаток серина в пятом положении (Ser5P-RNAP) (в элонгирующей форме фосфорилирован также остаток серина во втором положении), ее присутствие характерно для бивалентных доменов эпигенома, в формировании которых принимают участие PRC1 и PRC2 [69, 70]. По всей видимости, присутствие данной формы полимеразы в пределах промоторов генов, вовлеченных в дифференцировку клеток, необходимо для быстрого и надежного переключения программ транскрипции при запуске процесса дифференцировки.

Таким образом, можно заключить, что PRC2 играет важнейшую роль в регуляции развития млекопитающих и дифференцировки ЭСК, однако, этот комплекс не влияет на процесс получения ЭСК и их самообновление. На сегодняшний момент получены многочисленные экспериментальные доказательства совместной регуляции генов-мишеней комплексом PRC2 и транскрипционными факторами OCT4, SOX2

и NANOG, находящимися в центре системы регуляции транскрипции генов в ЭСК мыши и человека. Исследования, проводимые в масштабе целых геномов, показали, что OCT4, SOX2, NANOG и субъединицы PRC2 солокализуются в пределах генов, ответственных за развитие, внутриклеточную передачу сигналов, морфогенез и органогенез, а следовательно, могут действовать совместно [8, 28, 71, 72].

КОМПЛЕКС TRITHORAX (TRXG)

Белки комплекса Trithorax – одни из основных регуляторов эмбрионального развития как беспозвоночных, так и позвоночных животных [73]. В развитии комплекс Trithorax действует противоположно белкам группы Polycomb, устанавливая модификацию H3K4me3, которая, в основном, ассоциирована с активацией транскрипции. В отличие от комплексов PRC1 и PRC2, роль белков Trithorax в поддержании плюрипотентности клеток изучена слабо [74]. Как и у беспозвоночных животных, у млекопитающих Trithorax представляет собой мультисубъединичный комплекс, содержащий гистон-метилтрансферазы SET/MLL. Ферментам SET/MLL для активации необходимы основные субъединицы комплекса – WDR5, ASH2L и RBBP5 [75]. При этом известно, что гетеродимер ASH2L и RBBP5 непосредственно участвуют в гистон-метилтрансферазной активности комплекса MLL1 [76]. Кроме того, существуют экспериментальные доказательства того, что белок ASH2L необходим для нормального эмбриогенеза и инактивации X-хромосомы у самок мыши [77]. Субъединица WDR5 также является основным компонентом комплекса Trithorax млекопитающих. Ее функция заключается в «представлении» остатков H3K4, а также в осуществлении эффективного взаимодействия всего комплекса Trithorax с H3K4 и реализации его гистон-метилтрансферазной активности [75]. Кроме того, известно, что WDR5 опознает H3K4me2 и опосредует переход H3K4 в триметилированное состояние (H3K4me3) [78]. Недавно было обнаружено, что WDR5 необходим не только для нормального развития позвоночных, но и играет важнейшую роль в поддержании плюрипотентности ЭСК и репрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию [74]. Установлено, что подавление экспрессии WDR5 резко снижает самообновление ЭСК мыши. Протеомные исследования позволили установить, что WDR5 физически взаимодействует с транскрипционным фактором OCT4 в недифференцированных ЭСК, и мишени этих двух белков в значительной степени перекрываются. Таким образом показано, что комплекс Trithorax вместе с факторами OCT4, SOX2 и NANOG позитивно регулирует транскрипцию генов в ЭСК мыши. Более того, в экспериментах по репрограммированию соматических клеток показано, что комплекс Trithorax

(WDR5) необходим для эффективного образования клонов ИПСК [74].

КОМПЛЕКС VAF

Многочисленные исследования показывают, что АТФ-зависимые белковые комплексы, ремоделирующие хроматин, играют важнейшую роль в эмбриональном развитии млекопитающих в целом и в поддержании плюрипотентности клеток в частности [79–84]. У млекопитающих известно около 30 белков, обладающих АТФ-зависимой хроматин-ремоделирующей активностью. Эти белки объединены в несколько семейств в соответствии со структурой АТФ-азного домена. В клетках млекопитающих ремоделирующие хроматин АТФ-азы взаимодействуют друг с другом и с другими белками и действуют в составе белковых комплексов, состоящих из нескольких субъединиц. Примерами таких комплексов могут служить VAF, NuRD, ISWI. Белковый комплекс VAF участвует в перераспределении нуклеосом хроматина, он присутствует во всех типах клеток. Однако субъединичный состав этого комплекса может различаться в клетках разного типа, за счет чего осуществляется специфичный для каждого типа клеток контроль структуры хроматина. ЭСК содержат комплекс VAF, названный esVAF, который, в свою очередь, состоит из специфичного набора субъединиц BRG, VAF155 и VAF60a, но не содержит субъединицы BRM, VAF170 или VAF60c [83, 84]. Экспериментально показано, что инактивация большинства субъединиц комплекса VAF вызывает гибель эмбрионов мыши на ранних стадиях развития, а также приводит к онкотрансформации клеток [79, 85–88]. Кроме того, в случае потери субъединиц BRG, VAF47 и VAF155, гибель эмбрионов обусловлена нарушением формирования плюрипотентных клеток. Масштабный скрининг библиотек интерферирующих РНК также показал, что такие субъединицы, как BRG и VAF155, необходимы для поддержания морфологии колоний ЭСК и экспрессии гена *Nanog* [89, 90]. Согласно протеомным данным несколько субъединиц, хроматин-ремоделирующих комплексов физически взаимодействуют с белками OCT4 и NANOG в ЭСК [35–38, 83, 84].

Транскрипционные факторы OCT4 и NANOG могут взаимодействовать с комплексами, ремоделирующими структуру хроматина, посредством специфических белков [37, 90]. Например, показано, что белок скаффолда хромосом TIF1b (Transcription Intermediary Factor-1b) необходим для поддержания активности трансгена *GFP* под контролем промотора *Oct4* в ЭСК [92]. Интересно, что ранее TIF1b был известен как белок, участвующий в транскрипционном сайленсинге и формировании гетерохроматина

через привлечение гетерохроматинового белка HP1, гистон-метилтрансферазы SETDB1 и NuRD. Однако фосфорилированная форма TIF1b может взаимодействовать с ЭСК-специфичной формой комплекса BAF, локализуется в эухроматине и способна влиять на эффективность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [91]. Кроме того, сверхэкспрессия ЭСК-специфичных компонентов этого комплекса – BRG1 и BAF155 – повышает эффективность репрограммирования соматических клеток в отсутствие сверхэкспрессии гена *c-Myc* [93, 94].

Недавно было показано, что комплекс esBAF связан непосредственно с работой сигнального каскада LIF-STAT3, необходимого для поддержания плюрипотентности ЭСК мыши [95, 96]. Транскрипционный фактор STAT3 активирует, как известно, группы генов в разных типах клеток, содержащих специфические комплексы BAF, но только в ЭСК он участвует в регуляции набора генов-мишеней, необходимых для сохранения недифференцированного статуса ЭСК. Однако долгое время оставалось неизвестным, каким образом осуществляется такое специфическое действие STAT3.

В работе Л. Хо и соавт. [96] установлено, что в геноме ЭСК мыши связывание STAT3 с сайтами-мишенями зависит от BRG1, АТФ-азной субъединицы ЭСК-специфичного комплекса esBAF. Действие BRG1 в пределах сайтов связывания STAT3 создает структуру хроматина, строго необходимую для активации генов интерлейкином LIF. Делеция BRG1 вызывает опосредованный PRC2 транскрипционный сайленсинг множества генов в масштабе всего генома, посредством модификаций гистона H3K27me3. Транскрипционному сайленсингу подвергаются и гены-мишени STAT3. На основании этих фактов сделан вывод, что основная роль BRG1 в ЭСК мыши заключается в усилении действия сигнального каскада LIF-STAT3 и противодействии репрессии данного каскада белком Polycomb (PRC2). Интересно, что BRG1 может действовать совместно с Polycomb, усиливая репрессию генов дифференцировки, например генов семейства HOX. Таким образом, комплекс esBAF действует как антагонистично, так и синергично с PRC2, однако, оба типа действия направлены на поддержание плюрипотентности [96] (рис. 3).

КОМПЛЕКС NuRD

Белковый комплекс NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) млекопитающих, который проявляет АТФ-зависимую ремоделирующую и гистон-деацетилазную активность), состоит минимум из шести субъединиц [97, 98]. NuRD содержит гистон-деацетилазы HDAC1 и HDAC2, активность которых

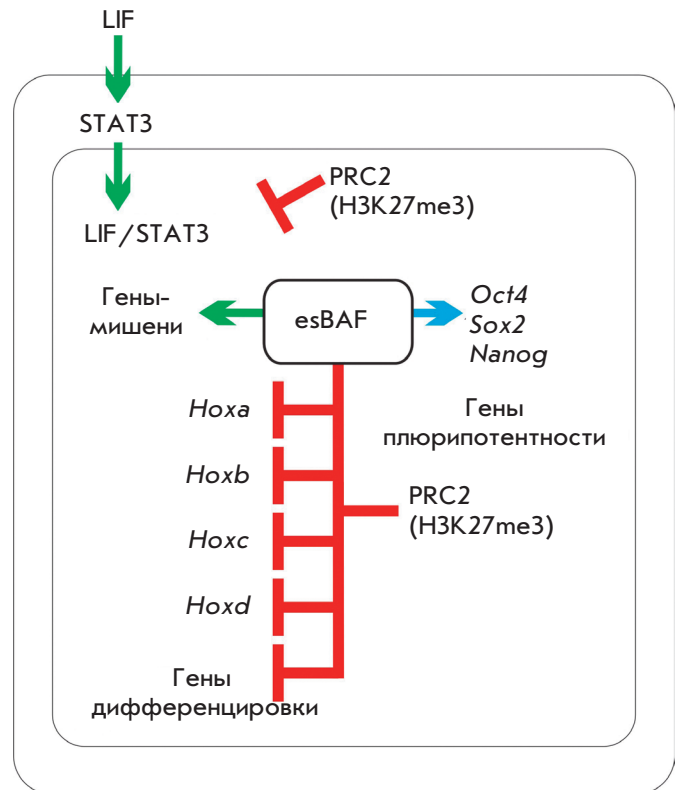


Рис. 3. Схема совместного действия esBAF и PRC2 при поддержании плюрипотентности. esBAF и PRC2 могут действовать как синергично, так и антагонистично. Комплекс esBAF действует антагонистично по отношению к PRC2 при регуляции генов-мишеней сигнального каскада LIF-STAT3, подготавливая структуру хроматина для активации фосфорилированной формой STAT3 (зеленая стрелка). В то же время esBAF действует совместно с PRC2, репрессируя транскрипцию генов семейства HOX (красные линии с тупыми концами). Однако уровень экспрессии генов плюрипотентности может активироваться или репрессироваться esBAF (синяя стрелка) [96]

