

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН**

На правах рукописи

ВАСЬКОВА ЕВГЕНИЯ АНДРЕЕВНА

**МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ИНАКТИВАЦИИ
X-ХРОМОСОМЫ У ГРЫЗУНОВ**

03.02.07 – генетика

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Закиян Сурен Минасович**

Новосибирск 2014

СОДЕРЖАНИЕ

Список использованных сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Мейотическая инактивация половых хромосом в сперматогенезе у самцов млекопитающих	13
1.1.1. Феномен мейотической инактивации половых хромосом	13
1.1.2. Динамика модификаций хроматина половых хромосом на разных стадиях сперматогенеза	14
1.1.3. Постмейотический половой хроматин.....	18
1.1.4. Механизм мейотической инактивации половых хромосом	19
1.1.5 Экспрессия генов половых хромосом на мейотических и постмейотических стадиях.....	21
1.2 Феномен инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих.....	24
1.2.1 Динамика модификаций хроматина неактивной X-хромосомы в онтогенезе самок плацентарных млекопитающих	25
1.2.2 Модификации хроматина неактивной X-хромосомы при импринтированной инактивации у сумчатых млекопитающих.....	30
1.2.3 Два типа факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы..	31
1.3 Механизмы, обеспечивающие установление модификаций неактивного хроматина	34
1.4 Мейотическая инактивация половых хромосом как возможный предковый механизм процесса импринтированной инактивации X-хромосомы.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Объект исследования.....	40
2.2. Методы работы с клеточными культурами.....	40
2.2.1. Состав культуральных сред и условия культивирования	40
2.2.2. Получение культур клеток	41
2.2.3. Замораживание клеток.....	42
2.2.4. Размораживание клеток.....	43
2.3. Приготовление препаратов метафазных хромосом	43

2.4	Приготовление препаратов мейотических и постмейотических стадий сперматогенеза	43
2.5.	Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер и метафазных хромосом	44
2.6	ДНК флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	45
2.6	Выделение РНК	46
2.7.	Синтез кДНК методом обратной транскрипции	46
2.8.	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	47
2.9	Электрофорез ДНК в агарозном геле	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		50
3.1	Модификации неактивного хроматина X-хромосомы в составе полового тельца в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга у полевки <i>M. levis</i>	51
3.2	Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у полевки <i>M. levis</i>	54
3.2.1	Получение и анализ линии ТС клеток полевки <i>M. levis</i>	55
3.2.2	Модификации хроматина в недифференцированных ТС клетках самки полевки <i>M. levis</i>	58
3.2.3	Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе дифференцировки ТС клеток полевки <i>M. levis</i>	61
3.3	Модификации хроматина Y-хромосомы в недифференцированных трофобластных стволовых клетках <i>M. levis</i>	64
3.4.	Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у мыши <i>M. musculus</i>	66
3.5	Модификации хроматина при случайной инактивации X-хромосомы у крысы <i>R. norvegicus</i>	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		72
ВЫВОДЫ		74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		75

Список использованных сокращений

ВКМ – внутренняя клеточная масса бластоцисты;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДМСО – диметилсульфоксид;

кДНК – комплементарная ДНК;

п.н. – пара нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

сМ – сантиметр;

ТС клетки – трофобластные стволовые клетки;

DAPI – 4',6'-диамидино-2-фенилиндолин;

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium);

FBS – эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum);

FCS – эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота (fetal calf serum);

FGF4 – fibroblast growth factor;

H3K4 – лизин в 4 положении гистона H4;

H3K9 – лизин в 9 положении гистона H3;

H3K27 – лизин в 27 положении гистона H3;

H4K5 – лизин в 5 положении гистона H4;

H4K8 – лизин в 8 положении гистона H4;

H4K12 – лизин в положении 12 гистона H4;

H4K16 – лизин в положении 16 гистона H4;

H4K20 – лизин в 20 положении гистона H4;

MSCI – мейотическая инактивация половых хромосом (meiotic sex chromosome inactivation);

PBS – фосфатный буфер (phosphate-buffered saline);

PMSC – постмейотический половой хроматин (post meiotic sex chromatin);

PRC1 – Polycomb repressive complex 1;

PRC2 – Polycomb repressive complex 2;

uH2A – моноубиквитинированный по лизину в 119 положении гистон H2A (ubiquitylated H2A);

Xp – X-хромосома, унаследованная от отца;

Xm – X-хромосома, унаследованная от матери;

γH2AX – вариант гистона H2A, H2AX, фосфорилированный по серину в 139 положении.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

У высших млекопитающих известны, по крайней мере, три формы инактивации X-хромосомы: мейотическая, импринтированная и случайная. Мейотическая инактивация половых хромосом (MSCI: meiotic sex chromosome inactivation) происходит в сперматогенезе у самцов млекопитающих на стадии пахитены мейоза, когда синаптонемные комплексы связывают попарно все гомологичные хромосомы. Поскольку половые X- и Y-хромосомы гетерологичны, то на данной стадии они формируют, так называемое, половое или XY-тельце и становятся транскрипционно неактивными (Lifschytz, Lindsley, 1972; Solari, Bianchi, 1975; Namekawa *et al.*, 2007). Стоит отметить, что транскрипционно неактивное состояние половых хромосом сохраняется, в некоторой степени, и на постмейотических стадиях сперматогенеза (Namekawa *et al.*, 2006).

Импринтированная и случайная формы инактивации имеют место у самок высших млекопитающих. Импринтированная инактивация, т.е. инактивация X-хромосомы, унаследованной от отца (Xp), имеет место во всех тканях у сумчатых млекопитающих (Sharman, 1971) и на предимплантационных стадиях развития плацентарных. У плацентарных млекопитающих такая форма инактивации сохраняется в клетках внезародышевых органов (плацента, желточный мешок) (Takagi, Sasaki, 1975; Huynh, Lee, 2003; Okamoto, Heard, 2006). В клетках эпибласта X-хромосома подвергается реактивации и далее выбор будущей неактивной X-хромосомы происходит случайным образом (Heard, Distechе, 2006).

В основе импринтированной и случайной форм инактивации X-хромосомы лежит экспрессия гена *Xist* (*X inactive specific transcript*). Ген *Xist* локализуется на X-хромосоме в специфическом локусе – центре инактивации X-хромосомы, и транскрибирует длинную некодирующую ядерную РНК. Транскрипт гена *Xist* распространяется вдоль будущей неактивной X-хромосомы и обуславливает привлечение различных факторов и ферментов, модифицирующих хроматин. В процессе MSCI также было показано, что с X-хромосомы осуществляется экспрессия гена *Xist*, тем не менее, для инициации сайленсинга и поддержания

неактивного состояния половых хромосом транскрипт гена *Xist* не является необходимым (McCarrey *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002). Ключевым этапом при *Xist*-зависимой или *Xist*-независимой инактивации, обуславливающим репрессию транскрипции X-сцепленных генов, является аккумуляция или утрата определенной комбинации модификаций гистонов. Ковалентные модификации коровых гистонов и их вариантов изменяют суммарный заряд, конформацию и другие свойства хроматина, способствуют привлечению в нужное место и время негистоновых факторов и ферментов, отвечающих за репрессию транскрипции и характер репликации (Heard, Distechе, 2006; Shevchenko *et al.*, 2006). Таким образом, вовлеченность различных модификаций хроматина при реализации различных форм инактивации X-хромосомы представляет собой фундаментальную задачу для исследований данных процессов.

В настоящее время известно, что при случайной инактивации в соматических тканях человека, коровы и полевки, а также при импринтированной инактивации в клетках экстраэмбриональной эндодермы полевки модификации хроматина неактивной X-хромосомы формируют два типа гетерохроматина (Duthie *et al.*, 1999; Chadwick, Willard, 2004; de Napoles *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004; Kohlmaier *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Coppola *et al.*, 2008; Shevchenko *et al.*, 2009). Первый тип гетерохроматина характеризуется ассоциацией с *Xist* РНК, триметилированным по лизину в 27 положении гистоном H3 (H3K27), моноубиквитинированным по лизину в положении 119 гистоном H2A (uH2A). Данные модификации локализуются в районах, соответствующих G-негативным бэндам. Второй тип гетерохроматина характеризуется ассоциацией с гетерохроматиновым белком HP1, триметилированным по лизину в 9 положении гистоном H3 (H3K9) и триметилированным в 20 положении гистоном H4 (H4K20). Данные модификации локализуются в G-позитивных бэндах. Кроме того, этот тип гетерохроматина характерен не только для неактивной X-хромосомы, но и для районов конститутивного гетерохроматина. На сегодняшний день остается неясным, свойственна ли такая организация хроматина неактивной X-хромосоме других видов плацентарных млекопитающих, а также принимают ли эти два типа гетерохроматина участие в поддержании неактивного состояния X-хромосомы на более ранних стадиях импринтированной инактивации. Кроме того, показано, что в

соматических клетках самок мыши структура неактивной X-хромосомы представлена модификациями только первого типа (триметилированным H3K27 и uH2A), тогда как триметилированные формы H3K9, H4K20 и HP1 были детектированы только в районах конститутивного хроматина (Rens *et al.*, 2010). Это говорит о том, что существование двух типов гетерохроматина неактивной X-хромосомы не является универсальным для всех плацентарных и изучение у других представителей, в том числе – отряда грызунов, является актуальной задачей.

Другим важным и активно обсуждаемым вопросом является явление импринтинга Xp, т.е. почему на ранних стадиях развития у представителей самок ряда млекопитающих инактивации подвергается именно X-хромосома, унаследованная от отца. Одним из возможных объяснений является, так называемая, гипотеза о «преинактивированном» состоянии Xp: полагают, что в результате MSCI X-хромосома сохраняет некоторые маркеры неактивного хроматина в зиготе при оплодотворении и поэтому предетерминирована в отношении инактивации. Соответственно, исследование специфики модификаций на мейотических, постмейотических этапах сайленсинга половых хромосом, а также на ранних этапах импринтированной инактивации позволит оценить вклад процесса MSCI в явление импринтинга Xp.

Решению вопроса о том, какие системы сайленсинга участвуют в формировании гетерохроматина неактивной X-хромосомы при различных формах инактивации (в процессах мейотического и постмейотического сайленсинга половых хромосом, при импринтированной и случайной формах) будет способствовать изучение модификаций хроматина у различных представителей класса млекопитающих.

Цели и задачи исследования

Цель работы – исследовать модификации хроматина неактивной X-хромосомы при мейотической, импринтированной и случайной формах инактивации у грызунов

Задачи:

1. Исследовать спектр модификаций неактивного хроматина X-хромосомы в составе полового тельца в процессе мейотической инактивации половых хромосом и на постмейотических стадиях сперматогенеза у полевки *M. levis*;
2. Изучить спектр и паттерн распределения модификаций неактивного хроматина X-хромосомы в трофобластных стволовых клетках самок полевки *M. levis* и мыши *M. musculus*;
3. Исследовать спектр и паттерн распределения модификаций неактивного хроматина X-хромосомы в соматических клетках самки крысы *R. norvegicus*

Научная новизна работы

Впервые установлена динамика формирования гетерохроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у двух видов грызунов: обыкновенной полевки *M. levis* и домашней мыши *M. musculus*. Было обнаружено, что в процессе мейотического сайленсинга половых хромосом и на ранних стадиях импринтированной инактивации в формировании гетерохроматина неактивной X-хромосомы принимает участие спектр модификаций хроматина, отличный от последующих стадий импринтированной и случайной форм инактивации X-хромосомы. Полученные данные позволили выдвинуть более масштабное предположение о процессе формирования гетерохроматиновых районов генома в раннем эмбриогенезе у грызунов.