зависит от хромодоменсодержащих АТФ-азных субъединиц Mi2a и Mi2b. Кроме того, в состав комплекса входят белки, связывающие метилированный цитозин MBD 1, 2 и 3 (Methyl-CpG-binding protein), белки MTA1, 2 и 3 (Metastasis-associated protein), WD40-содержащие белки RbAP46 и RbAP48, а также два белка, содержащих домены типа цинковый палец – r66a и r66b. Показано, что несколько субъединиц комплекса NuRD важны для поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК. Эмбриональные стволовые клетки с делетированным геном, кодирующим MBD3, сохраняют жизнеспособность и экспрессию маркеров плюрипотентности, однако при этом нарушается их способность к дифферен-

цировке как *in vitro*, так и *in vivo* при формировании химерных животных [99]. Однако в одной из более поздних работ было показано, что нокаут *Mbd3* в ЭСК мыши вызывает повышение уровня транскрипции таких маркеров трофобласта, как гены, *Cdx2*, *Eomesodermin* и *Hand1*, и повышение уровня ацетилирования гистона H3 в промоторных областях этих генов. Более того, нокаутные клетки, культивируемые в среде для трофобластных стволовых клеток, дифференцировались в клетки трофобласта, экспрессирующие CDX2 и CADHERIN 3 [100]. В опытах *in vivo* показано, что MBD3 необходим для развития эпибласта из клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) после имплантации. В эмбрионах с дефицитом MBD3 гены плюрипотентности *Oct4*, *Nanog* и *Sox2* и их гены-мишени экспрессируются на нормальном уровне, однако отмечается нарушение нормального сайленсинга их транскрипции после имплантации. Культивируемые ВКМ MBD3-дефицитных эмбрионов, напротив, практически неспособны формировать линии плюрипотентных ЭСК, хотя формируют значительное количество энтодермальных производных [101].

В ЭСК мыши существует специфическое подсемейство комплексов NuRD, названное NODE (NANOG and OCT4 associated Deacetylase). В состав комплекса NODE входят гистон-деацетилазы HDAC1 и HDAC2, а также белки MTA1 и 2, однако этот комплекс практически не содержит (выявляются в субстехиометрических количествах) субъединицы MBD3 и RBBP7. NODE интересен тем, что в ЭСК мыши он физически взаимодействует с транскрипционными факторами OCT4 и NANOG [35]. Комплекс NODE обладает деацетилазной активностью, которая не зависит от MBD3. Нокаут генов, кодирующих субъединицы NODE, вызывает повышение экспрессии генов, ответственных за дифференцировку и, как следствие, приводит к дифференцировке ЭСК в различные клеточные производные. В опытах по подавлению трансляции показано, что, в отличие от MBD3, необходимого для подавления транскрипции генов, поддерживающих недифференцированное состояние клетки, MTA1 вовлечен в подавление генов дифференцировки, например, таких, как *Gata6* и *FoxA2* [35]. Таким образом, в ЭСК представлены как минимум два подсемейства комплексов NuRD, действующих разнонаправленно: MBD3-содержащие комплексы, регулирующие (подавляющие) транскрипцию генов плюрипотентности (*Oct4*, *Nanog* и *Sox2*, и др.) и необходимые для дифференцировки ЭСК в различные клеточные производные, для дифференцировки клеток в раннем эмбриональном развитии, а также HDAC1, HDAC2 и MTA1-содержащие комплексы, взаимодействующие с белками OCT4 и NANOG

и участвующие в активации транскрипции генов, отвечающих за поддержание недифференцированного состояния клеток.

Недавно установили, что MBD3-содержащий комплекс NuRD необходим для модификации H3K27me3 комплексом PRC2 в пределах промоторов генов, вовлеченных в процессы развития и дифференцировки. Таким образом, NuRD не просто выполняет функцию репрессора транскрипции генов, но и отвечает за установление баланса между ацетилированием и метилированием H3K27 в эмбриональных стволовых клетках [102]. Однако это не единственный пример взаимодействия хроматинре моделирующих комплексов в ЭСК. Комплекс NuRD, а именно его субъединица MBD3, тесно взаимодействует с esBAF (BRG1) в ЭСК мыши [103]. Субъединицы MBD3 и BRG1 солокализуются в пределах точек старта транскрипции и разнонаправленно регулируют транскрипцию обширного набора генов. Более того, MBD3 и BRG1 играют важную роль в регуляции транскрипции через гидроксиметилирование остатков цитозина. Субъединица MBD3 локализуется вместе с белком TET1 и 5-гидроксиметилцитозинами (5hmC) *in vivo*, при этом связывание MBD3 с промоторами зависит от TET1. Эксперименты, проведенные *in vitro*, показали, что MBD3 эффективнее связывается с 5-гидроксиметилцитозинами, чем с 5-метилцитозинами, при этом нокаут гена *Mbd3* влияет преимущественно на транскрипцию генов, маркированных 5hmC, а MBD3 и BRG1 необходимы для поддержания уровня 5-гидроксиметилирования [103].

Ранее считалось, что 5-гидроксиметилирование ДНК – это всего лишь промежуточное состояние в процессе деметилирования 5-метилцитозина [104]. Однако оказалось, что нокаут генов из семейства *Tet*, которые кодируют белки, осуществляющие гидроксирование 5-метилцитозина, вызывает нарушение дифференцировки (*Tet1*, *Tet2*) и самообновления (*Tet1*) ЭСК [105–107]. Кроме того, состояние 5-гидроксиметилирования ДНК может занимать продолжительное время в процессе раннего эмбрионального развития и, возможно, выполнять регуляторные функции [108, 109]. Все представленные факты говорят о том, что 5-гидроксиметилирование может быть самостоятельным регуляторным состоянием эпигенома, а комплексы NuRD и esBAF играют важнейшую роль в реализации его регуляторного потенциала. В то же время само 5-гидроксиметилирование ДНК непосредственно влияет на совместное регуляторное действие NuRD и esBAF.

КОМПЛЕКС Tip60-p400

Комплекс Tip60-p400 обладает гистон-ацетилазной, а также ремоделирующей актив-

ностью, он может действовать и как активатор, и как репрессор транскрипции [110, 111]. Кроме того, Tір60-р400 участвует в замене форм гистонов H2AZ-H2B [112, 113]. Эмбрионы с нокаутом генов *Tір60* и *Trrap*, кодирующих субъединицы Tір60-р400, гибнут на предимплантационной стадии [114, 115]. Подавление трансляции нескольких субъединиц Tір60-р400 в ЭСК при помощи РНК-интерференции показало, что комплекс Tір60-р400 важен для нормального самообновления и дифференцировки клеток. Эксперименты по иммунопреципитации хроматина показали, что р400 солокализуется с белком NANOG и H3K4me3, меткой активного хроматина, в недифференцированных ЭСК мыши. Спектры генов-мишеней NANOG и Tір60-р400 в значительной степени перекрываются. Более того, NANOG и H3K4me3 необходимы для связывания Tір60-р400 с генами-мишенями. Tір60-р400, в свою очередь, осуществляет ацетилирование гистона H4 [89].

ПРЯМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ, КОТОРЫЕ МОДУЛИРУЮТ СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА, ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ, ВОВЛЕЧЕННЫМИ В ОСНОВНЫЕ СИСТЕМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Помимо взаимодействия с белковыми комплексами, транскрипционные факторы, входящие в систему поддержания плюрипотентности, могут прямо регулировать гены хроматинмодифицирующих ферментов. В ЭСК фактор транскрипции OCT4 активирует гены деметилаз JMJD1A/KDM2A и JMJD2C/KDM4B, которые деметилируют H3K9me2 и H3K9me3 соответственно, а KDM2A и KDM4B, в свою очередь, осуществляют деметилирование промоторной области генов *Tcl1* и *Nanog* соответственно [116].

Транскрипционные факторы, регулирующие плюрипотентность, взаимодействуют с промоторами генов, продукты которых участвуют в глобальной регуляции структуры хроматина. Например, такие факторы, как OCT4, SOX2, NANOG, SMAD1, ZFX и E2F1, связаны с промотором гена *Chd1* [117]. Этот ген кодирует фермент, участвующий в ремоделировании хроматина. При помощи двух хромодоменов CHD1 связывается с гистонами H3, ди- и триметилированным в положении K4, который служит меткой активного хроматина и транскрибируемых генов [118]. Подавление экспрессии *Chd1* в ЭСК мыши не влияет на самообновление ЭСК, но смещает их дифференцировку в нейрональное направление [119].

В формировании глобальной структуры хроматина может принимать участие фактор UTF1 (Undifferentiated embryonic cell Transcription Factor 1), который транскрибируется на высоком уровне в не-

дифференцированных ЭСК мыши. Этот белок связан с хроматином, он локализуется в регуляторных областях более 1700 генов, значительная часть из которых перекрывается с ранее идентифицированными генами-мишенями транскрипционных факторов NANOG, OCT4, KLF4, C-MYC и REX1. Снижение синтеза UTF1 приводит к повышению уровня экспрессии большинства регулируемых им генов и нарушению дифференцировки ЭСК. Это говорит о том, что UTF1 в основном является репрессором транскрипции генов, вовлеченных в дифференцировку клеток [120]. Ранее показали, что энхансерный элемент, расположенный в 3'-нетранслируемой области гена *Utf1*, селективно связывается с транскрипционными факторами OCT4 и SOX2 [121].

Таким образом, в ЭСК обнаружены такие регуляторы структуры хроматина, как CHD1 и UTF1, экспрессия генов которых прямо регулируется транскрипционными факторами, которые входят в основную внутреннюю систему поддержания плюрипотентности клеток.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Метилирование ДНК, наряду с ковалентными модификациями гистонов, является основным механизмом регуляции клеточных процессов у млекопитающих [122]. На сегодняшний день известно, что метилирование ДНК участвует в таких фундаментальных явлениях и процессах, как эмбриогенез, дифференцировка клеток, геномный импринтинг, канцерогенез, регуляция транскрипции мобильных элементов генома, инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих [123–128].