На примере соматических клеток крысы исследована структура хроматина неактивной X-хромосомы при случайной инактивации, что позволило выявить не только общие закономерности, но и видоспецифические особенности процесса случайной инактивации у различных представителей млекопитающих.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты данной работы вносят вклад в понимание эпигенетических основ регуляции экспрессии генов и будут интересны для исследователей, занимающихся изучением раннего эмбрионального развития грызунов. Полученные данные могут быть использованы в курсах лекций по генетике для студентов биологических факультетов.

Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания метафазных хромосом клеточных линий проводился совместно с к.б.н. А.И. Шевченко, к.б.н. Е.В. Дементьевой и к.б.н. С.В. Павловой.

Апробация работы

Результаты работы были представлены

1. **Васькова Е.А.**, Дементьева Е.В. Сравнение модификаций хроматина неактивной X-хромосомы фибробластах и трофобластных стволовых клеток обыкновенных полевок // Материалы XLVI международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», г. Новосибирск, 2008, стр. 100-101
2. **Васькова Е.А.** Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе мейотической и импринтированной инактивации у обыкновенных полевок // Материалы XLVII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», г. Новосибирск, 2009, стр. 157-158
3. **Васькова Е.А.** Сходный паттерн распределения модификаций хроматина на неактивной X-хромосоме в процессе мейотической и импринтированной инактивации у обыкновенных полевок // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2009, секция «биология», г. Москва, 2009, стр. 88-89

4. **Васькова Е.А.**, Шевченко А.И., Павлова С.В., Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Закиян С.М. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы у обыкновенных полевок // Материалы международной конференции «Хромосома 2009», г. Новосибирск, 2009, стр. 94
5. **Васькова Е.А.**, Шевченко А.И., Павлова С.В., Дементьева Е.В., Григорьева Е.В., Закиян С.М. Структура хроматина неактивной X-хромосомы у обыкновенных полевок // XVI Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра», г. Санкт-Петербург, 2009, стр. 649-650
6. Dementyeva E.V., **Vaskova E.A.**, Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Zakian S.M. Paternal X-chromosome is preinactivated at early stages of imprinted X-inactivation in rodents // EMBO Workshop "50 Years of X inactivation research" (3rd X-inactivation Conference), July 20-24, 2011, Oxford, UK, p. 72
7. **Vaskova E.A.**, Shevchenko A.I., Gracheva E.A., Medvedev S.P., Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Zakian S.M.// Epigenetic status of X chromosome in female human induced pluripotent stem cells EMBO Workshop "50 Years of X inactivation research" (3rd X-inactivation Conference), July 20-24, 2011, Oxford, UK, p. 107
8. **Васькова Е.А.**, Шевченко А.И., Дементьева Е.В., Павлова С.В., Григорьева Е.В., Закиян С.М. Модификации неактивного хроматина при различных формах сайленсинга X-хромосомы у грызунов // Материалы международной конференции «Хромосома 2012», Новосибирск 2012г, стр.64

По теме диссертации опубликованы три работы.

1. **Васькова Е.А.**, Павлова С.В., Шевченко А.И., Закиян С.М. Мейотическая инактивация половых хромосом у млекопитающих // Генетика, Т.46, №4, 437-447
2. **Васькова Е.А.**, Павлова С.В., Шевченко А.И., Закиян С.М. Мейотическая инактивация половых хромосом // глава в коллективной монографии «Эпигенетика» / Отв. ред. С.М. Закиян; В.В. Власов; Е.В. Дементьева; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т цитологии и генетики [и др.] – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. – 592 с. (Глава 19, 451-464)
3. **Vaskova E.A.**, Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Grigor'eva E.V., Zhelezova A.I., VandeBerg J.L., Zakian S.M. // Dynamics of the two heterochromatin

types during imprinted X chromosome inactivation in vole *Microtus levis* // PLoS One, 2014, doi:10.1371/journal.pone.0088256

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 3-х глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 89 страницах, содержит 16 рисунков и 2 таблицы.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю С.М. Закияну за поддержку и помощь при выполнении всех этапов настоящего исследования. Автор искренне благодарит А.И. Шевченко, Е.В. Дементьеву и С.В. Павлову за помощь в проведении экспериментов и анализе полученных данных, а также Е.В. Григорьеву за помощь в работе с трофобластными стволовыми клетками. Автор благодарен А.И. Железовой, Л.А. Чугаевой и А.Н. Голубице за помощь в работе с полевками и их эмбрионами, а также всему коллективу лаборатории за дружеское участие и практическую помощь в работе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Мейотическая инактивация половых хромосом в сперматогенезе у самцов млекопитающих

1.1.1. Феномен мейотической инактивации половых хромосом

У многих эукариотических организмов районы хромосом или целые хромосомы, не имеющие гомологов, подвергаются инактивации транскрипции и хроматина в ходе первой профазы мейоза. Этот феномен, получивший название мейотического сайленсинга асинапированных районов хромосом, имеет место как у самцов, так и у самок млекопитающих (Kelly, Aramayo, 2007; Turner, 2007). Частным случаем данного феномена является процесс мейотической инактивации половых хромосом. На стадии пахитены первого деления мейоза, когда синаптонемные комплексы связывают попарно все гомологичные хромосомы, гетероморфные X- и Y-хромосомы становятся транскрипционно неактивными и формируют половое, или XY-тельце (Turner, 2007).

На сегодняшний день существуют различные гипотезы о биологической роли MSCI. Например, считают, что формирование структуры полового тельца позволяет маскировать неспаренные половые хромосомы при прохождении «точки контроля» в клеточном цикле (Odorisio *et al.*, 1998), т.к. присутствие асинапированного хроматина на данной стадии приводит к апоптозу. Кроме того, MSCI может быть необходима для инактивации X-сцепленных генов, продукты которых оказывают подавляющее действие на процесс сперматогенеза (Lifschytz, Lindsley, 1972). MSCI также можно рассматривать в качестве механизма, предотвращающего рекомбинацию (McKee, Handel, 1993) и/или повреждения ДНК (Ayoub *et al.*, 1997) в асинапированных районах половых хромосом в процессе мейоза.

1.1.2. Динамика модификаций хроматина половых хромосом на разных стадиях сперматогенеза

Процесс сперматогенеза можно разделить на три этапа: сперматогониогенез, мейоз и спермиогенез (Рисунок 1).

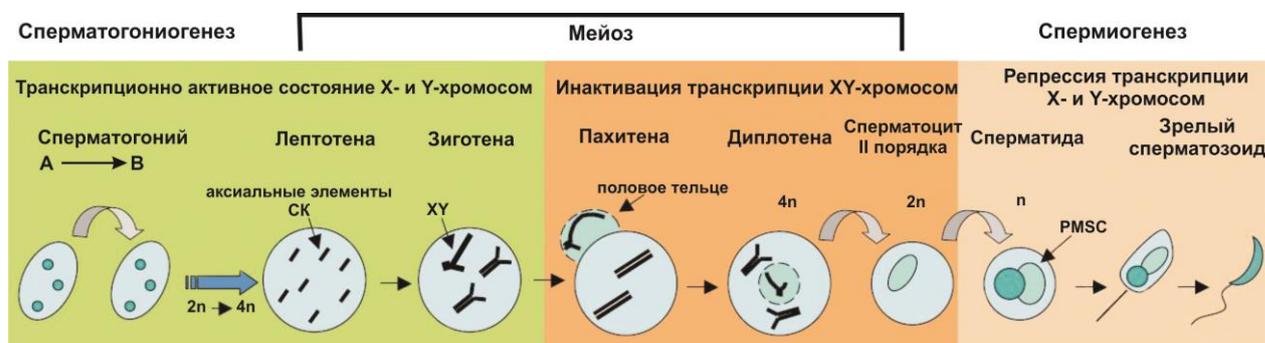


Рисунок 1. Основные этапы процесса сперматогенеза у мыши (Turner, 2007).

СК – синаптонемный комплекс;

PMSC – постмейотический половой хроматин;

Остальные пояснения даны в тексте

На стадии сперматогониогенеза сперматогонии типа А являются стволовыми клетками и способны как к самопроизводству, так и к образованию клеток другого типа – сперматогониев типа В, вступающих в мейоз. В процессе мейоза каждая клетка претерпевает серию цитологически идентифицируемых стадий. На стадии лептотены хромосомы изменяют свою интерфазную конформацию и переходят в конденсированное состояние. Сближение хромосом и образование синапса свидетельствует о переходе лептотены в зиготену. Инициация конъюгации гомологов сопровождается формированием аксиальных элементов синаптонемного комплекса. На стадии пахитены полностью завершается синапс гомологичных аутосом, образуются центральные элементы синаптонемного комплекса, который попарно связывает все гомологичные хромосомы, гетероморфные же X- и Y-хромосомы не конъюгируют или при наличии псевдоаутосомного района конъюгируют не полностью. На стадии диплотены/диакнеза происходит деградация синаптонемного комплекса и разделение хромосом. На стадии метафазы первого деления мейоза завершается

разделение гомологичных хромосом. Образовавшиеся диплоидные клетки далее подвергаются второму мейотическому делению. В результате образуются клетки, имеющие гаплоидный набор хромосом, - округлые сперматиды, которые вступают в заключительную стадию сперматогенеза – спермиогенез. На этой стадии ядро уплотняется, происходят значительные перестройки в структуре хроматина: большинство гистонов замещаются на протамины, происходит формирование акросомы и жгутика, утрачивается практически вся цитоплазма. В результате такой клеточной дифференцировки сперматиды превращаются в зрелые сперматозоиды (Handel, 2004).

В процессе сперматогенеза в половых клетках происходит реорганизация структуры хроматина: соматические коровые гистоны и линкерный гистон H1 частично замещаются на специфические для семенника изоформы или варианты гистонов. Замена гистонов в хроматине может происходить как во время репликации, так и без нее. Инкорпорация изоформ гистонов, характерных для сперматогонимального хроматина, завершается к стадии сперматоцита I порядка. Далее гистоны и их варианты динамически подвергаются различным посттрансляционным модификациям: метилированию, ацетилированию, фосфорилированию, убиквитинированию, которые соответствуют активному или неактивному состоянию хроматина на разных стадиях сперматогенеза. Кроме того, в состав хроматина при сперматогенезе могут включаться различные негистоновые структурные белки, ферменты и РНК. Суммарно динамика основных модификаций хроматина в процессе сперматогенеза у мыши представлена на Рисунке 2.

На ранних стадиях сперматогенеза (**сперматогоний, лептотена, зиготена**) гены аутосом и половых хромосом активно транскрибируются, и на всех хромосомах выявляются ковалентные модификации гистонов, характерные для транскрипционно активного хроматина. Выявляются ацетилированные формы гистона H4 по лизинам в положениях 5, 8, 12, 16 (H4K5, H4K8, H4K12, H4K16) и H3K9 (Khalil *et al.*, 2004). Наблюдается ассоциация с моно-, ди-, и триметилированным по лизину 4 гистон H3 (H3K4) (Godmann *et al.*, 2007; van der Heijden *et al.*, 2007).

На стадии **пахитены** происходит формирование полового тельца и инактивация генов X- и Y-хромосом, что сопровождается исключением РНК-

полимеразы II из области полового тельца и значительными изменениями в структуре хроматина половых хромосом. На стадии ранней пахитены в районе XY-хромосом происходит деацетилирование H4K12 и H4K16 и гиперацилирование H4K5 и H4K8, а также кратковременное возращание уровня ацетилированного гистона H3K9. К стадии поздней пахитены наблюдается деацетилирование H3K9 (Khalil *et al.*, 2004).

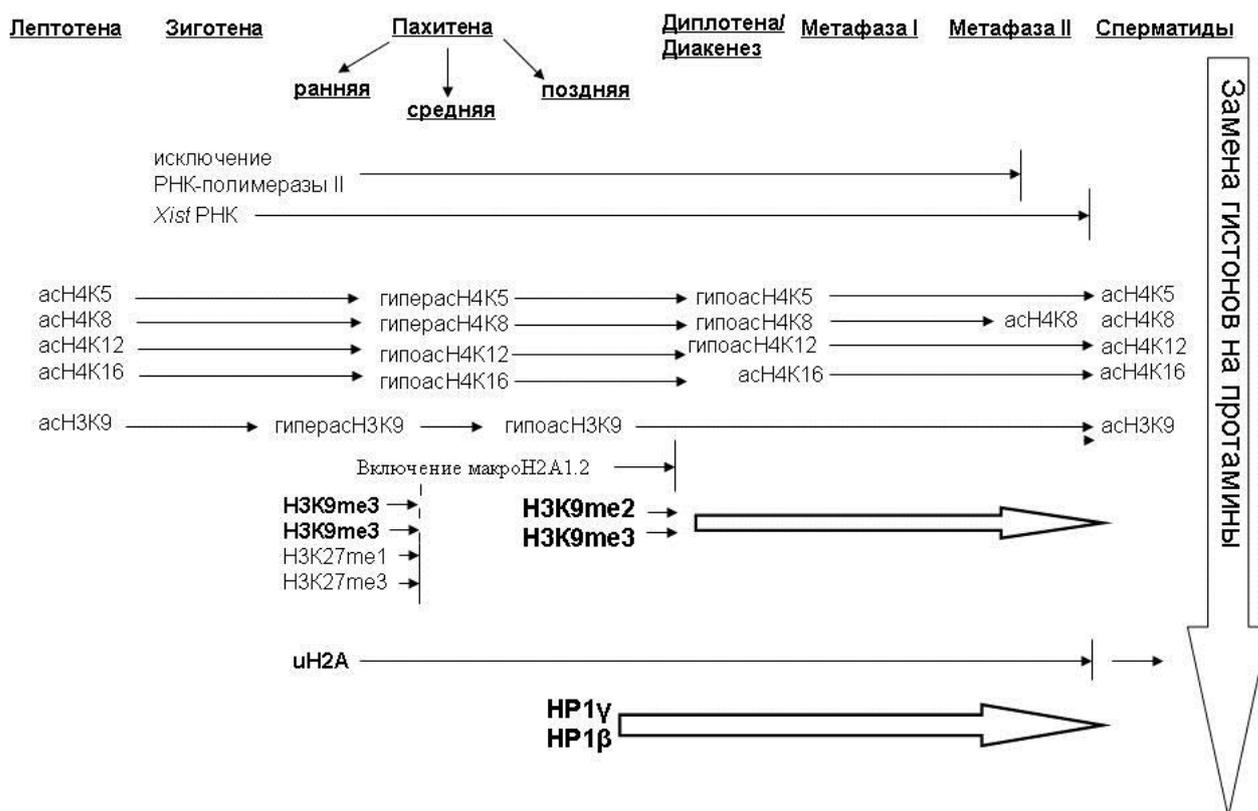


Рисунок 2. Объединенная схема динамики модификаций хроматина в процессе сперматогенеза у ряда представителей млекопитающих

ас – ацетилированная форма;

гиперас – гиперацилированная форма;

гипоас – гипоацилированная форма;

-me1, -me2, -me3 – моно-, ди- и триметилированные формы, соответственно;

Остальные пояснения даны в тексте

Такой паттерн ацетилирования сохраняется до стадии диплотены. Также происходит исключение таких маркеров активного хроматина, как моно-, ди- и триметилированных форм H3K4 (Godmann *et al.*, 2007; van der Heijden *et al.*, 2007).

Одновременно со снижением уровня модификаций гистонов, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином, происходит аккумуляция модификаций, характерных для неактивного хроматина. Так, на ранних стадиях пахитены происходит значительное обогащение половых хромосом ди- и триметилированными формами H3K9. Тогда как, на стадии средней пахитены данные модификации отсутствуют, реинтегрируясь снова на стадии поздней пахитены. Интересно отметить, что с половых хромосом наблюдается специфическое исключение моно- и триметилированной форм H3K27 (Namekawa *et al.*, 2006).

На стадии пахитены также происходит убиквитинирование гистона H2A. Ассоциация uH2A с половыми хромосомами на стадии пахитены показана также для человека и крысы, что свидетельствует о высокой консервативности ассоциации данной модификации с транскрипционно неактивным хроматином в мейозе (Baarends *et al.*, 2005).

Кроме ковалентных модификаций гистонов неактивное состояние генов половых хромосом обеспечивается ассоциацией с гетерохроматиновыми белками HP1 γ и HP1 β . Как было показано на человеке (Metzler-Guillemain *et al.*, 2003) и мыши (Greaves *et al.*, 2006), HP1 γ и HP1 β вовлекаются в состав половых хромосом на стадии поздней пахитены и ассоциируются с ними до конца спермиогенеза. По некоторым данным, белки HP1 γ и HP1 β в составе половых хромосом переносятся в зиготу (van der Heijden *et al.*, 2006; Ooi, Henikoff, 2007). Интересно, что у сумчатых наблюдается более ранняя ассоциация с гетерохроматиновыми белками HP1 γ и HP1 β и происходит уже на ранних стадиях пахитены (Namekawa *et al.*, 2007).

На стадии пахитены в составе полового хроматина появляются и другие компоненты гетерохроматина, как, например, макроH2A1.2 (Greaves *et al.*, 2006). На начальных этапах конденсации хроматина макроH2A1.2 локализуется на половых хромосомах, а затем лишь в прицентромерных и псевдоаутосомных районах X- и Y-хромосом. Напротив, HP1 β сначала выявляется в районах центромер и псевдоаутосомных районах и только затем в составе полового

хроматина (Hoyer-Fender *et al.*, 2004). Предполагают, что макроH2A1.2 вовлечен в процесс распространения гетерохроматинизации половых хромосом (Turner *et al.*, 2001) и, возможно, привлекает HP1 β . В образовании неактивной структуры X- и Y-хромосом принимают участие и другие варианты гистона H2A. Так, например, H2A.Z, уровень которого значительно возрастает на стадии пахитены (Greaves *et al.*, 2006).

На стадии ранней **диплотены** изменяется ситуация с ацетилированием гистона H4: гипoaцетилированию подвергаются также H4K5 и H4K8, H4K16 подвергается ацетилированию (Khalil *et al.*, 2004), а HP1 γ и HP1 β распределены уже вдоль всего XY-тельца (Namekawa *et al.*, 2006).

Таким образом, к стадии пахитены/диплотены половые хромосомы имеют гипoaцетилированный гистон H4 по лизинам 12, 16 и гипoaцетилированный гистон H3K9. Кроме того, они обогащены характерными для неактивного хроматина ди- и триметилированными формами H3K9, uH2A, а также ассоциированы с макроH2A1.2, гетерохроматиновыми белками HP1 γ , HP1 β и РНК гена *Xist*. Неактивное состояние половых хромосом сохраняется после первого и второго деления мейоза и даже на постмейотических стадиях в спермиогенезе, когда происходит утрата ряда модификаций неактивного хроматина. Такой неактивный хроматин постмейотических X- и Y-хромосом получил название постмейотический половой хроматин (PMSC: post meiotic sex chromatin) (Namekawa *et al.*, 2006).

1.1.3. Постмейотический половой хроматин

Изменения в ядерной организации и структуре хроматина продолжают в течение всего процесса сперматогенеза.

На стадии округлых сперматид аутосомы занимают определенные хромосомные территории таким образом, что прицентромерный гетерохроматин всех хромосом оказывается расположенным радиально в центре ядра, образуя единый, крупный хромоцентр. Половые хромосомы образуют компактный домен около данного хромоцентра (Greaves *et al.*, 2006). Хромосомы организованы

радиально вокруг хромоцентра в Rab1-конфигурации, тогда как половые хромосомы образуют компактный смежный хромоцентр.

На данной стадии на половых хромосомах гистон H4 подвергается ацетилированию в положениях K5 и K12 и происходит ацетилирование H3K9 (Khalil *et al.*, 2004). Кроме того, в половом хроматине у мыши наблюдается снижение уровня uH2A (Baarends *et al.*, 1999), тогда как у крысы уровень uH2A практически не изменяется (Chen *et al.*, 1998). Следует отметить, что на стадии элонгации сперматид у мыши снова происходит убиквитинирование гистона H2A. Причем, новая волна убиквитинирования предшествует замене гистонов на протамины. Таким образом, вероятно, убиквитинирование гистонов играет роль в постмейотической реорганизации полового хроматина (Baarends *et al.*, 1999).

В постмейотическом половом хроматине в сперматидах у плацентарных и сумчатых млекопитающих выявляются HP1 γ , HP1 β и триметилированный H3K9, которые характерны для мейотического сайленсинга. У плацентарных млекопитающих постмейотический половой хроматин ассоциирован также с диметилированным H3K9. Тем не менее, некоторые модификации гистонов отличаются во время мейотического и постмейотического сайленсинга. Например, в постмейотическом половом хроматине отсутствует макроH2A1.2, который незначительно обогащен в районах центромеры Y-хромосомы в сперматоцитах второго порядка и сперматидах, и появляется ацетилированный в положении 16 гистон H4 (Namekawa *et al.*, 2006). РНК-полимераза II вновь выявляется как на аутосомах, так и на половых хромосомах (Khalil *et al.*, 2004).

1.1.4. Механизм мейотической инактивации половых хромосом

Наличие в составе полового тельца РНК гена *Xist* позволило предположить, что инактивация транскрипции и формирование неактивной структуры хроматина при MSCI, происходит подобно механизму инактивации X-хромосомы в соматических тканях самок млекопитающих (Ayoub *et al.*, 1997). Известно, что у самок РНК гена *Xist* вызывает транскрипционный сайленсинг и привлекает белковые комплексы, вызывающие гетерохроматинизацию инактивируемой X-хромосомы (Heard, Distechе, 2006). Тем не менее, исследования MSCI показали, что

для инициации сайленсинга и поддержания неактивного состояния половых хромосом транскрипт гена *Xist* не является необходимым (McCarrey *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002). Не исключено, что РНК гена *Xist* в процессе MSCI имеет какую-то другую функцию.