Безусловно, метилирование ДНК играет важнейшую роль в регуляции самообновления и плюрипотентности клеток [129]. Промоторы основных генов, связанных с поддержанием плюрипотентности и самообновлением ЭСК (*Oct4* и *Nanog*), гипометилированы в недифференцированных клетках и гиперметилированы в стволовых и соматических клетках трофобласта [130, 131]. При дифференцировке клеток в культуре или во время эмбрионального развития промоторы генов, поддерживающих самообновление, подвергаются метилированию, в котором участвуют ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B [132]. Нокаут генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, вызывает нарушение эмбрионального развития и дифференцировки ЭСК *in vitro* [132–135]. Однако ЭСК мыши с одновременным нокаутом генов *Dnmt1*, *Dnmt3a* и *Dnmt3b* сохраняют способность к самообновлению [136]. Метилирование ДНК, осуществляемое DNMT3A и DNMT3B, участвует в надежной репрессии генов плюрипотентности в эмбриональном

развитии. Показано, что гистон-метилтрансфераза G9a, устанавливающая модификацию H3K9me3 в районе промотора гена *Oct4*, привлекает в данную область гетерохроматиновый белок HP1 и ДНК-метилтрансферазы [137].

В геномах млекопитающих метилированию подвергаются остатки цитозина в составе CpG-динуклеотидов [138]. В плюрипотентных клетках снижен уровень метилирования CpG-богатых промоторов (содержащих так называемые CpG-островки), часто ассоциированных с генами «домашнего хозяйства», и повышен уровень метилирования промоторов с низким уровнем CpG [129, 139]. Большинство таких «обедненных» промоторов содержат метку активного хроматина – H3K4me3. По всей видимости, установление H3K4me3 осуществляется в результате связывания неметилированных CpG-островков с белком CPF1, ассоциированным с гистон-метилтрансферазой SETD1 [140]. Метилирование H3K4, в свою очередь, может «защищать» промоторы генов от действия ДНК-метилтрансфераз [141].

За последние годы показано, что в геномах ЭСК и ИПСК значительная часть (до 25% в ЭСК человека) метилированных остатков цитозина находится вне CpG [142–144], причем не-CpG-метилирование наблюдается в основном в экзонах, а не в регуляторных областях генов [143, 144]. Паттерн распределения не-CpG-метилирования в различных линиях плюрипотентных клеток очень вариателен, а в некоторых дифференцированных клетках он практически отсутствует. Кроме того, нокаут генов *DNMT3A* и *DNMT3B* в ЭСК человека резко снижает уровень не-CpG-метилирования [145].

Многие экспериментальные данные говорят о том, что репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию (получение ИПСК) сопровождается глобальным изменением метилома в сторону состояния, характерного для плюрипотентных клеток [144, 146, 147]. Деметилированию подвергаются промоторы генов, участвующих в поддержании самообновления, например генов *Oct4* и *Nanog* [11, 12, 148]. В репрограммировании могут участвовать такие ДНК-деметилазы, как TET1 и AID. Деметилаза TET1, катализирующая превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, важна для поддержания самообновления ЭСК мыши, она регулирует метилирование ДНК в промоторе гена *Nanog* [106]. Кроме того, на модели репрограммирования с использованием гибридных клеток между ЭСК мыши и фибробластами человека показано, что деметилаза AID необходима для деметилирования промоторов генов *OCT4* и *NANOG* человека [149]. Важность деметилирования для осуществления репрограммирования клеток подтверждается еще и тем, что применение

ингибиторов ДНК-метилтрансфераз позволяет повысить эффективность получения ИПСК [146, 150].

ФАКТОРЫ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ

Инактивация X-хромосомы – сложный процесс, события которого происходят в раннем эмбриогенезе млекопитающих. У мыши уже во время первых делений дробления зиготы происходит импринтированная инактивация X-хромосомы, унаследованной от самца. При формировании бластоцисты X-хромосома реактивируется в клетках внутренней клеточной массы. Во время гастрюляции и дифференцировки клеток ВКМ происходит случайная инактивация одной из двух хромосом [151–153]. Процесс инактивации контролируется определенным локусом, расположенным на X-хромосоме, названным центром инактивации [154]. В данный локус входят несколько генов, однако основными регуляторами считают гены *Xist* и *Tsix*, которые транскрибируются антипараллельно и кодируют нетранслируемые ядерные РНК [155, 156]. Показано, что РНК *Xist* транскрибируется моноаллельно с неактивной X-хромосомы, покрывает неактивную хромосому и способствует появлению модификаций, соответствующих неактивному хроматину [155]. Ген *Tsix*, напротив, является негативным регулятором гена *Xist*, он транскрибируется с активной хромосомы [157]. Так как события инактивации происходят в раннем эмбриогенезе, изучение их динамики и молекулярных основ представляет сложную задачу, практически невыполнимую в случае такого объекта, как человек. Вследствие этого, в настоящее время наиболее подходящими и часто используемыми моделями для изучения инактивации X-хромосомы стали линии плюрипотентных клеток, которые получают из предимплантационных эмбрионов (эмбриональные стволовые клетки, ЭСК) или в результате репрограммирования соматических клеток (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК) мыши и человека. Однако изучение статуса X-хромосомы и молекулярно-генетические исследования регуляции процесса X-инактивации выявили ряд различий между мышью и человеком.

Эмбриональные стволовые клетки самок мыши, получаемые из предимплантационных бластоцист (3.5 дня после оплодотворения), сохраняют многие свойства клеток ВКМ, в частности, они способны поддерживать в ряду митотических делений обе активные X-хромосомы [152]. При дифференцировке ЭСК мыши происходит случайная инактивация одной из двух хромосом. Это свойство ЭСК мыши воспроизводимо и стабильно [152, 153].

В случае ЭСК человека, которые тоже получают из бластоцист (5–9 дней после оплодотворения), дело

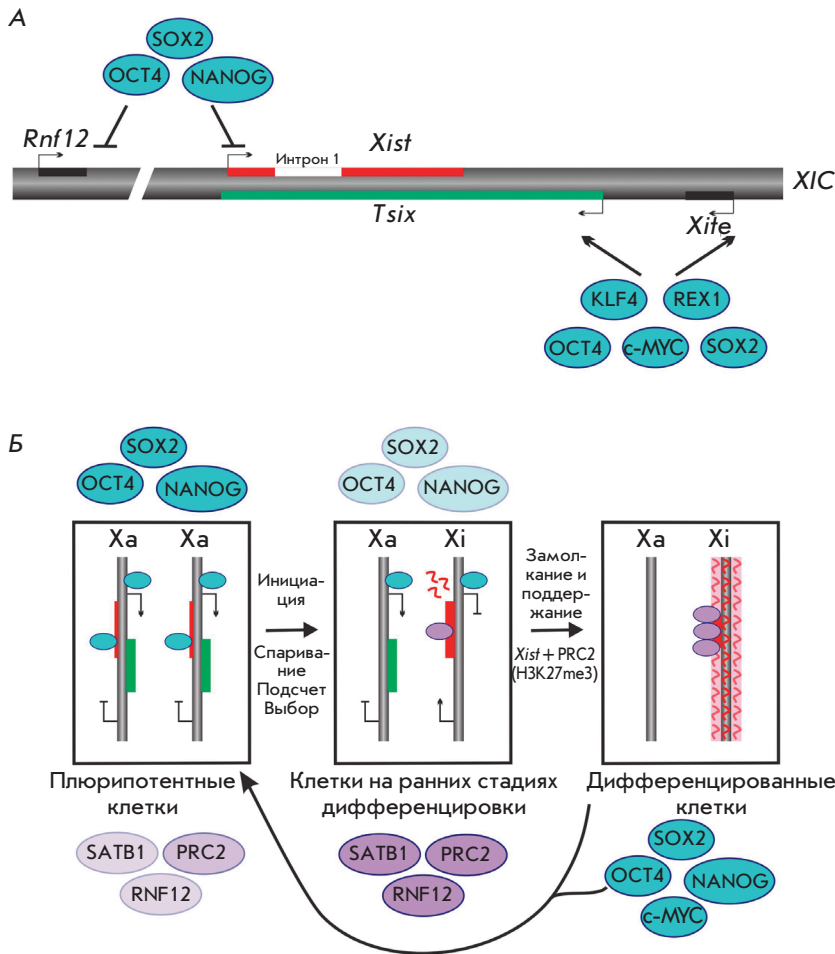


Рис. 4. Транскрипционные факторы плюрипотентности в регуляции процесса инактивации X-хромосомы (*Xic*). **А** – Схема центра инактивации X-хромосомы мыши. Красным выделен ген *Xist*, зеленым – *Tsix*, черным – активаторы данных генов – *Rnf12* и *Xite* соответственно. В недифференцированных ЭСК самок мыши транскрипционные факторы *OCT4*, *SOX2* и *NANOG* связываются с первым интроном *Xist* и *Rnf12*, подавляя их транскрипцию. В то же время белки *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *REX1* и *c-MYC* связываются с регуляторными областями *Tsix* и *Xite*, активируя их транскрипцию. **Б** – В ЭСК самок мыши происходит активация гена *Tsix* и подавление *Xist* белками, участвующими в поддержании плюрипотентности. Во время дифференцировки происходит инактивация одной из X-хромосом. Инактивация – многостадийный процесс, включающий инициацию инактивации, установление и поддержание транскрипционного сайленсинга. Инициация инактивации связана со снижением экспрессии факторов плюрипотентности и включением в процесс инактивации регуляторов структуры хроматина, например *SATB1* и *PRC2*. Сверхэкспрессия таких факторов, как *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *c-MYC*, в соматических клетках вызывает репрограммирование к плюрипотентному состоянию, которое сопровождается реактивацией неактивной X-хромосомы [166]

обстоит несколько сложнее [4]. Масштабный анализ множества линий ЭСК человека показал, что их можно разделить на три класса [158]. К первому классу относятся ЭСК с двумя активными X-хромосомами, которые подвергаются случайной инактивации в процессе дифференцировки, данный класс соответствует ЭСК мыши. Во второй класс входят линии ЭСК, в которых неактивной является одна из хромосом, и транскрибируется ген *XIST*, при этом клетки сохраняют все признаки плюрипотентности. К третьему классу относятся линии, в которых неактивна одна из X-хромосом, однако ген *XIST* не транскрибируется, даже при дифференцировке клеток. Неактивные X-хромосомы в линиях второго класса несут метки неактивного хроматина, такие, как H3K27me3, H4K20me и вариант гистона macroH2A. Интересно, что линии третьего класса практически лишены меток неактивного хроматина. В то же время молекулярно-генетический анализ выявляет при-

знаки подавления транскрипции большинства генов неактивных хромосом [158].

Отсутствие связи между плюрипотентностью и эпигенетическим статусом X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека показано и на примере ИПСК. ИПСК мыши, как и ЭСК, имеют две активные X-хромосомы (в клетках, полученных от самок), одна из которых подвергается случайной инактивации при запуске дифференцировки [159]. Однако у человека ИПСК могут иметь все характерные черты плюрипотентных клеток и содержать при этом одну неактивную X-хромосому, т.е. соответствовать второму классу ЭСК [160]. Статус X-хромосом может меняться в процессе репрограммирования, в результате чего возможно появление субклонов, соответствующих первому и третьему классам ЭСК. Отмечено, что реактивация неактивной X-хромосомы может происходить при репрограммировании соматических клеток человека [147]. По всей

видимости, меняя условия культивирования клеток, можно добиться получения клонов ЭСК и ИПСК, несущих активные хромосомы. Например, недавно показали, что культивирование клеток в условиях физиологической концентрации кислорода (5%) может значительно усилить эффективность получения ЭСК человека первого класса. Различные физиологические стрессы могут, напротив, вызывать переход клеток во второй и третий классы, согласно статусу X-хромосом [161]. Кроме того, сверхэкспрессия *KLF4* в присутствии набора ингибиторов сигнальных путей в ЭСК и ИПСК человека также может приводить к реактивации неактивной X-хромосомы [162]. Это говорит о нестабильности статуса X-хромосом в плюрипотентных клетках человека.

Несмотря на то что связь между состоянием плюрипотентности клеток мыши и статусом X-хромосом в эмбриогенезе и культуре достаточно очевидна, до недавнего времени не существовало прямых доказательств связи данных феноменов на молекулярном уровне. Однако выявлена связь между транскрипционными факторами и регуляцией генов *Xist* и *Tsix*. Например, транскрипционные факторы NANOG, OCT4 и SOX2 имеют потенциальные сайты связывания в первом интроне гена *Xist* и связаны с ним в недифференцированных ЭСК мыши [163] (рис. 4). Нокаут генов *Oct4* и *Nanog* вызывает активацию транскрипции *Xist*. Таким образом, факторы плюрипотентности могут подавлять экспрессию гена *Xist* по *Tsix*-независимому механизму [163]. Позже было установлено, что факторы NANOG, OCT4 и SOX2 могут подавлять транскрипцию *Xist*, репрессируя экспрессию его активатора – *Rnf12*. При этом удаление первого *Xist* не вызывает инактивации X-хромосомы [164, 165] (рис. 4).

Факторы, связанные с поддержанием плюрипотентности и репрессии *Xist*, могут участвовать в активации транскрипции гена *Tsix* [167] (рис. 4). Так, связывание факторов OCT4, SOX2 и KLF4 обнаружено в районе энхансера *Xite*, хотя это взаимодействие не подтверждено в других работах [168]. Сайты связывания REX1, c-MYC и KLF4 найдены в регуляторном элементе *DXPas34*. Установлено, что REX1 в большей степени необходим для элонгации РНК *Tsix*, чем для сборки транскрипционного комплекса. Таким образом, все перечисленные выше исследования подтверждают связь системы поддержания плюрипотентности и активного статуса обеих X-хромосом в недифференцированных ЭСК мыши. Подобные закономерности не действуют в ЭСК человека. Трансгены *XIST* человека продолжают быть активными в ЭСК мыши, несмотря на присутствие факторов, поддерживающих плюрипотентность. По всей видимости, в регуляцию генов *XIST* и *TSIX*

человека вовлечены иные механизмы, например метилирование ДНК. В ЭСК мыши промотор *Xist* метилирован лишь частично, даже на активной хромосоме, и транскрипция гена репрессируется, видимо, транскрипционными факторами. В ЭСК человека первого типа промотор *XIST* метилирован практически полностью (на 100%). Кроме этого, различия могут объясняться тем, что ЭСК человека по своим свойствам (паттерн экспрессии генов, чувствительность к сигнальным молекулам) сходны со стволовыми клетками эпибласта мыши, в которых инактивирована одна из X-хромосом, несмотря на экспрессию факторов плюрипотентности [169].

По всей видимости, изучение статуса X-хромосом в ИПСК человека должно войти в стандартный набор тестов вновь получаемых линий, наряду с анализом экспрессии маркеров плюрипотентности, определением паттерна транскрипции генов и дифференцировки. Выбирая клоны клеток с инактивированной отцовской или материнской хромосомой, можно избирательно получать линии с неактивными мутантными аллелями, а следовательно, клетки, которые можно применять в терапии заболеваний, сцепленных с X-хромосомой.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОБЫТИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ КЛЕТОК К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ. «ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ»

Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию сопровождается глобальным изменением их эпигеномов [146, 159, 170]. В настоящее время для повышения эффективности получения ИПСК человека и мыши применяют ряд химических ингибиторов ферментов, вовлеченных в формирование структуры хроматина. В частности, применение ингибитора гистон-метилтрансферазы G9a (VIX-01294), ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (5'-азацитидин, RG108) и гистон-деацетилаз (вальпроевая кислота, TSA, SAHA, бутират натрия) позволяет увеличить эффективность репрограммирования в десятки раз [18, 20, 150, 171–173]. Более того, недавно был выяснен механизм влияния аскорбиновой кислоты (витамина С) на эффективность получения ИПСК [174].

Ранее было известно, что аскорбиновая кислота может существенно повышать (от 3.8 до 8.75%) эффективность репрограммирования фибробластов и стволовых клеток жировой ткани, однако механизм ее действия оставался неизвестным [175]. Оказалось, что основным эффектором аскорбиновой кислоты являются гистон-деметиلاзы JHDM1A и 1B. Аскорбиновая кислота вызывает опосредованное JHDM1A/1B деметилирование гистона H3 в поло-

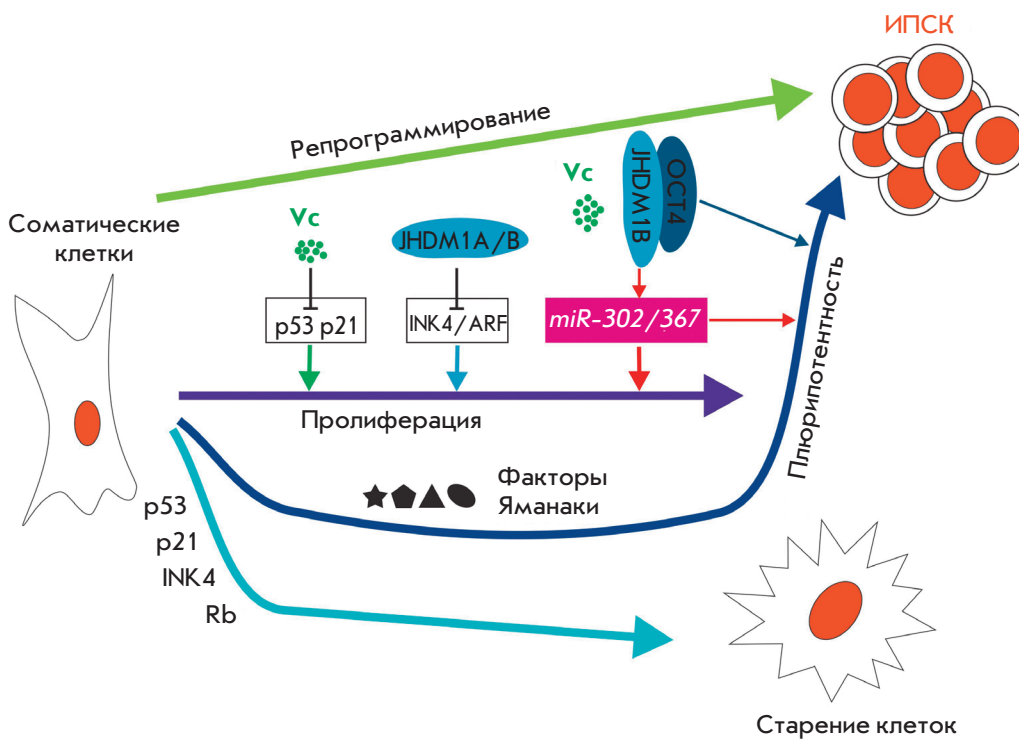


Рис. 5. Схема совместного действия аскорбиновой кислоты (витамина С) и JHDM1A/1B на репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию. Витамин С и JHDM1A/1B противостоят старению клеток путем подавления действия белков p53/p21 и INK4/ARF. Кроме того, аскорбиновая кислота и комплекс JHDM1B с OCT4 активирует экспрессию кластера микроРНК 302/367, что также усиливает эффективность репрограммирования [174]

жени K36 (H3K36me2/3) в культуре эмбриональных фибробластов мыши, а также в процессе репрограммирования (рис. 5). Доказано, что JHDM1A/1B необходимы для репрограммирования, участвуют в ускорении клеточного цикла и подавлении старения клеток путем репрессии локуса *Ink4/Arf* (рис. 5). Известно, что высокий темп деления клеток и подавление механизмов старения и апоптоза необходимы для полного и эффективного репрограммирования соматических клеток [176–180]. Более того, JHDM1A/1B вместе с транскрипционным фактором OCT4 участвуют в активации экспрессии кластера микроРНК 302/367, также вовлеченного в репрограммирование клеток [14, 15, 174] (рис. 5).

Т. Ондер и соавт. [181] провели скрининг набора интерферирующих РНК, направленных на подавление трансляции 22 генов, продукты которых участвуют в метилировании ДНК и гистонов. Оказалось, что подавление трансляции мРНК генов, кодирующих компоненты комплексов PRC1 (BMI1, RING1) и PRC2 (EZH2, EED, SUZ12), существенно снижает эффективность репрограммирования фибробластов человека. Снижение эффективности наблюдалось и при подавлении *EHMT1* и *SETDB1*, кодирующих H3K9 гистон-метилтрансферазы. Среди генов, подавление трансляции мРНК которых, напротив, существенно повышало эффективность репрограммирования, были *YY1*, *SUV39H1* и *DOT1L*. Ген *YY1* кодирует белок, способный, в зависимости от контекста, действо-

вать и как активатор, и как репрессор транскрипции. *SUV39H1* кодирует H3K9 гистон-метилтрансферазу, а *DOT1L* – H3K79 гистон-метилтрансферазу. Основное внимание исследователей было уделено *DOT1L*. Оказалось, что подавление экспрессии *DOT1L* при помощи РНК-интерференции или химическое ингибирование *DOT1L* может заменить функции генов *KLF4* и *c-MYC* в опытах по получению ИПСК из фибробластов человека. Кроме того, ингибирование *DOT1L* на ранних стадиях репрограммирования приводит к активации генов *NANOG* и *LIN28*, которые используются также в случае клеток человека. Анализ распределения H3K79me2 в масштабе всего генома показал, что ассоциированные с эпителиально-мезенхимальным переходом гены, экспрессия которых специфична для фибробластов, теряют данную модификацию гистона на ранних стадиях репрограммирования. Ингибирование *DOT1L* ускоряет «стирание» H3K79me2 в пределах генов, которые подвергаются транскрипционному сайленсингу в ИПСК [181].