На сегодняшний день предложена следующая модель формирования полового тельца у млекопитающих: на стадии пахитены BRCA1 (Breast cancer susceptibility gene 1) привлекает киназу ATR, которая в свою очередь фосфорилирует H2AX (γ H2AX) и далее запускается каскад событий, приводящих к конденсации хроматина и репрессии транскрипции (Turner *et al.*, 2004). Следует отметить, что сходные процессы, а именно связывание BRCA1 и последующее фосфорилирование H2AX, происходят в поздней S-фазе клеточного цикла на неактивной X-хромосоме у самок млекопитающих (Heard, Distechе, 2006; Шевченко *и др.*, 2006). Предполагают, что BRCA1 и γ H2AX обеспечивают быстрое привлечение различных факторов репарации и ремоделирования хроматина и интеграцию в состав хромосомы специфических вариантов гистонов, что необходимо для поддержания неактивного состояния X-хромосомы у самок (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003; van Attikum, Gasser, 2005). Вероятно, в процессе MSCI BRCA1 и γ H2AX также могут отвечать за быстрое формирование неактивной структуры полового хроматина. Например, γ H2AX способен привлекать при репарации двуцепочечных разрывов ДНК ремоделирующие хроматин белки Mre11 и Rad50, участвующие в замене нуклеосом (van der Heijden *et al.*, 2007). Также было показано, что, например, вариант гистона макроH2A1.2 в отсутствие H2AX теряет свою преимущественную локализацию с половым тельцем и равномерно выявляется по всему ядру (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003).

Тем не менее, остается неясным, как BRCA1 и γ H2AX могут вызывать транскрипционное молчание генов половых хромосом, особенно учитывая тот факт, что инактивация, по крайней мере, некоторых генов в мейозе предшествует связыванию BRCA1 и фосфорилированию H2AX.

В составе полового тельца у мыши было обнаружено присутствие белка MAEL, который может взаимодействовать с двумя белками MILLI и MIWI, участвующими в механизме РНК-интерференции, специфической для герминальной линии (Costa *et al.*, 2006). На основании этих данных предполагают,

что в установлении транскрипционного молчания генов в составе полового тельца может быть задействован механизм РНК-интерференции. Однако других сведений, подтверждающих это предположение, пока нет.

В составе XY-тельца на стадии пахитены выявлено еще несколько ферментов, необходимых для изменения структуры хроматина, которые могут быть вовлечены в процесс формирования полового хроматина у млекопитающих. Так, показано, что половое тельце на стадии пахитены обогащено ремоделирующим хроматин белком SNF5/INI1, а также белком SIN3B, являющийся компонентом гистон ацетилазного комплекса (Costa *et al.*, 2006). Показано, что аккумуляция γ H2AX на половых хромосомах предшествует появлению белка SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier), который, вероятно, также участвует в инициации мейотической инактивации (Vigodner, 2009).

1.1.5 Экспрессия генов половых хромосом на мейотических и постмейотических стадиях

Уровень экспрессии генов аутосом на мейотических и постмейотических стадиях варьирует незначительно. Гены половых хромосом подвергаются репрессии в результате процесса мейотической инактивации на стадии пахитены. Неактивное состояние для большинства генов сохраняется на постмейотических стадиях.

Индивидуальный анализ уровня транскрипции генов половых хромосом у мыши, имеющих специфическую для семенников экспрессию, показал, что для X-сцепленных генов *Usp26*, *Tkt11* и *Tex13*, а также Y-сцепленного гена *Rbmy*, уменьшение уровня транскрипции наблюдается уже на стадиях лептотены и зиготены, а инактивация X-сцепленного гена *Fthl17* выявляется на стадии прелептотены. Таким образом, возможно, что инициация процесса подавления транскрипции генов половых хромосом, обусловленная MSCI, имеет место на ранних стадиях профазы первого деления мейоза, а различия во времени, когда детектируется инактивация для отдельных генов, связаны с различной стабильностью их мРНК (Wang *et al.*, 2005). Сравнительный анализ времени инактивации отдельных генов у сумчатых и плацентарных показал, что сайленсинг

некоторых генов, локализованных на X-хромосоме у сумчатых, происходит гораздо медленнее, чем у мыши. Одним из возможных объяснений является то, что у сумчатых мРНК данных генов является более стабильной. Скорее всего, процесс MSI у сумчатых в целом является менее «строгим», чем у плацентарных (Hornecker *et al.*, 2007).

При анализе экспрессии 676 уникальных белок-кодирующих генов X-хромосомы мыши методом ДНК-микрочип показано, что все они инактивируются в ходе мейоза и у 87.0% генов наблюдается репрессия транскрипции на постмейотических стадиях (Namekawa *et al.*, 2006). В отличие от уникальных генов большинство многокопийных генов подвергаются реактивации после мейотической инактивации (Mueller *et al.*, 2008). Установлено, что у мыши из 14 известных генов половых хромосом, экспрессирующихся исключительно в семенниках и инактивирующихся в процессе MSI, частично или полностью реактивируются на постмейотических стадиях 13 генов. Показано, что не существует корреляции относительно расположения генов на половых хромосомах и степенью постмейотической реактивации. Скорее всего, степень реактивации отдельных генов отражает картину потребности в их продуктах на разных стадиях спермиогенеза (Wang *et al.*, 2005).

Можно отметить, что X-хромосома у млекопитающих обогащена генами, необходимыми для развития и созревания сперматозоидов на премейотических и постмейотических стадиях, однако не содержит генов, специфически работающих на стадии мейоза (Khil *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Таким образом, инактивация транскрипции генов половых хромосом в результате MSI не нарушает процесс мейоза. Ряд генов X-хромосомы, прерывание экспрессии которых во время MSI может нарушить важные клеточные процессы, продублированы посредством ретропозиции на аутосомах. Экспрессия аутосомных ретрогенов может компенсировать транскрипционный сайленсинг белок-кодирующих генов-предшественников на X-хромосоме во время мейоза. Известно 20 аутосомных генов, которые образовались в результате ретропозиции из белок-кодирующих генов-предшественников, локализующихся на X-хромосоме. Показано, что 14 ретрогенов экспрессируются исключительно в семенниках, тогда как их X-сцепленные предшественники являются генами «домашнего хозяйства» (Wang,

2004). Одним из примеров являются гены фосфоглицерат киназы *PGK1/PGK2*. У человека ретроген *PGK2* локализуется на 6 хромосоме, не содержит интроны и экспрессируется в семенниках. В то время как ген *PGK1* является X-сцепленным геном, содержит 10 интронов, экспрессируется во всех тканях и подвергается MSCI (McCarrey, Thomas, 1987). Ретрогены могут также функционировать после завершения мейоза, компенсируя частичную репрессию уникальных генов X-хромосомы в постмейотический период (Wang *et al.*, 2005).

1.2 Феномен инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих

У самок высших млекопитающих в процессе эмбрионального развития одна из двух X-хромосом становится транскрипционно неактивной (Lyon, 1961). Данный процесс получил название инактивация X-хромосомы. Выделяют две формы инактивации X-хромосомы: импринтированную и случайную. Импринтированная инактивация, т.е. инактивация X-хромосомы, унаследованной от отца, имеет место во всех тканях сумчатых, а также на предимплантационных стадиях развития некоторых плацентарных, у которых она далее сохраняется в клетках внезародышевых органов (Takagi, Sasaki, 1975). Во время имплантации эмбриона в клетках эпибласта (собственно эмбриона) происходит реактивация Xp (Avner, Heard, 2001). Случайная инактивация у плацентарных млекопитающих происходит в клетках собственно эмбриона, хотя у человека этот тип инактивации наблюдается также в клетках внезародышевых органов. Во время случайной инактивации шансы X-хромосом стать неактивными равны вне зависимости от их родительского происхождения.

Процесс инактивации включает четыре основные стадии: подсчет числа X-хромосом на диплоидный геном и выбор будущей неактивной X-хромосомы; инициация инактивации; распространение неактивного состояния и поддержание неактивного статуса в ряду клеточных поколений (Boumil, Lee, 2001; Okamoto *et al.*, 2004). Инициация инактивации начинается в специфическом локусе – центре инактивации X-хромосомы, содержащим ген *Xist*, продуктом которого является некодирующая ядерная РНК. На стадии инициации инактивация происходит многократное увеличение транскрипции гена *Xist*, продукт которого распространяется вдоль будущей неактивной X-хромосомы и приводит к изменению структуры хроматина и репрессии транскрипции X-сцепленных генов. Затем устанавливается поздняя репликация, происходит гиперметилирование CpG-динуклеотидов в промоторах генов неактивной X-хромосомы (Heard, 2005; Lucchesi *et al.*, 2005).

Необходимо также отметить, что модификации хроматина появляются в процессе инактивации X-хромосомы не одновременно, а в определенном порядке и на определенных стадиях эмбрионального развития (Шевченко *и др.*, 2006).

1.2.1 Динамика модификаций хроматина неактивной X-хромосомы в онтогенезе самок плацентарных млекопитающих

У плацентарных млекопитающих импринтированная инактивация имеет место в раннем эмбриогенезе и данный процесс можно разделить на два этапа. Первый этап включает в себя сайленсинг некодирующих последовательностей X-хромосомы, например, диспергированных семейств повторов LINE (long interspersed elements) и SINE (short interspersed elements). Данный этап, по крайней мере, у мыши имеет место уже к 2-клеточной стадии развития (Namekawa *et al.*, 2010). Несмотря на то, что транскрипт гена *Xist* выявляется на Xp со стадии 2-4 клеток (Kay *et al.*, 1994; Nesterova *et al.*, 2001; Zuccotti *et al.*, 2002), данный этап происходит без участия транскрипта гена *Xist*. Второй этап включает в себя инактивацию кодирующих последовательностей X-хромосомы, происходит на более поздних стадиях развития (морула-бластоциста) и является *Xist*-зависимым (Namekawa *et al.*, 2010). Тогда же происходит исключение РНК-полимеразы II с Xp, в норме ассоциированной с транскрипционно активным хроматином, что свидетельствует об инициации процесса импринтированной инактивации X-хромосомы (Okamoto *et al.*, 2004).

Наиболее ранние изменения в структуре хроматина инактивируемой X-хромосомы детектируются **на 8-клеточной стадии**. Сначала наблюдается потеря модификаций хроматина, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином. Так, в части бластомеров отмечается гипоацетилирование H3K9 и гипометилирование H3K4 (Okamoto *et al.*, 2004) (Рисунок 3).

На **стадии морулы (16 клеток)** начинается аккумуляция модификаций, характерных для транскрипционно неактивного хроматина. В части бластомеров начинает выявляться обогащение Xp белками комплекса PRC2 (Polycomb repressive complex 2), осуществляющих триметилирование H3K27 (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Также, на стадии морулы происходит замена канонического гистона H2A на неканонический макроH2A1.2, отличающийся наличием крупного негистонового домена (Costanzi *et al.*, 2000). Вероятно, функция макроH2A1.2 на неактивной X-хромосомой связана, в первую очередь, с формированием определенной конформации хроматина (Mietton *et al.*, 2009).



Рисунок 3. Динамика модификаций хроматина X-хромосомы в онтогенезе мыши (Шевченко *и др.*, 2006). Обозначения даны в тексте.

Было также показано, что макроH2A1.2 участвует в репрессии транскрипции РНК-полимеразы II (Doyen *et al.*, 2006) и, более того, несмотря на то, что данный белок ассоциирован с неактивной X-хромосомой в течение всего клеточного цикла, тем не менее, его концентрация локально возрастает в течение S-фазы, что может быть одним из резервных механизмов, обеспечивающих репликацию (Chadwick, Willard, 2002). На стадии морулы происходит также гipoацетилование гистона H4 (Mak *et al.*, 2004; Heard, Distechе, 2006).