Все эти факты говорят о важнейшей роли системы эпигенетических регуляторов в процессе репрограммирования.

При помощи высокопроизводительных методов анализа выявлена высокая степень сходства ИПСК и ЭСК по паттерну экспрессии генов и состоянию эпигеномов как на уровне метилирования ДНК, так и на уровне распределения ковалентных модификаций гистонов H3K27me3 и H3K4me3 [147, 182].

Несмотря на значительное сходство ИПСК и ЭСК на молекулярном уровне, ряд исследований показал, что транскриптомы и эпигеномы отдельных линий ИПСК могут обладать некоторыми характерными особенностями, а также сохранять ряд черт, свойственных исходным соматическим клеткам [183–186]. Эффект сохранения некоторых черт эпигеномов соматических предшественников называют «эпигенетической памятью» [187, 188].

Современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют изучать метилирование ДНК и распределение ковалентных модификаций гистонов в масштабе всего генома с очень большим разрешением. В качестве примера можно привести работу Р. Листера и соавт. [144], в которой применен метод MethilC-Seq. Этот метод позволяет изучать метилирование остатков цитозина на уровне всего генома с разрешением в один нуклеотид. Авторы постарались избежать возможного влияния способа получения ИПСК и типа соматических клеток на получаемые результаты. В этой работе использовали пять линий ИПСК: одну линию, полученную с помощью ретровирусной трансдукции стволовых клеток жировой ткани генами *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *c-MYC*; вторую линию, полученную при помощи лентивирусной трансдукции фибробластов легкого IMR90 генами *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28*; три линии, полученные с использованием неинтегрирующихся эписомных векторов из фибробластов крайней плоти. Кроме того, в исследование были включены две линии ЭСК, а также трофобластные производные ИПСК и ЭСК, дифференцированные с применением BMP4. В результате определили статус метилирования 75.7–94.5% всех остатков цитозина в геномах 11 линий клеток. Интересно, что авторы сфокусировали свое внимание не только на метилировании цитозинов в составе CpG-динуклеотидов, но и на не-CpG-метилировании (CpH, где H = A, C или T). Показано, что в масштабе геномов ИПСК и ЭСК человека имеют сходный паттерн метилирования. Геномы плюрипотентных клеток в среднем более метилированы, чем геномы соматических клеток. Выявлены серьезные отличия на уровне CpH-метилирования ДНК. Соматические клетки, включая стволовые клетки жировой ткани, характеризуются крайне низким уровнем такого типа метилирования, в то время как в ИПСК и ЭСК доля метилированных цитозинов в составе CpH-динуклеотидов ДНК составляет 20–30% от всех метилированных остатков цитозина в геноме. Более того, и в ЭСК, и в ИПСК наблюдается обогащение ДНК экзонов и интронов метилированными CpH.

Интересно, что несмотря на общее сходство метиломов ЭСК и ИПСК, выявлен ряд отличий между ними, в том числе 1175 дифференциально метилиро-

ванных областей (ДМО), длина которых варьирует от 1 до 11 т.п.н., а в совокупности составляет 1.68 млн п.н. Подобных ДМО не выявлено между двумя линиями ЭСК, проанализированными при тех же условиях. Дифференциально метилированные в ЭСК и ИПСК области можно подразделить на две группы. В первую группу входят ДМО, появление которых обусловлено «наследованием» паттерна метилирования от соматических клеток-предшественников ИПСК (44–49% от общего числа обнаруженных). Во вторую группу входят ДМО, паттерн метилирования которых специфичен для ИПСК, т.е. отличается от паттерна ДМО и в соматических клетках, и в ЭСК. Подобные ДМО составляют 51–56% от общего числа обнаруженных. Расположение ДМО варьирует в пяти изученных линиях ИПСК – 62% встречаются в двух из пяти линий, 16% – во всех пяти линиях. Эти районы можно считать «горячими точками» эпигенетического репрограммирования, которые требуют повышенного внимания при получении ИПСК. Значительное число ДМО (80%) ассоциированы с CpG-островками, 62% локализованы вблизи генов или в генах, 29 и 19% находятся в пределах 2 т.п.н. от точек старта или терминации транскрипции соответственно. Биоинформатический анализ функций генов, локализованных рядом с ДМО и встречающихся во всех проанализированных ИПСК, не выявил выраженного преобладания генов, вовлеченных в определенные клеточные процессы. Это говорит о том, что нарушение метилирования, происходящее при репрограммировании, может захватывать множество клеточных функций. Еще одна важная закономерность – преобладание (109 из 130, 92%) гипометилирования в ДМО во всех пяти линиях. По-видимому, нарушения репрограммирования метилома при получении ИПСК могут быть связаны с недостаточным метилированием.

Внимательный анализ и сравнение CpH-метилирования в ЭСК и ИПСК также выявили ДМО. Всего найдено 29 областей, которые характеризуются большой протяженностью (половина из них более 1 млн п.н., самая длинная – 4.8 млн п.н.), общая протяженность CpH-ДМО составляет 32.4 млн п.н. Большая часть CpH-ДМО в ИПСК гипометилирована по сравнению с ЭСК, они локализованы около центромер и теломер. Эти области обогащены гистонами H3, триметилированным по остатку лизина в положении 9 (H3K9me3), и солокализованы с гиперметилированными CpG-ДМО. Большая часть генов, локализованных в этих областях, характеризуется повышенным уровнем метилирования промоторных областей и, как следствие, сниженным уровнем транскрипции. Интересно, что в этих районах снижен уровень метки неактивного хроматина – H3K27me3. Таким образом, в ИПСК человека выявлены протяженные области,

ассоциированные с прицентромерными и прителомерными районами, в которых наблюдается аберрантное распределение модификаций гистонов, нарушен паттерн CpG- и CpH-метилирования, а также уровень транскрипции генов. Безусловно, подобные «горячие точки» эпигеномов должны подвергаться тщательному изучению при получении новых линий ИПСК человека [144].

Изучение CpG-метилирования в 22 линиях ИПСК человека, полученных из различных соматических клеток (клетки эндометрия, эпителия пупочной вены, клетки амниона, фетальные фибробласты легкого, клетки менструальной крови), также выявило отличия от ЭСК [186]. При сравнении всех линий ИПСК и ЭСК с использованием ДНК-микрочипа, содержащего пробы на 24273 CpG-сайтах в пределах 13728 генов, обнаружили 1459 дифференциально метилированных CpG-сайтов, соответствующих 1260 генам. Однако число и распределение данных сайтов значительно варьировали в различных линиях ИПСК. Вероятно, это связано с тем, что линии были получены из соматических клеток различного типа. Более чем в 15 линиях из 22 общими были только 20 сайтов. Интересно, что число подобных сайтов было повышено в ИПСК с набором половых хромосом XX. Сравнение этих данных с результатами Р. Листера и соавт. [144] выявило 72 промотора, дифференциально метилированных в обеих работах. Однако согласно [186] большинство ДМО в ИПСК гиперметилированы по сравнению с ЭСК, и постулируется тезис о том, что геном ИПСК более метилирован. В работе Р. Листера, напротив, отмечен недостаток метилирования CpG-динуклеотидов в ИПСК. Однако подобные различия вполне можно объяснить особенностями использованных экспериментальных подходов. В частности, в работе К. Нишино [186] анализировали CpG, расположенные в основном в пределах CpG-островков в промоторных областях генов, тогда как Р. Листер и соавт. определяли метилирование большинства остатков цитозина во всем геноме. Кроме того, ясно показано [186], что уровень аберрантного гиперметилирования на более поздних пассажах (30–40) значительно ниже, чем на ранних (4–6), тогда как Р. Листер и соавт. [144] использовали линии ИПСК, прошедшие десятки пассажей.

В ранних работах по получению ИПСК мыши и человека подчеркивалось удивительное сходство транскриптомов и эпигеномов этих клеток с транскриптомами и эпигеномами ЭСК. Кроме того, было показано, что на уровне всего генома происходит максимально полное изменение паттерна транскрипции генов соматических клеток. Однако позже установили, что ИПСК сохраняют некоторые, чаще очень малые, признаки соматических транскриптомов и эпи-

геномов [187, 188]. Неполное репрограммирование отдельных локусов, несмотря на его кажущуюся незначительность, может существенно влиять на свойства плюрипотентных клеток, меняя их способность к дифференцировке. Например, выявлено большое сходство ЭСК и ИПСК мыши на уровне транскрипции мРНК и микроРНК, за исключением нескольких транскриптов [189]. В частности, в некоторых клонах ИПСК наблюдался аберрантный сайленсинг импринтированного локуса *Dlk1-Dio3*, в том числе и в ИПСК, полученных из гемопоэтических клеток-предшественников, которые также характеризуются низким уровнем транскрипции данного локуса. Предполагается, что подобный эффект обусловлен «эпигенетической памятью». Нарушение транскрипции в локусе *Dlk1-Dio3* приводит к тому, что ИПСК неэффективно образуют химеры и не способны формировать организм мыши при тетраплоидной комплементации. Интересно, что обработка вальпроевой кислотой, ингибитором деацетилаз гистонов, приводит к активации транскрипции в локусе *Dlk1-Dio3* и восстановлению способности ИПСК к тетраплоидной комплементации и эффективному образованию химерных животных [189].

Исследованию влияния происхождения ИПСК на характер их дифференцировки посвящен ряд интересных работ [185, 186, 189, 190]. Например, было проведено сравнение свойств ИПСК, полученных из гемопоэтических и нейрональных предшественников, а также из фибробластов мыши, со свойствами ЭСК. Эмбриональные стволовые клетки имели разное происхождение: из бластоцист, полученных в результате переноса ядер из соматических клеток, и из бластоцист, полученных в результате естественного оплодотворения. Оказалось, что, во-первых, на эффективность и качество репрограммирования очень сильно влияет тип соматических клеток. ИПСК, полученные из гемопоэтических клеток, по молекулярно-генетическим характеристикам были более близки к ЭСК, тогда как ИПСК из фибробластов давали исключительно частично репрограммированные клоны. Наиболее близкими к ЭСК оказались ИПСК из нейрональных предшественников. Во-вторых, анализ метилирования ДНК выявил различия между ИПСК и плюрипотентными клетками, полученными из эмбрионов. Как и в более ранних работах обнаружено, что ИПСК и плюрипотентные клетки, полученные из эмбрионов, различались множеством ДМО. ИПСК, полученные из нейрональных предшественников и фибробластов, характеризуются остаточным метилированием локусов, ответственных за формирование гемопоэтической линии, что сказывается на сниженном уровне дифференцировки этих ИПСК в соответствующем направлении.

В-третьих, могут быть сняты ограничения направлений дифференцировки ИПСК, имеющих то или иное происхождение. Например, если ИПСК, полученные из нейрональных предшественников, дифференцировать в клетки гемопоэтического ряда, а затем получить из этих производных вторичные ИПСК, эти вторичные ИПСК будут иметь более высокий потенциал к дифференцировке в клетки крови. Кроме того, воздействие на эпигеном такими ингибиторами деацетилаз гистонов и метилирования ДНК, как трихостатин А и 5-азациитидин, может существенно снизить влияние происхождения клеток на их дифференцировку [187]. Следует отметить, что в данной работе [187] использовали ИПСК, взятые на очень ранних пассажах. Аберрантное метилирование остатков цитозина на ранних пассажах и, как следствие, нарушение паттерна экспрессии генов и дифференцировки ИПСК обнаружено и в других исследованиях. Например, показано, что ИПСК мыши, полученные из фибробластов, В-лимфоцитов, гранулоцитов костного мозга и клеток-предшественников скелетных мышц, обладают «эпигенетической памятью», что проявляется на уровне транскрипции и вызывает дифференцировку клеток преимущественно в клетки тех типов, из которых они были получены [190]. Обнаружено, что гены, являющиеся маркерами того или иного типа соматических клеток, могут продолжать экспрессироваться на высоком уровне в плюрипотентных клетках, при этом в их промоторных областях снижено содержание метки неактивного хроматина – H3K27me3, и повышен уровень меток активного хроматина – H3Ac и H3K4me3. При этом не найдено различий в метилировании промоторов этих генов [190]. Важно, что подобные нарушения транскрипции и сдвиги в дифференцировке клеток исчезают при продолжительном пассировании клонов ИПСК. Эти данные, а также результаты других работ говорят о том, что репрограммирование – процесс постепенный, становление полностью репрограммирован-

ного состояния эпигенома и клеток в целом требует множества раундов репликации генома.

Кроме рассмотренных работ, касающихся нарушений репрограммирования эпигеномов и «эпигенетической памяти» в ИПСК мыши, уже появилось несколько публикаций, подтверждающих наличие сходного феномена при репрограммировании клеток человека. Например, показано, что дифференцировка ИПСК, полученных из нейрональных предшественников, β-клеток поджелудочной железы и пигментного эпителия сетчатки глаза человека, может носить неслучайный характер, т.е. направление дифференцировки сильно сдвинуто в сторону предкового типа соматических клеток [188, 191, 192]. В ИПСК из клеток пуповинной крови и кератиноцитов новорожденного также выявлены аберрантно метилированные районы, а также установлено существование «эпигенетической памяти», что выражается в преимущественной дифференцировке в клетки родительского типа и сохраняется даже в ряду многих пассажей [193].

Таким образом, на сегодняшний день проблема «эпигенетической памяти» остается одной из основных в области получения и применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Решение этой проблемы крайне актуально, особенно в свете применения ИПСК в регенеративной медицине, а также в качестве моделей заболеваний человека. Решение этой проблемы не только позволит полноценно использовать ИПСК человека и животных в биомедицине, оно способно дать новые фундаментальные знания об устройстве и функционировании эпигеномов клеток в культуре и эмбриональном развитии организмов. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 11-04-00847-а и 12-04-00208-а),
а также Программой РАН «Молекулярная
и клеточная биология».*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boiani M., Scholer H.R. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. № 11. P. 872–884.
- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Cohen D.E., Melton D. // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 4. P. 243–252.
- Grskovic M., Javaherian A., Strulovici B., Daley G.Q. // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. V. 10. № 12. P. 915–929.
- Tiscornia G., Vivas E.L., Belmonte J.C. // Nat. Med. 2011. V. 17. № 12. P. 1570–1576.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., et al. // Cell. 2005. V. 122. № 6. P. 947–956.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. № 4. P. 431–440.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart

- R., et al. // *Science*. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
13. Maherali N., Hochedlinger K. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 6. P. 595–605.
14. Anokye-Danso F., Trivedi C.M., Juhr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., Yang W., Gruber P.J., Epstein J.A., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 4. P. 376–388.
15. Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D.L., Kano Y., Nishikawa S., Tanemura M., Mimori K., Tanaka F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 6. P. 633–638.
16. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilic J., Pekarik V., Tiscornia G., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1276–1284.
17. Utikal J., Maherali N., Kulalert W., Hochedlinger K. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. Pt 19. P. 3502–3510.
18. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1269–1275.
19. Loh Y.H., Hartung O., Li H., Guo C., Sahalie J.M., Manos P.D., Urbach A., Heffner G.C., Grskovic M., Vigneault F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 1. P. 15–19.
20. Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Dementyeva E.V., Shilov A.A., Pokushalov E.A., Zaidman A.M., Aleksandrova M.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Stem. Cells Dev.* 2011. V. 20. № 6. P. 1099–1112.
21. Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. // *Curr. Biol.* 2008. V. 18. № 12. P. 890–894.
22. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creighton M.P., Steine E.J., Cassidy J.P., Foreman R., et al. // *Cell*. 2008. V. 133. № 2. P. 250–264.
23. Maherali N., Ahfeldt T., Rigamonti A., Utikal J., Cowan C., Hochedlinger K. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 3. P. 340–345.
24. Yamanaka S. // *Cell*. 2009. V. 137. № 1. P. 13–17.
25. Boland M.J., Hazen J.L., Nazor K.L., Rodriguez A.R., Gifford W., Martin G., Kupriyanov S., Baldwin K.K. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 91–94.
26. Kang L., Wang J., Zhang Y., Kou Z., Gao S. // *Cell Stem. Cell*. 2009. V. 5. № 2. P. 135–138.
27. Zhao X.Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C.L., Ma Q.W., Wang L., et al. // *Nature*. 2009. V. 461. № 7260. P. 86–90.
28. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 315–326.
29. Azuara V., Perry P., Sauer S., Spivakov M., Jorgensen H.F., John R.M., Gouti M., Casanova M., Warnes G., Merckenschlager M., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 5. P. 532–538.
30. Pan G., Tian S., Nie J., Yang C., Ruotti V., Wei H., Jonsdottir G.A., Stewart R., Thomson J.A. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 3. P. 299–312.
31. Zhao X.D., Han X., Chew J.L., Liu J., Chiu K.P., Choo A., Orlov Y.L., Sung W.K., Shahab A., Kuznetsov V.A., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 3. P. 286–298.
32. Creighton M.P., Markoulaki S., Levine S.S., Hanna J., Lodato M.A., Sha K., Young R.A., Jaenisch R., Boyer L.A. // *Cell*. 2008. V. 135. № 4. P. 649–661.
33. Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., Brockman W., Kim T.K., Koche R.P., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7153. P. 553–560.
34. Mohn F., Weber M., Rebhan M., Roloff T.C., Richter J., Stadler M.B., Bibel M., Schubeler D. // *Mol. Cell*. 2008. V. 30. № 6. P. 755–766.
35. Liang J., Wan M., Zhang Y., Gu P., Xin H., Jung S.Y., Qin J., Wong J., Cooney A.J., Liu D., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2008. V. 10. № 6. P. 731–739.
36. Pardo M., Lang B., Yu L., Prosser H., Bradley A., Babu M.M., Choudhary J. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 4. P. 382–395.
37. Wang J., Rao S., Chu J., Shen X., Levasseur D.N., Theunissen T.W., Orkin S.H. // *Nature*. 2006. V. 444. № 7117. P. 364–368.
38. van den Berg D.L., Snoek T., Mullin N.P., Yates A., Bezstarosti K., Demmers J., Chambers I., Poot R.A. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 4. P. 369–381.
39. Ringrose L. // *Bioessays*. 2006. V. 28. № 4. P. 330–334.
40. Ringrose L. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 3. P. 290–297.
41. Hauenschild A., Ringrose L., Altmutter C., Paro R., Rehmsmeier M. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 10. P. e261.
42. de Napoles M., Mermoud J.E., Wakao R., Tang Y.A., Endoh M., Appanah R., Nesterova T.B., Silva J., Otte A.P., Vidal M., et al. // *Dev. Cell*. 2004. V. 7. № 5. P. 663–676.
43. Wang H., Wang L., Erdjument-Bromage H., Vidal M., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. // *Nature*. 2004. V. 431. № 7010. P. 873–878.
44. Elderkin S., Maertens G.N., Endoh M., Mallery D.L., Morrice N., Koseki H., Peters G., Brockdorff N., Hiom K. // *Mol. Cell*. 2007. V. 28. № 1. P. 107–120.
45. Voncken J.W., Roelen B.A., Roefs M., de Vries S., Verhoeven E., Marino S., Deschamps J., van Lohuizen M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 5. P. 2468–2473.
46. Lessard J., Sauvageau G. // *Nature*. 2003. V. 423. № 6937. P. 255–260.
47. Park I.K., Qian D., Kiel M., Becker M.W., Pihalja M., Weissman I.L., Morrison S.J., Clarke M.F. // *Nature*. 2003. V. 423. № 6937. P. 302–305.
48. Dovey J.S., Zacharek S.J., Kim C.F., Lees J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 33. P. 11857–11862.
49. Molofsky A.V., Pardal R., Iwashita T., Park I.K., Clarke M.F., Morrison S.J. // *Nature*. 2003. V. 425. № 6961. P. 962–967.
50. Liu J., Cao L., Chen J., Song S., Lee I.H., Quijano C., Liu H., Keyvanfar K., Chen H., Cao L.Y., et al. // *Nature*. 2009. V. 459. № 7245. P. 387–392.
51. Endoh M., Endo T.A., Endoh T., Fujimura Y., Ohara O., Toyoda T., Otte A.P., Okano M., Brockdorff N., Vidal M., et al. // *Development*. 2008. V. 135. № 8. P. 1513–1524.
52. Morey L., Pascual G., Cozzuto L., Roma G., Wutz A., Benitah S.A., Di Croce L. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 47–62.
53. O'Loughlin A., Munoz-Cabello A.M., Gaspar-Maia A., Wu H.A., Banito A., Kunowska N., Racek T., Pemberton H.N., Beolchi P., Laval F., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 33–46.
54. Morey L., Helin K. // *Trends Biochem. Sci.* 2010. V. 35. № 6. P. 323–332.
55. Camahort R., Cowan C.A. // *Cell Stem. Cell*. 2012. V. 10. № 1. P. 4–6.
56. Pasini D., Bracken A.P., Hansen J.B., Capillo M., Helin K. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 10. P. 3769–3779.
57. Shumacher A., Faust C., Magnuson T. // *Nature*. 1996. V. 383. № 6597. P. 250–253.
58. Faust C., Schumacher A., Holdener B., Magnuson T. // *Development*. 1995. V. 121. № 2. P. 273–285.
59. Chamberlain S.J., Yee D., Magnuson T. // *Stem. Cells*. 2008. V. 26. № 6. P. 1496–1505.
60. Shen X., Liu Y., Hsu Y.J., Fujiwara Y., Kim J., Mao X., Yuan G.C., Orkin S.H. // *Mol. Cell*. 2008. V. 32. № 4. P. 491–502.
61. Peng J.C., Valouev A., Swigut T., Zhang J., Zhao Y., Sidow A., Wysocka J. // *Cell*. 2009. V. 139. № 7. P. 1290–1302.
62. Shen X., Kim W., Fujiwara Y., Simon M.D., Liu Y., Mysliwiec M.R., Yuan G.C., Lee Y., Orkin S.H. // *Cell*. 2009. V. 139. № 7. P. 1303–1314.
63. Pasini D., Cloos P.A., Walfridsson J., Olsson L., Bukowski J.P., Johansen J.V., Bak M., Tommerup N., Rappsilber J., Helin K. //