К стадии бластоцисты число бластомеров, где на Xp выявляются белки комплекса PRC2 и триметилированный H3K27, составляет более 90% (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Также происходит инициация обогащения инактивируемой X-хромосомы диметилированной формой H3K9 (Okamoto *et al.*, 2004) и к стадии средней бластоцисты обогащение данной модификацией выявляется практически во всех клетках (Peters *et al.*, 2002). На неактивной X-хромосоме выявляются моно- и полиубиквитинирование гистона H2A со значительным преобладанием моноубиквитинированной формы (de Napoles *et al.*, 2004). Первичный процесс дифференцировки, происходящий на стадии поздней морулы, приводит к обособлению наружного слоя клеток – трофобластической оболочки (ТС клетки), и образованию внутренней клеточной массы (ВКМ). Так, было показано, что в процессе дифференцировки ТС клеток происходит постепенное уменьшение обогащения белками комплекса PRC2, хотя *Xist* РНК остается ассоциированной с

Хр. Это свидетельствует о том, что белки комплекса PRC2 функционируют на самых ранних стадиях процесса инактивации (Plath *et al.*, 2003), а затем не участвуют в поддержании неактивного статуса X-хромосомы (Plath *et al.*, 2003; Kalantry, Magnuson, 2006). Таким образом, на стадии поздней морулы – ранней бластоцисты Хр практически во всех бластомерах неактивна, что характеризуется исключением РНК-полимеразы II, наличием определенного набора модификаций гистонов, ассоциацией с белками комплекса PRC2.

В процессе созревания бластоцисты в клетках ВКМ на неактивной X-хромосоме происходит постепенное затухание экспрессии гена *Xist*, белков комплекса PRC2, тогда как триметилированный H3K27 остается ассоциирован с неактивной X-хромосомой некоторое время. В зрелой бластоцисте белки PRC2 и триметилированный H3K27 более не детектируются (Mak *et al.*, 2002). На стадии поздней бластоцисты макроH2A1.2 детектируется в некоторых клетках, ассоциированных с ВКМ, расположенных рядом с бластоцелью. Полагают, что это клетки будущей примитивной эндодермы, дифференциация которых началась до имплантации (Costanzi *et al.*, 2000).

Стоит отметить, что анализ транскрипционного статуса X-сцепленных генов показал наличие обратной корреляции между транскрипционным статусом генов и их расположением относительно центра инактивации X-хромосомы. Так, полная инактивация генов наблюдается лишь в пределах 10 сМ от центра инактивации и, чем дистальнее расположены гены, тем степень их инактивации гораздо ниже, вплоть до избегания инактивации на концах хромосом (Huynh, Lee, 2003).

Таким образом, процесс инактивации, по крайней мере, кодирующих последовательностей X-хромосомы является последовательным и отражает уровень распространения *Xist* РНК вдоль X-хромосомы: сначала сайленсинг устанавливается в районе центра инактивации и далее бинаправленно распространяется вдоль X-хромосомы (Thorvaldsen *et al.*, 2006). Кроме того, в процессе импринтированной инактивации не наблюдается поздняя репликация X-сцепленных генов, и поддержание неактивного состояния, в отличие от процесса случайной инактивации, является *Xist*-зависимым (Costanzi *et al.*, 2000).

В последующем эмбриональном развитии ВКМ подразделяется на клетки экстраэмбриональной эндодермы и эпибласта. В клетках экстраэмбриональной

эндодермы также имеет место импринтированная инактивация, на Хr отмечается наличие гипоацетилированного гистона H3K9, гипометилированного H3K4, но, в отличие от ТС клеток не наблюдается обогащение белками комплекса PRC2 и, соответственно, не детектируется метилированный гистон H3K27 и H3K9 (Kunath *et al.*, 2005; Kalantry, Magnuson, 2006).

После имплантации на 6-6.5 день в клетках экстраэмбриональной эндодермы и трофоэктодермы Хr становится поздно реплицирующейся (Sugawara *et al.*, 1983). Транскрипционное молчание генов на данной стадии является нестабильным, и возможна реактивация транскрипции. В целом, можно заключить, что у мыши инактивация X-хромосомы во время предимплантационного развития является импринтированной, неполной и обратимой.

Реактивация X-хромосомы в клетках эпибласта происходит у мыши на E3.5 – E5.5 дни развития, т.е. совпадает со временем имплантации эмбриона (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Первым признаком процесса реактивации X-хромосомы является снижение экспрессии гена *Xist*, что ассоциировано со снижением уровня белков PRC2 комплекса, и, соответственно триметилированного H3K27. Далее имеет место процесс случайной инактивации, когда обе X-хромосомы имеют равные шансы стать неактивной. Процесс случайной инактивации начинается со стадии подсчета числа X-хромосом на диплоидный геном и выбора будущей X-хромосомы. Вслед за этим происходит репрессия транскрипции генов, которая первые два дня является обратимой и напрямую зависит от экспрессии гена *Xist* (Wutz, Jaenisch, 2000). Далее, как и при импринтированной инактивации, наблюдается гипометилирование H3K4, гипоацетилирование H3K9, триметилирование H3K27, uH2A, устанавливается гипоацетилирование H4 и поздняя репликация (Keohane *et al.*, 1996; Heard *et al.*, 2001; Chaumeil *et al.*, 2002; Plath *et al.*, 2003; de Napoles *et al.*, 2004; Kohlmaier *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). Позже в состав хроматина неактивной X-хромосомы включается макроH2A1.2 (Costanzi, Pehrson, 1998; Mermoud *et al.*, 1999). После отделения линии герминальных клеток в соматических клетках происходит гиперметирирование ДНК в промоторах и гипометирирование ДНК в структурных частях генов неактивной X-хромосомы, неактивное состояние становится необратимым и устойчиво наследуется в ряду клеточных поколений. В линии

герминальных клеток самок ДНК промоторных областей генов на неактивной X-хромосоме остается неметирированной, и впоследствии X-хромосома реактивируется (Heard *et al.*, 1997).

В целом, у разных видов плацентарных млекопитающих набор модификаций, выявляемых на неактивной X-хромосоме, практически одинаков, однако существуют различия в эмбриональном развитии, в том числе связанные с инициацией процесса инактивации. Например, у кролика с 8-ми клеточной стадии выявляется экспрессия гена *Xist* как с обеих X-хромосом у самок, так и с единственной X-хромосомы у самца. Эти данные говорят о том, что у кролика процесс инициации инактивации X-хромосомы в значительной части бластомеров начинается на обеих X-хромосомах, и выбор инактивируемой в дальнейшем X-хромосоме происходит гораздо позже в развитии. В эмбриогенезе человека инактивация иницируется также гораздо позднее в развитии - на стадии поздней бластоцисты, в которой уже четко выявляется трофобластическая оболочка и ВКМ (Okamoto *et al.*, 2011). При этом как в трофобластической оболочке, так и в ВКМ происходит случайный выбор X-хромосомы для инактивации. Последовательность эпигенетических событий, сопровождающих инактивацию X-хромосомы у человека и кролика, вероятно, сходна с той, что наблюдается в эмбриогенезе мыши, однако их динамика, очевидно, должна быть иной.

Следует также отметить, что, несмотря на согласованность и строго определенную последовательность событий в процессе инактивации, репрессия транскрипции происходит индивидуально для каждого гена X-хромосомы. Период времени, в течение которого у разных генов прекращается транскрипция, после распространения РНК гена *Xist* по X-хромосоме занимает от нескольких часов до двух недель (Chow *et al.*, 2010; Patrat *et al.*, 2009), а некоторые гены вообще не подвергаются (избегают) инактивации. Различия в скорости репрессии транскрипции, вероятно, зависят от эффективности распространения и поддержания неактивного состояния в различных районах X-хромосомы, которые могут быть связаны с различиями в локальном контексте нуклеотидных последовательностей ДНК.

После того как на X-хромосоме установилось неактивное состояние, у большинства расположенных на ней генов наблюдается репрессия транскрипции.

Исключение составляют ген *Xist*, экспрессирующийся только с неактивной X-хромосомы, гены, чей статус экспрессии определяется импринтингом, и ряд избегающих инактивации генов, многие из которых имеют функциональные гомологи на Y-хромосоме и, следовательно, не нуждаются в дозовой компенсации (Аноприенко, Закиян, 2004; Carrel, Willard, 2005; Raefski, O'Neill, 2005).

1.2.2 Модификации хроматина неактивной X-хромосомы при импринтированной инактивации у сумчатых млекопитающих

Сумчатые являются наиболее древними млекопитающими, у самок которых происходит инактивация X-хромосомы. При этом на всех стадиях развития, во всех органах и тканях инактивация является импринтированной (Sharman, 1971). Импринтированная инактивация у сумчатых является неполной и тканеспецифичной (Cooper, 1971; VandeBerg *et al.*, 1973). Более того, у сумчатых не было найдено ортолога гена *Xist* (Davidow *et al.*, 2007; Hore *et al.*, 2007; Shevchenko *et al.*, 2007), что означает, что в процессе инактивации X-хромосомы задействован отличный от плацентарных механизм.

Неактивная структура X-хромосомы при импринтированной инактивации у сумчатых характеризуется, в первую очередь, утратой модификаций хроматина, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином (диметилированным H3K4, ацетилированными формами H3K9, H4K8, H4K16) (Zakharova *et al.*, 2011). Также происходит аккумуляция модификаций неактивного хроматина. Стабильно с неактивной X-хромосомой ассоциированы модификации, характерные для конститутивного гетерохроматина: триметилированные H3K9, H4K20 и гетерохроматиновый белком HP1. Тогда как аккумуляция триметилированного H3K27 зависит от стадии клеточного цикла, типа клеток и/или органа: обогащение триметилированного H3K27 на неактивной X-хромосоме наблюдается в поздней S- и ранней G2-фазах (Chaumeil *et al.*, 2011). Известно, что аккумуляция триметилированного H3K27 у плацентарных является *Xist*-зависимой (Mak *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003). Поскольку ортолога гена *Xist* у сумчатых не выявлено, то вероятно, что установление триметилированного H3K27 осуществляется иными механизмами, в которых не задействованы некодирующие РНК, тогда как

появление, в свою очередь, гена *Xist* у плацентарных привело к стабилизации данной модификации (Chaumeil *et al.*, 2011).

Таким образом, утрата модификаций гистонов, ассоциированных с транскрипционно активным состоянием хроматина, выявляется при импринтированной инактивации и у плацентарных и у сумчатых и, вероятно, отражает наиболее древнюю стадию процесса инактивации X-хромосомы. (Zakharova *et al.*, 2011). В то же время установление модификаций неактивного хроматина варьирует в зависимости от механизма процесса инактивации, вида и ряда других факторов.

1.2.3 Два типа факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы

Утрата модификаций хроматина, ассоциированных с транскрипционно активным хроматином, выявляется у всех млекопитающих (Rens *et al.*, 2010; Chaumeil *et al.*, 2002; Chadwick, Willard, 2003; Koina *et al.*, 2009), в то время как спектр и паттерн модификаций неактивного хроматина отличается у различных видов. Методом иммунофлуоресцентного анализа было показано, что модификации неактивного хроматина X-хромосомы у человека (Chadwick, Willard, 2004), коровы (Corroia *et al.*, 2008), полевки (Shevchenko *et al.*, 2009) распределены неравномерно вдоль X-хромосомы и формируют два типа гетерохроматина.