- Nature. 2010. V. 464. № 7286. P. 306–310.
64. Zhang Z., Jones A., Sun C.W., Li C., Chang C.W., Joo H.Y., Dai Q., Mysliwiec M.R., Wu L.C., Guo Y., et al. // *Stem. Cells*. 2011. V. 29. № 2. P. 229–240.
65. Li G., Margueron R., Ku M., Chambon P., Bernstein B.E., Reinberg D. // *Genes Dev*. 2010. V. 24. № 4. P. 368–380.
66. Landeira D., Sauer S., Poot R., Dvorkina M., Mazzarella L., Jorgensen H.F., Pereira C.F., Leleu M., Piccolo F.M., Spivakov M., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2010. V. 12. № 6. P. 618–624.
67. Zhang Z., Jones A., Sun C.W., Li C., Chang C.W., Joo H.Y., Dai Q., Mysliwiec M.R., Wu L.C., Guo Y., et al. // *Stem. Cells*. 2011. V. 29. № 2. P. 229–240.
68. Landeira D., Fisher A.G. // *Trends Cell Biol*. 2011. V. 21. № 2. P. 74–80.
69. Stock J.K., Giadrossi S., Casanova M., Brookes E., Vidal M., Koseki H., Brockdorff N., Fisher A.G., Pombo A. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. № 12. P. 1428–1435.
70. Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. // *Cell*. 2007. V. 130. № 1. P. 77–88.
71. Boyer L.A., Plath K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L.A., Lee T.I., Levine S.S., Wernig M., Tajonar A., Ray M.K., et al. // *Nature*. 2006. V. 441. № 7091. P. 349–353.
72. Lee T.I., Jenner R.G., Boyer L.A., Guenther M.G., Levine S.S., Kumar R.M., Chevalier B., Johnstone S.E., Cole M.F., Isono K., et al. // *Cell*. 2006. V. 125. № 2. P. 301–313.
73. Ringrose L., Paro R. // *Annu Rev. Genet*. 2004. V. 38. P. 413–443.
74. Ang Y.S., Tsai S.Y., Lee D.F., Monk J., Su J., Ratnakumar K., Ding J., Ge Y., Darr H., Chang B., et al. // *Cell*. 2011. V. 145. № 2. P. 183–197.
75. Dou Y., Milne T.A., Ruthenburg A.J., Lee S., Lee J.W., Verdine G.L., Allis C.D., Roeder R.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006. V. 13. № 8. P. 713–719.
76. Cao F., Chen Y., Cierpicki T., Liu Y., Basrur V., Lei M., Dou Y. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. P. e14102.
77. Pullirsch D., Hartel R., Kishimoto H., Leeb M., Steiner G., Wutz A. // *Development*. 2010. V. 137. № 6. P. 935–943.
78. Wysocka J., Swigut T., Milne T.A., Dou Y., Zhang X., Burlingame A.L., Roeder R.G., Brivanlou A.H., Allis C.D. // *Cell*. 2005. V. 121. № 6. P. 859–872.
79. Kim J.K., Huh S.O., Choi H., Lee K.S., Shin D., Lee C., Nam J.S., Kim H., Chung H., Lee H.W., et al. // *Mol. Cell Biol*. 2001. V. 21. № 22. P. 7787–7795.
80. Wu J.I., Lessard J., Olave I.A., Qiu Z., Ghosh A., Graef I.A., Crabtree G.R. // *Neuron*. 2007. V. 56. № 1. P. 94–108.
81. Wu J.I., Lessard J., Crabtree G.R. // *Cell*. 2009. V. 136. № 2. P. 200–206.
82. Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staahl B.T., Wu H., Aebersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. // *Neuron*. 2007. V. 55. № 2. P. 201–215.
83. Ho L., Jothi R., Ronan J.L., Cui K., Zhao K., Crabtree G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 13. P. 5187–5191.
84. Ho L., Ronan J.L., Wu J., Staahl B.T., Chen L., Kuo A., Lessard J., Nesvizhskii A.I., Ranish J., Crabtree G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 13. P. 5181–5186.
85. Roberts C.W., Galusha S.A., McMenamin M.E., Fletcher C.D., Orkin S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 25. P. 13796–13800.
86. Bultman S.J., Gebuhr T.C., Pan H., Svoboda P., Schultz R.M., Magnuson T. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. № 13. P. 1744–1754.
87. Gao X., Tate P., Hu P., Tjian R., Skarnes W.C., Wang Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 18. P. 6656–6661.
88. Guidi C.J., Sands A.T., Zambrowicz B.P., Turner T.K., Demers D.A., Webster W., Smith T.W., Imbalzano A.N., Jones S.N. // *Mol. Cell Biol*. 2001. V. 21. № 10. P. 3598–3603.
89. Fazio T.G., Huff J.T., Panning B. // *Cell*. 2008. V. 134. № 1. P. 162–174.
90. Schaniel C., Ang Y.S., Ratnakumar K., Cormier C., James T., Bernstein E., Lemischka I.R., Paddison P.J. // *Stem. Cells*. 2009. V. 27. № 12. P. 2979–2991.
91. Seki Y., Kurisaki A., Watanabe-Susaki K., Nakajima Y., Nakanishi M., Arai Y., Shiota K., Sugino H., Asashima M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 24. P. 10926–10931.
92. Hu G., Kim J., Xu Q., Leng Y., Orkin S.H., Elledge S.J. // *Genes Dev*. 2009. V. 23. № 7. P. 837–848.
93. Singhal N., Graumann J., Wu G., Arauzo-Bravo M.J., Han D.W., Greber B., Gentile L., Mann M., Scholer H.R. // *Cell*. 2010. V. 141. № 6. P. 943–955.
94. He L., Liu H., Tang L. // *Stem. Cell Rev*. 2012. V. 8. № 1. P. 128–136.
95. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. // *EMBO J*. 1999. V. 18. № 15. P. 4261–4269.
96. Ho L., Miller E.L., Ronan J.L., Ho W.Q., Jothi R., Crabtree G.R. // *Nat. Cell Biol*. 2011. V. 13. № 8. P. 903–913.
97. Denslow S.A., Wade P.A. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 37. P. 5433–5438.
98. McDonel P., Costello I., Hendrich B. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009. V. 41. № 1. P. 108–116.
99. Kaji K., Caballero I.M., MacLeod R., Nichols J., Wilson V.A., Hendrich B. // *Nat. Cell Biol*. 2006. V. 8. № 3. P. 285–292.
100. Zhu D., Fang J., Li Y., Zhang J. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 11. P. e7684.
101. Kaji K., Nichols J., Hendrich B. // *Development*. 2007. V. 134. № 6. P. 1123–1132.
102. Reynolds N., Salmon-Divon M., Dvinge H., Hynes-Allen A., Balasooriya G., Leaford D., Behrens A., Bertone P., Hendrich B. // *EMBO J*. 2011. V. 31. № 3. P. 593–605.
103. Yildirim O., Li R., Hung J.H., Chen P.B., Dong X., Ee L.S., Weng Z., Rando O.J., Fazio T.G. // *Cell*. 2011. V. 147. № 7. P. 1498–1510.
104. Bhutani N., Burns D.M., Blau H.M. // *Cell*. 2011. V. 146. № 6. P. 866–872.
105. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., et al. // *Science*. 2009. V. 324. № 5929. P. 930–935.
106. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7310. P. 1129–1133.
107. Koh K.P., Yabuuchi A., Rao S., Huang Y., Cunniff K., Nardone J., Laiho A., Tahiliani M., Sommer C.A., Mostoslavsky G., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 8. № 2. P. 200–213.
108. Inoue A., Zhang Y. // *Science*. 2011. V. 334. № 6053. P. 194.
109. Iqbal K., Jin S.G., Pfeifer G.P., Szabo P.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 9. P. 3642–3647.
110. Ikura T., Ogryzko V.V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. // *Cell*. 2000. V. 102. № 4. P. 463–473.
111. Cai Y., Jin J., Tomomori-Sato C., Sato S., Sorokina I., Parmely T.J., Conaway R.C., Conaway J.W. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. № 44. P. 42733–42736.
112. Sapountzi V., Logan I.R., Robson C.N. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2006. V. 38. № 9. P. 1496–1509.
113. Squatrito M., Gorrini C., Amati B. // *Trends Cell Biol*. 2006. V. 16. № 9. P. 433–442.
114. Herceg Z., Hulla W., Gell D., Cuenin C., Leonart M., Jackson S., Wang Z.Q. // *Nat. Genet*. 2001. V. 29. № 2. P. 206–211.
115. Gorrini C., Squatrito M., Luise C., Syed N., Perna D., Wark L., Martinato F., Sardella D., Verrecchia A., Bennett S., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7157. P. 1063–1067.
116. Loh Y.H., Zhang W., Chen X., George J., Ng H.H. // *Genes Dev*. 2007. V. 21. № 20. P. 2545–2557.