Первый тип гетерохроматина представлен триметилированным H3K27 и uH2A, а также ассоциацией с макроH2A1.2. Данный спектр модификаций локализован в районах, соответствующих G-негативным районам хромосом, т.е. в районах, обогащенных генами (Рисунок 4).

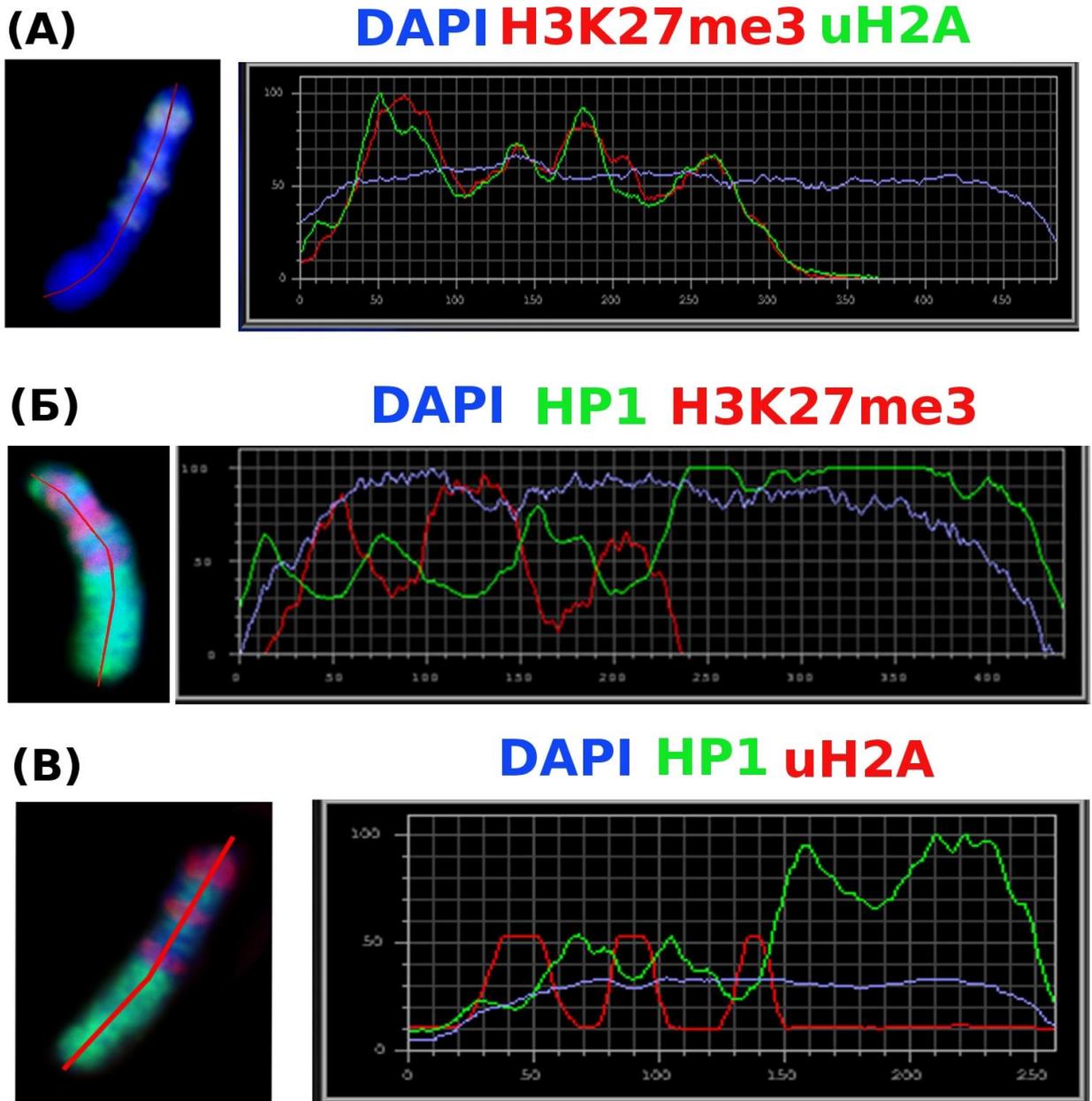


Рисунок 4. Распределение модификаций, характерных для двух типов факультативного гетерохроматина, на примере неактивной X-хромосомы в фибробластах полевки *M. levis* (Shevchenko *et al.*, 2009).

(А) Солокализация H3K27me3 (красный сигнал) и uH2A (зеленый сигнал), образующих факультативный гетерохроматин первого типа.

(Б) Чередование двух типов факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы, H3K27me3 (красный сигнал, гетерохроматин первого типа) и HP1 (зеленый сигнал, гетерохроматин второго типа)

Остальные пояснения к рисунку приведены на следующей странице.

Рисунок 4 (продолжение). Распределение модификаций, характерных для двух типов факультативного гетерохроматина, на примере неактивной X-хромосомы в фибробластах полевки *M. levis* (Shevchenko *et al.*, 2009).

(В) Чередование двух типов факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы, uH2A (красный сигнал, гетерохроматин первого типа) и HP1 (зеленый сигнал, гетерохроматин второго типа)

Слева показано распределение модификаций на X-хромосоме, справа приведено графическое представление распределения сигналов.

X-хромосомы окрашены DAPI (синий сигнал).

Второй тип гетерохроматина образован триметилированными H3K9, H4K20 и гетерохроматиновым белком HP1, и, наоборот, локализован в G-позитивных районах. Второй тип гетерохроматина характерен не только для факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы, но и для конститутивного.

Стоит также отметить, что у мыши структура неактивной X-хромосомы в соматических тканях образована гетерохроматином только первого типа, тогда как триметилированные H3K9, H4K20 и HP1 были детектированы только в районах конститутивного хроматина (Rens *et al.*, 2010).

Метод иммунофлуоресцентного окрашивания позволяет определить присутствие различных гистоновых модификаций на неактивной X-хромосоме, но его разрешение не достаточно для выявления распределения тех или иных форм гистонов на уровне отдельных генов, которые могут отличаться статусом экспрессии, а также для выявления компонентов хроматина, присутствующих в небольшом количестве. Более детально распределение ковалентных модификаций гистонов по активной и неактивной X-хромосомам у генов, отличающихся статусом экспрессии, исследовано с помощью метода иммунопреципитации хроматина. Так, например, было показано, что в эмбриональных фибробластах мыши и соматических клетках человека триметилированный H3K27 выявляется на неактивной X-хромосоме не только в районах промоторов генов, но и в их структурной части, при этом не детектируется на активной X-хромосоме. Тогда как диметилированный H3K9 обогащен только в промоторах генов неактивной X-хромосомы, и в структурных частях генов неактивной и активной X-хромосом и единственной X-хромосомы самца (Rougeulle *et al.*, 2004; Chadwick, 2007; Pauler *et*

al., 2009). В целом, данные экспериментов по иммунопреципитации хроматина свидетельствуют о том, что статус экспрессии гена определяется модификациями хроматина, главным образом, в промоторной области. Модификации гистонов, характерные для неактивного хроматина, устанавливаются на инактивированной X-хромосоме только у тех генов, которые подвергаются инактивации. Гены, избегающие инактивации, сохраняют модификации, свойственные активному хроматину. Следует также отметить, что репрессированные на активной X-хромосоме гены, например, ген *Xist*, имеют те же модификации хроматина, что и подвергающиеся инактивации гены на неактивной X-хромосоме.

1.3 Механизмы, обеспечивающие установление модификаций неактивного хроматина

До сих пор практически ничего не известно о том, каким образом при инактивации происходит утрата модификаций, характерных для активного хроматина. Гипоацетилирование гистонов H3 и H4 происходит на разных стадиях эмбрионального развития, на основании чего можно предположить, что в этих процессах задействованы различные механизмы (Chaumeil *et al.*, 2002). Восстановление ацетилирования гистонов на инактивированной X-хромосоме при использовании неспецифических ингибиторов деацетилаз показывает, что в гипоацетилировании гистонов при инициации инактивации и поддержании гипоацетилированного состояния гистонов на неактивной X-хромосоме могут участвовать гистондеацетилазы семейства HDAC (Csankovszki *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2008; Casas-Delucchi *et al.*, 2011).

Существуют два отдельных, но взаимодействующих между собой комплекса PRC1 и PRC2. PRC2 комплекс участвует в метилировании гистона H3K27 и, как правило, является первостепенным, обеспечивая сайты связывания для PRC1. PRC2 комплекс состоит из 3-х основных компонентов: гистонметилтрансферазы EZH2, а также белков SUZ12, содержащий домен типа цинковых пальцев, и EED (embryonic ectoderm development), содержащий повтор WD40, необходимые для стабильности данного комплекса и каталитической активности EZH2. Также было показано, что для аккумуляции EED и EZH2 на неактивной X-хромосоме необходимым и достаточным условием является

экспрессия гена *Xist* (Plath *et al.*, 2003; de Napoles *et al.*, 2004; Kohlmaier *et al.*, 2004). Аккумуляция макроH2A1.2, несмотря на то, что является одной из наиболее поздних модификаций хроматина, также зависит от транскрипта гена *Xist* (Csankovszki *et al.*, 1999) и от клеточного цикла (выявляется в S и G1 фазе).

PRC1 функционирует в качестве E3 лигазы, которая участвует специфически в моноубиквитинировании гистона H2A. PRC1 комплекс состоит из 4 единиц, содержащих E3 убиквитин лигазу (RING1A/RING1B или RING1B/RNF2). Убиквитинируется также макроH2A, содержащий домен, который специфически узнается убиквитин E3 лигазой, включающей белки SPOP и CULLIN3, которые, взаимодействуя, формируют E3 убиквитин-лигазу (Hernandez-Munoz *et al.*, 2005).

Следует отметить, что связь неактивной X-хромосомы с PRC2 и PRC1 является временной и наблюдается только в раннем эмбриогенезе. Какие ферменты и комплексы отвечают за поддержание триметилированного H3K27 и uH2A в соматических клетках до конца неизвестно. Существует предположение, что поддержание данных модификаций происходит с помощью тех же комплексов PRC, которые в ядре дифференцированных клеток содержатся в околядрышковом районе, куда неактивная X-хромосома перемещается на время репликации (Hernandez-Munoz *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007).

Комплекс PRC1 содержит домен, узнающий триметилированный H3K27. В связи с этим принято считать, что сначала на неактивной X-хромосоме мыши появляется триметилированный H3K27, который узнается комплексом PRC1, осуществляющим убиквитинирование H2A (de Napoles *et al.*, 2004; Plath *et al.*, 2004). Однако позже было установлено, что при запуске случайной инактивации в эмбриональных стволовых клетках убиквитинирование H2A на неактивной X-хромосоме может происходить независимо от комплекса PRC2 и триметилированного H3K27 (Schoeftner *et al.*, 2006).

Остается неизвестным, каким образом и с участием каких ферментов происходит формирование факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы, содержащего триметилированный H3K9 и гетерохроматиновый белок HP1. Роль белков HP1 в сайленсинге генов заключается в привлечении к сайтам связывания на хроматине DNMT, которые метилируют ДНК и тем самым регулируют транскрипцию (Smallwood *et al.*, 2007). В геноме млекопитающих

существуют три гена, кодирующих HP1 – альфа, бета и гамма. Для формирования сайта связывания белка HP1 с хроматином необходимо наличие триметилированного H3K9 (Bannister *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Наличие HP1 белка в прицентромерном гетерохроматине обеспечивается гистон-метилтрансферазой HMT Suv(3)9h1, которая, с одной стороны, триметилирует хроматин по H3K9 и создает сайт взаимодействия (Aagaard *et al.*, 1999; Rea *et al.*, 2000; Krouwels *et al.*, 2005), а с другой стороны, физически взаимодействует с одним из белков HP1 – HP1 альфа. (Yamamoto, Sonoda, 2003). Существует другая метилтрансфераза SETDB1 (SET Domain Bifurcation1), которая выявляется при локализации белка HP1 вне центромерных районов. Недавно в системе *in vivo* было показано, что гетерохроматин формируется при взаимодействии HMT, SETDB1 и HP1, причем было обнаружено, что, связавшись с H3K9me3, HP1 привлекает дополнительно SETDB1 в сайт гетерохроматизации, в результате чего происходит распространение гетерохроматинового состояния (Verschure *et al.*, 2005).

За диметилирование H3K9 может отвечать метилтрансфераза G9a. Показано, что в эмбриональных стволовых клетках, мутантных по гену *G9a*, уровень диметилированного H3K9 снижается. Однако даже в отсутствие данной мутации неактивное состояние X-хромосомы нормально устанавливается и поддерживается (Ohhata *et al.*, 2004; Rougeulle *et al.*, 2004).

Монометилирование H4K20 зависит от стадии клеточного цикла и выявляется на неактивной X-хромосоме в течение поздней S-фазы и митоза (Oda *et al.*, 2009), что согласуется с экспрессией единственно известной H4K20-монометилтрансферазой Pr-SET7 (Oda *et al.* 2009).

В заключение можно отметить, что неактивное состояние X-хромосомы в соматических клетках является высокостабильным, и частота случайной реактивации составляет $<10^{-8}$ (Heard, 2005). Нарушение отдельных модификаций практически не увеличивает частоту реактивации. Одновременное нарушение нескольких модификаций X-хромосомы: метилирования ДНК, гипоацетилирования гистонов и экспрессии гена *Xist* – не приводит к облигатной реактивации X-хромосомы, а лишь увеличивает вероятность этого события (Csankovszki *et al.*, 2001).

1.4 Мейотическая инактивация половых хромосом как возможный предковый механизм процесса импринтированной инактивации X-хромосомы

До сих пор остается невыясненным вопрос о природе импринтинга, т.е. почему на ранних стадиях предимплантационного эмбриона инактивации подвергается именно X-хромосома, унаследованная от отца. Существование импринтинга означает, что X-хромосомы, унаследованные от матери (Xm) и отца, эпигенетически не однородны. Существуют две основные гипотезы. Первая гипотеза предполагает существование эпигенетического маркирования (импринтинга), защищающего от инактивации X-хромосому, унаследованную от матери. Вторая гипотеза предполагает, что Xp предрасположена к инактивации, так как переходит в зиготу уже в преинактивированном состоянии в результате процесса MSCI в сперматогенезе у самцов (Рисунок 5).

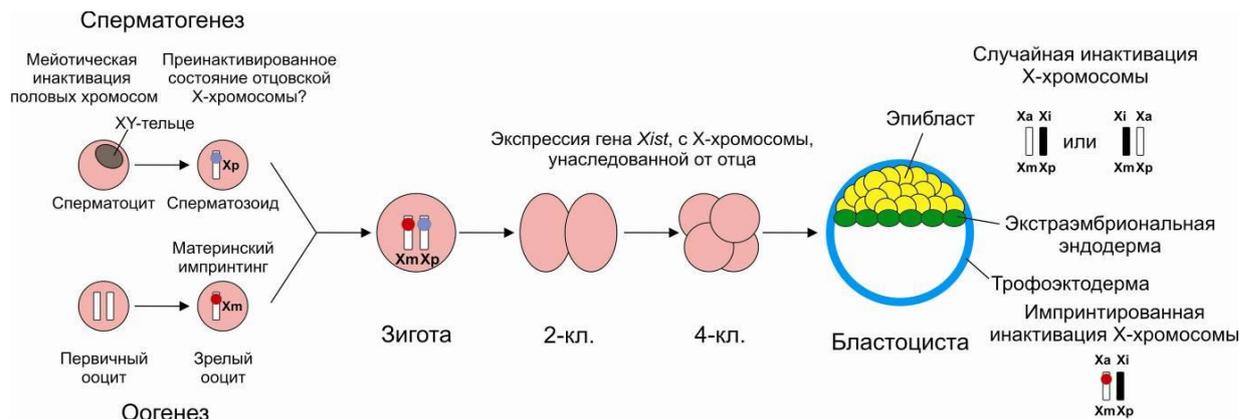


Рисунок 5. Гипотезы природы импринтинга X-хромосомы, унаследованной от отца. Пояснения даны в тексте.

В настоящее время получены неопровержимые доказательства того, что Xm эпигенетически защищена от инактивации. Эксперименты по переносу ядер в энуклеированный ооцит показали, что у эмбрионов мыши, имеющих генотип XmXmY или XmXmXp, ни одна из Xm не способна к инактивации, в результате чего у таких эмбрионов не развиваются экстраэмбриональные органы и они гибнут на ранних стадиях развития (Goto, T., Kinoshita, 1999; Ooi, Henikoff, 2007). Результаты другого эксперимента по переносу ядер указывают на то, что Xp действительно может быть предрасположена к инактивации. Мыши с генотипом

ХрО жизнеспособны, однако у них наблюдается задержка в раннем развитии, которая связана с более низкой экспрессией генов с Хр, имеющей преинактивированное состояние (Heard, Distechе, 2006). Таким образом, импринтинг Хm более строгий, и его нарушение вызывает гибель эмбрионов, тогда как нарушение импринтинга Хр если и имеет негативные последствия для эмбрионального развития, то, по крайней мере, не является летальным. Основным контраргументом против предположения о преинактивированном состоянии Хр являются данные о том, что аутосомы, содержащие встройку гена *Xist*, наследующиеся от отца, но предварительно не вовлекавшиеся в MSCI, демонстрируют сходную с процессом импринтированной инактивации динамику модификаций хроматина (Goto, Y., Takagi, 1998). В связи с этим следует заметить, что неактивная структура хроматина Хр, устанавливающаяся у плацентарных млекопитающих в результате экспрессии гена *Xist*, формируется не мгновенно, а занимает как минимум промежуток от двухклеточной стадии до стадии бластоцисты (Шевченко и др., 2006). Более того, показано, что, по крайней мере у мыши, процесс импринтированной инактивации происходит в два этапа. Так, начиная с двухклеточной стадии вплоть до стадии морулы или даже бластоцисты, неактивными являются районы повторов Хр. Данный этап процесса импринтированной инактивации является *Xist*-независимым. Следующий этап импринтированной инактивации Х-хромосомы инициируется соответственно на стадии морулы/бластоцисты и включает в себя *Xist*-зависимый сайленсинг генов Х-хромосомы (Namekawa *et al.*, 2010). Поэтому, не исключено, что во время, пока зависимые от экспрессии *Xist* модификации хроматина устанавливаются на Хр, ее неактивное состояние может поддерживаться за счет модификаций хроматина, приобретенных в MSCI. Следует также подчеркнуть, что неактивное состояние Хр у сумчатых устанавливается в отсутствие гена *Xist*, а, следовательно, существует *Xist*-независимый механизм инактивации, в качестве которого может выступать мейотическая инактивация Х-хромосомы в мейозе у самцов, и который можно рассматривать как предковую форму процесса импринтированной инактивации Х-хромосомы у самок млекопитающих. Очевидно, что однозначного ответа о природе импринтированной инактивации до сих пор не существует, и этот вопрос требует дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день изучаются различные аспекты процесса инактивации X-хромосомы, в частности, роль модификаций хроматина в сайленсинге X-хромосомы. Многочисленные исследования направлены на анализ динамики модификаций хроматина, распределения их на цитогенетическом и геномных уровнях и их роли в процессе инактивации. Так, представлена достаточно полная картина по динамике модификации хроматина в онтогенезе самок млекопитающих, для отдельных модификаций показана их локализация вдоль неактивной X-хромосомы, и для большинства модификаций хроматина показана их роль в установлении транскрипционно неактивного статуса X-хромосомы. Однако до сих пор основными неизученными вопросами остаются: распределение на неактивной X-хромосоме модификаций гистонов в процессе импринтированной инактивации и природа данной формы инактивации, также нет полной картины по распределению модификаций в процессе случайной инактивации. Изучение модификаций хроматина у разных видов млекопитающих позволяет внести существенный вклад в решение данных вопросов, а также провести сравнительный анализ с уже известными данными, выявить общие закономерности и отличительные особенности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Модификации неактивного хроматина, ассоциированные с X-хромосомой на мейотических и постмейотических стадиях сперматогенеза, были исследованы у самцов полевки *M. levis*. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в ТС клетках самок были изучены у двух видов грызунов: полевки *M. levis* и мыши *M. musculus*. Линии ТС клеток полевки *M. levis* были получены в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Линия ТС клеток мыши (полученная от гибридной самки от скрещивания двух линий мышей: C57B16 и CBA) была любезно предоставлена проф. Нейлом Брокдорфом (Neil Brockdorff, Department of Biochemistry, Oxford University, UK). Модификации хроматина при случайной инактивации X-хромосомы были исследованы на культуре клеток линии эмбриональных фибробластов, полученных от самок крысы линии WAG в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН.

2.2. Методы работы с клеточными культурами

2.2.1. Состав культуральных сред и условия культивирования

Ростовая среда для ТС клеток:

- 1) RPMI 1640 (Life Technologies)
- 2) 20% эмбриональной бычьей сыворотки (Life Technologies)
- 3) 1мМ раствор пирувата натрия (Life Technologies)
- 4) 2мМ L-глутамин (Life Technologies)
- 5) 50 мг/мл пенициллина (Life Technologies)
- 6) 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies)
- 7) 0,1 мМ β-меркаптоэтанол (Life Technologies)
- 8) 25 нг/мл фактора роста фибробластов 4 (FGF4, Sigma)
- 9) 1 мкг/мл гепарина (Sigma)

Ростовая среда для эмбриональных фибробластов:

- 1) 44% среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Life Technologies)

- 2) 44% среды F12 (Nutrient Mixture) (Life Technologies)
- 3) 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Life Technologies)
- 4) 1мМ L-глутамин (Life Technologies)
- 5) 50 мг/мл пенициллина (Life Technologies)
- 6) 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies)

Клетки культивировали при 37⁰С в атмосфере 5% углекислого газа. Пересев ТС клеток и фибробластов производили каждые 3-4 дня, в зависимости от плотности клеток. Клетки промывали буфером PBS (1 М NaH₂PO₄, 1 М Na₂HPO₄, рН 7,2), после чего добавляли 0,05 % для ТС клеток и 0,25% для фибробластов раствор трипсина (Life Technologies) соответственно. Через 2-3 мин. трипсин нейтрализовали ростовой средой, ресуспендировали клетки и переносили суспензию в новую культуральную емкость в соотношении от 1:3 до 1:5. Для ТС клеток культуральную поверхность предварительно обрабатывали раствором 0,1% желатина 10 мин. при комнатной температуре и высаживали слой фидера с плотностью 10⁴/см².