117. Chen X., Xu H., Yuan P., Fang F., Huss M., Vega V.B., Wong E., Orlov Y.L., Zhang W., Jiang J., et al. // *Cell*. 2008. V. 133. № 6. P. 1106–1117.
118. Sims R.J., 3rd, Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 51. P. 41789–41792.
119. Gaspar-Maia A., Alajem A., Polesso F., Sridharan R., Mason M.J., Heidersbach A., Ramalho-Santos J., McManus M.T., Plath K., Meshorer E., et al. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7257. P. 863–868.
120. Kooistra S.M., van den Boom V., Thummer R.P., Johannes F., Wardenaar R., Tesson B.M., Veenhoff L.M., Fusetti F., O'Neill L.P., Turner B.M., et al. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 10. P. 1703–1714.
121. Nishimoto M., Fukushima A., Okuda A., Muramatsu M. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. № 8. P. 5453–5465.
122. Cedar H., Bergman Y. // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. № 5. P. 295–304.
123. Bestor T.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 16. P. 2395–2402.
124. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. // *Cell*. 1992. V. 69. № 6. P. 915–926.
125. Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., et al. // *Nature*. 2004. V. 430. № 6998. P. 471–476.
126. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. // *Cell*. 1999. V. 99. № 3. P. 247–257.
127. Reik W. // *Nature*. 2007. V. 447. № 7143. P. 425–432.
128. Straussman R., Nejman D., Roberts D., Steinfeld I., Blum B., Benvenisty N., Simon I., Yakhini Z., Cedar H. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 5. P. 564–571.
129. Fouse S.D., Shen Y., Pellegrini M., Cole S., Meissner A., van Neste L., Jaenisch R., Fan G. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 2. № 2. P. 160–169.
130. Hattori N., Nishino K., Ko Y.G., Ohgane J., Tanaka S., Shiota K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 17. P. 17063–17069.
131. Hattori N., Imao Y., Nishino K., Ohgane J., Yagi S., Tanaka S., Shiota K. // *Genes Cells*. 2007. V. 12. № 3. P. 387–396.
132. Li J.Y., Pu M.T., Hirasawa R., Li B.Z., Huang Y.N., Zeng R., Jing N.H., Chen T., Li E., Sasaki H., et al. // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 24. P. 8748–8759.
133. Li E., Beard C., Jaenisch R. // *Nature*. 1993. V. 366. № 6453. P. 362–365.
134. Kaneda M., Okano M., Hata K., Sado T., Tsujimoto N., Li E., Sasaki H. // *Nature*. 2004. V. 429. № 6994. P. 900–903.
135. Ueda Y., Okano M., Williams C., Chen T., Georgopoulos K., Li E. // *Development*. 2006. V. 133. № 6. P. 1183–1192.
136. Tsumura A., Hayakawa T., Kumaki Y., Takebayashi S., Sakaue M., Matsuoka C., Shimotohno K., Ishikawa F., Li E., Ueda H.R., et al. // *Genes Cells*. 2006. V. 11. № 7. P. 805–814.
137. Feldman N., Gerson A., Fang J., Li E., Zhang Y., Shinkai Y., Cedar H., Bergman Y. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 2. P. 188–194.
138. Bird A. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 1. P. 6–21.
139. Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H., Wernig M., Hanna J., Sivachenko A., Zhang X., Bernstein B.E., Nusbaum C., Jaffe D.B., et al. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7205. P. 766–770.
140. Thomson J.P., Skene P.J., Selfridge J., Clouaire T., Guy J., Webb S., Kerr A.R., Deaton A., Andrews R., James K.D., et al. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7291. P. 1082–1086.
141. Ooi S.K., Qiu C., Bernstein E., Li K., Jia D., Yang Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Lin S.P., Allis C.D., et al. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7154. P. 714–717.
142. Ramsahoye B.H., Biniszkiwicz D., Lyko F., Clark V., Bird A.P., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 10. P. 5237–5242.
143. Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J.R., Lee L., Ye Z., Ngo Q.M., et al. // *Nature*. 2009. V. 462. № 7271. P. 315–322.
144. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., Hawkins R.D., Nery J.R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7336. P. 68–73.
145. Ziller M.J., Muller F., Liao J., Zhang Y., Gu H., Bock C., Boyle P., Epstein C.B., Bernstein B.E., Lengauer T., et al. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 12. P. e1002389.
146. Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. // *Nature*. 2008. V. 454. № 7200. P. 49–55.
147. 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. № 5. P. 937–946.
148. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7151. P. 313–317.
149. Bhutani N., Brady J.J., Damian M., Sacco A., Corbel S.Y., Blau H.M. // *Nature*. 2010. V. 463. № 7284. P. 1042–1047.
150. Shi Y., Desponts C., Do J.T., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 3. № 5. P. 568–574.
151. Sado T., Wang Z., Sasaki H., Li E. // *Development*. 2001. V. 128. № 8. P. 1275–1286.
152. Mak W., Nesterova T.B., de Napoles M., Appanah R., Yamanaka S., Otte A.P., Brockdorff N. // *Science*. 2004. V. 303. № 5658. P. 666–669.
153. Okamoto I., Otte A.P., Allis C.D., Reinberg D., Heard E. // *Science*. 2004. V. 303. № 5658. P. 644–649.
154. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L., Eggen A., Avner P., Duret L. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 6. P. 894–908.
155. Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F., McCabe V.M., Norris D.P., Cooper P.J., Swift S., Rastan S. // *Cell*. 1992. V. 71. № 3. P. 515–526.
156. Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. № 4. P. 400–404.
157. Lee J.T., Lu N. // *Cell*. 1999. V. 99. № 1. P. 47–57.
158. Silva S.S., Rowntree R.K., Mekhoubad S., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 12. P. 4820–4825.
159. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2007. V. 1. № 1. P. 55–70.
160. 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. № 3. P. 329–342.
161. Lengner C.J., Gimelbrant A.A., Erwin J.A., Cheng A.W., Guenther M.G., Welstead G.G., Alagappan R., Frampton G.M., Xu P., Muffat J., et al. // *Cell*. 2010. V. 141. № 5. P. 872–883.
162. Hanna J., Cheng A.W., Saha K., Kim J., Lengner C.J., Soldner F., Cassady J.P., Muffat J., Carey B.W., Jaenisch R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 20. P. 9222–9227.
163. Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., Chureau C., Morey C., Rougeulle C., Avner P. // *Science*. 2008. V. 321. № 5896. P. 1693–1695.
164. Navarro P., Moffat M., Mullin N.P., Chambers I. // *Hum. Genet.* 2011. V. 130. № 2. P. 255–264.
165. Barakat T.S., Gunhanlar N., Pardo C.G., Achame E.M., Ghazvini M., Boers R., Kenter A., Rentmeester E., Grootegoed J.A., Gribnau J. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. № 1. P. e1002001.
166. Orkin S.H., Hochedlinger K. // *Cell*. 2011. V. 145. № 6. P. 835–850.
167. Navarro P., Oldfield A., Legoupi J., Festuccia N., Dubois A., Attia M., Schoorlemmer J., Rougeulle C., Chambers I., Avner P. // *Nature*. 2010. V. 468. № 7322. P. 457–460.

168. Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., Xu N., Lee J.T. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7251. P. 128–132.
169. Tesar P.J., Chenoweth J.G., Brook F.A., Davies T.J., Evans E.P., Mack D.L., Gardner R.L., McKay R.D. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7150. P. 196–199.
170. Mattout A., Biran A., Meshorer E. // *J. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 3. № 6. P. 341–350.
171. Shi Y., Do J.T., Despons C., Hahm H.S., Scholer H.R., Ding S. // *Cell Stem. Cell*. 2008. V. 2. № 6. P. 525–528.
172. Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 7. P. 795–797.
173. Mali P., Chou B.K., Yen J., Ye Z., Zou J., Dowey S., Brodsky R.A., Ohm J.E., Yu W., Baylin S.B., et al. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 713–720.
174. Wang T., Chen K., Zeng X., Yang J., Wu Y., Shi X., Qin B., Zeng L., Esteban M.A., Pan G., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 9. № 6. P. 575–587.
175. Esteban M.A., Wang T., Qin B., Yang J., Qin D., Cai J., Li W., Weng Z., Chen J., Ni S., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 6. № 1. P. 71–79.
176. Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Kanagawa O., Nakagawa M., Okita K., Yamanaka S. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1132–1135.
177. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A., Wahl G.M., Belmonte J.C. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1140–1144.
178. Marion R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1149–1153.
179. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Canamero M., Blasco M.A., Serrano M. // *Nature*. 2009. V. 460. № 7259. P. 1136–1139.
180. Ruiz S., Panopoulos A.D., Herrerias A., Bissig K.D., Lutz M., Berggren W.T., Verma I.M., Izpisua Belmonte J.C. // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 1. P. 45–52.
181. Onder T.T., Kara N., Cherry A., Sinha A.U., Zhu N., Bernt K.M., Cahan P., Mancarci O.B., Unternaehrer J., Gupta P.B., et al. // *Nature*. 2012. V. 483. № 7391. P. 598–602.
182. Guenther M.G., Frampton G.M., Soldner F., Hockemeyer D., Mitalipova M., Jaenisch R., Young R.A. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 2. P. 249–257.
183. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiwu O., Richter L., Zhang J., et al. // *Cell Stem. Cell*. 2009. V. 5. № 1. P. 111–123.
184. Newman A.M., Cooper J.B. // *Cell Stem. Cell*. 2010. V. 7. № 2. P. 258–262.
185. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., et al. // *Cell*. 2011. V. 144. № 3. P. 439–452.
186. Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H., Umezawa A. // *PLoS Genet*. 2011. V. 7. № 5. P. e1002085.
187. Kim K., Doi A., Wen B., Ng K., Zhao R., Cahan P., Kim J., Aryee M.J., Ji H., Ehrlich L.I., et al. // *Nature*. 2010. V. 467. № 7313. P. 285–290.
188. Bar-Nur O., Russ H.A., Efrat S., Benvenisty N. // *Cell Stem. Cell*. 2011. V. 9. № 1. P. 17–23.
189. Stadtfeld M., Apostolou E., Akutsu H., Fukuda A., Follett P., Natesan S., Kono T., Shioda T., Hochedlinger K. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7295. P. 175–181.
190. Polo J.M., Liu S., Figueroa M.E., Kulal W., Eminli S., Tan K.Y., Apostolou E., Stadtfeld M., Li Y., Shioda T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 8. P. 848–855.
191. Marchetto M.C., Yeo G.W., Kainohana O., Marsala M., Gage F.H., Muotri A.R. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. P. e7076.
192. Hu Q., Friedrich A.M., Johnson L.V., Clegg D.O. // *Stem. Cells*. 2010. V. 28. № 11. P. 1981–1991.
193. Kim K., Zhao R., Doi A., Ng K., Unternaehrer J., Cahan P., Hongguang H., Loh Y.H., Aryee M.J., Lensch M.W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 12. P. 1117–1119.