2.2.2. Получение культур клеток

2.2.2.1. Получение первичных эмбриональных фибробластов мыши и крысы

Из рогов матки животных выделяли эмбрионы на 12–14 д.п.о. Промывали в буфере PBS, удаляли голову и печень. Измельчали ткани в небольшом количестве раствора трипсина. Полученные измельченные ткани эмбрионов инкубировали в 3–4 мл раствора трипсина в СО₂ инкубаторе 20 минут. После инактивировали действие трипсина ростовой средой для получения и культивирования первичных эмбриональных фибробластов, центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин, удаляли супернатант, ресуспендировали клетки в той же ростовой среде и переносили в культуральный матрас (из расчета 1 эмбрион на 50–75 см²).

2.2.2.2 Получение митотически инактивированных эмбриональных фибробластов

В качестве питающего субстрата для ТС клеток мыши и полевки использовали эмбриональные фибробласты мыши. Для остановки (инактивации) митотических делений монослой клеток эмбриональных фибробластов мыши на 3–4 пассаже обрабатывали раствором митомицина С (Sigma) в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 2 часов, после чего клетки отмывали три раза буфером PBS.

2.2.2.3. Получение ТС клеток полевки

Получали ТС клетки полевки по ранее описанному протоколу (Tanaka *et al.*, 1998). На 3,5 д.п.о. из матки полевки *M. levis* минимальной средой M2 (Sigma) вымывали бластоцисты и помещали индивидуально в лунки 4-ячеечного планшета с заранее посаженными митотически инактивированными эмбриональными фибробластами, в ростовую среду для ТС клеток. Для дальнейшего прикрепления бластоцист блестящую оболочку снимали при помощи инкубации в растворе Тироды (Millipore) в течение 1–2 минут и высаживали. На 3–6 день после посадки бластоцист разросшуюся клеточную массу промывали PBS, ферментативно дезагрегировали с помощью 0,1% раствора трипсина в течение 5 мин при 37⁰С. Дезагрегированную клеточную массу переносили на новую культуральную емкость

2.2.3. Замораживание клеток

Для заморозки клетки снимали, как при пересадке, центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин., супернатант сливали. Для фибробластов добавляли раствор, содержащий 10% ДМСО и 90% ростовой среды, а для ТС клеток - 10% ДМСО и 90% FBS. Осадок аккуратно ресуспендировали и заливали суспензию в ампулы для заморозки клеток. Для медленного замораживания клеток ампулы в специальных боксах с изопропанолом помещали кельвинатор на -70⁰С. Для хранения ампулы с клетками переносили в жидкий азот.

2.2.4. Размораживание клеток

Ампулы с клетками быстро размораживали при 37 °С. Суспензию клеток переносили в коническую пробирку с культуральной средой, центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в ростовой среде и переносили в культуральную емкость.

2.3. Приготовление препаратов метафазных хромосом

За 30-40 мин. до снятия метафазных клеток к ТС клеткам и эмбриональным фибробластам добавляли колхицин до конечной концентрации 0,1 мкг/мл. Метафазные клетки собирались в коническую пробирку с культуральной средой или PBS и центрифугировались при 1000 об/мин. 5 мин. Осадок клеток гипотонировали в растворе 0,2% KCl/0,2% цитрата натрия 1 мин. при комнатной температуре. 100 мкл суспензии гипотонированных клеток подвергались цитоцентрифугированию (Cytospin 2, Shandon) при 1000 об/мин. 10 мин. Полученные препараты обрабатывали 0,05% Triton X-100 при 4⁰С в течение 3-4 мин., промывали в PBS, фиксировали в 4% формальдегиде 10 мин. при комнатной температуре и отмывали в PBS 2 раза по 5 мин.

2.4 Приготовление препаратов мейотических и постмейотических стадий сперматогенеза

Семенные каналцы из самцов полевки *M. levis* в возрасте 30-40 дней были диссектированы на льду в растворе PBS до однородной суспензии. Осадок клеток гипотонировали в растворе 0,2% KCl/0,2% цитрата натрия 1 мин. при комнатной температуре. 100 мкл суспензии гипотонированных клеток подвергались цитоцентрифугированию (Cytospin 2, Shandon) при 1000 об/мин. 10 мин. Полученные препараты обрабатывали 0,05% Triton X-100 при 4⁰С в течение 3-4 мин., промывали в PBS, фиксировали в 4% формальдегиде 10 мин. при комнатной температуре и отмывали в PBS 2 раза по 5 мин.

2.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер и метафазных хромосом

Препараты метафазных хромосом инкубировали при комнатной температуре 30 мин. с блокирующим буфером (10 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина в PBS), 2 часа с первыми антителами при комнатной температуре (или ночь при 4⁰C) и 40 мин. со вторыми антителами. Первые и вторые антитела, использованные в данной работе, приведены в Таблице 1. От не связавшихся антител препараты отмывали при комнатной температуре 2 раза по 10 мин. в PBS. Для общего окрашивания препаратов использовался DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories). Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе NIKON X100 с помощью программного обеспечения фирмы Imstar. Для каждой модификации хроматина было проанализировано не менее 100 метафазных пластинок.

Таблица 1 Характеристика первых и вторых антител, используемых при иммунофлуоресцентном окрашивании

Антитела	Тип	Источник	Каталожный номер	Разведение
Первые антитела				
Anti SCP3	Rabbit polyclonal	Abcam	ab15093	1:300
Anti H3K9me3	Mouse monoclonal	Abcam	ab6001	1:200
Anti H3K9me3	Rabbit polyclonal	Upstate (Millipore)	07-442	1:200
Anti H3K27me3	Rabbit polyclonal	Upstate (Millipore)	05-851	1:500
Anti HP1 γ	Mouse monoclonal	Upstate (Millipore)	05-689	1:300
Anti HP1-beta	Rat monoclonal	Abcam	ab10811	1:5
Anti H4K20me3	Rabbit polyclonal	Abcam	Ab9053	1:500
Anti ubiquitin-protein conjugates (FK2)	Mouse monoclonal	BIOMOL International, LP	PW 8810	1:300
Anti EED	Mouse monoclonal	Подарок А.		1:100

		Otte		
Вторые антитела				
Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed	Made in goat	Molecular Probe (Invitrogen)	A11031	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L) highly cross adsorbed	Made in goat	Molecular Probe (Invitrogen)	A11029	1:400
Alexa Fluor 568 goat anti rabbit IgG (H+L)	Made in goat	Molecular Probe (Invitrogen)	A11011	1:400
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	Made in goat	Molecular Probe (Invitrogen)	A11008	1:400
Alexa Fluor 488 anti rat IgG (H+L)	Made in goat	Molecular Probe (Invitrogen)	A11006	1:400

2.6 ДНК флуоресцентная гибридизация *in situ*

В качестве зонда для детекции половых хромосом полевки *M. levis* использовали повтор MS4, специфичный для гетерохроматина половых хромосом обыкновенных полевок, меченного биотином-16-dUTP (Roche). Для детекции X-хромосомы мыши использовали соответствующую библиотеку X-хромосомы мыши, любезно предоставленную Ириной Соловей.

ДНК флуоресцентную *in situ* гибридизацию проводили после иммунофлуоресцентного окрашивания. Препараты метафазных хромосом предварительно фиксировали в 4% формальдегиде 10 мин. при комнатной температуре и отмывали в PBS 2 раза по 5 мин. Затем стекла обрабатывали в 0.1 M HCl/0.7% Triton X-100 10 мин. на льду и денатурировали в 70% растворе формамида/2xSSC при 70°C в течение 20 мин. Препараты инкубировали с зондом в водяной бане при 37°C в течение ночи (для мыши – в течение двух ночей). Отмывали препараты четырежды в 50% формамиде/2x SSC при 45°C, после 4 раза в 2x SSC при 40°C и переносили в 4x SSC, 0,1% Tween 20. Детекцию проводили с помощью стрептавидин-Cy3 или флуоресцеин-авидин/анти-авидин системы (Vector Laboratories). От несвязавшихся антител препараты отмывали при 37°C 3 раза по 2 мин. в 4xSSC/0,1% Tween-20.

Для общего окрашивания препаратов использовался DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories). Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе NIKON X100 с помощью программного обеспечения фирмы Imstar.

2.6 Выделение РНК

РНК была выделена из клеток, снятых с помощью трипсина с помощью TRI REAGENT (Sigma) согласно инструкции фирмы производителя. Осадок клеток, собранных с культуральной емкости гомогенизировали пипетированием в 1 мл раствора TRI REAGENT до полного лизиса. К лизату добавляли 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивали в течение 15 сек. и оставляли на 2-15 мин. при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 15 мин. при 12000×g и 4°C. Верхнюю водную фазу с РНК переносили в чистую пробирку. Добавляли 0,5 мл 100% изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5-10 мин. РНК осаждали центрифугированием 10 мин. при 12000×g и 4°C. Супернатант отбирали, осадок РНК дважды промывали 75% этанолом, затем подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды.

Для очистки образцов РНК от контаминаций ДНК использовали набор реагентов TURBO DNA-free (Ambion). К полученному раствору РНК добавляли 0,1 объема 10×DNAaseI буфера, 2 ед. DNAaseI и инкубировали 30 мин. при 37°C. Затем к смеси добавляли 0,1 объема DNAase Inactivation Reagent, инкубировали 2 мин. при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин. при 11500 об/мин. Супернатант, содержащий РНК, переносили в свежую пробирку и хранили при -70°C.

2.7. Синтез кДНК методом обратной транскрипции

Для проведения одной реакции обратной транскрипции (20 мкл) смешивали:

- 1) РНК – 2 мкг;
- 2) random decamer primer (Invitrogene) – 50 пмоль;
- 3) бидистиллированная H₂O - до 10 мкл.

Полученную смесь инкубировали 2 мин. при 70°C, затем переносили в лед на 2 мин. Быстро центрифугировали и возвращали на лед. После чего добавляли

оставшиеся реагенты:

- 4) смесь dNTP (Sigma) по 10 мМ каждого – 4 мкл;
- 5) 5×RT-буфер (Invitrogene) – 4 мкл;
- 6) обратную транскриптазу M-MLV (Promega) – 1 мкл (чтобы выявить присутствие контаминаций ДНК ставили контрольную реакцию, в которую вместо фермента добавляли воду);
- 7) ингибитор РНКазы RNAsine (Promega) – 1 мкл.

Смесь инкубировали 60 мин. при 42°C, затем 10 мин. при 94°C для инактивации обратной транскриптазы и хранили на -20°C.

2.8. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для проведения одной реакции смешивали:

- 1) смесь dNTP (Sigma) по 10 мМ каждого – 1 мкл;
- 2) 10×ПЦР буфер (100мМ KCl; 200мМ Трис-HCl, pH 8,8; 100 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,1% Triton X-100) - 5 мкл;
- 3) Раствор MgCl₂ (25 мМ) – 3-12 мкл в зависимости от пары праймеров;
- 4) кДНК – 2 мкл;
- 5) Taq-полимеразу (5 ед/мкл) (Медиген) – 0,5 мкл;
- 6) праймеры (10 мМ) - по 2,5 мкл (Таблица 2);
- 7) бидистиллированная H₂O - до 50 мкл.

Реакцию проводили на амплификаторе Biometra TRIO-Thermoblock. После прогрева 5 минут при 95°C выполняются 35 следующих циклов: 20 секунд при 94 °C, 45 секунд при 52–63 °C, 2 минуты при 72 °C.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров и условия реакций амплификации:

Праймеры и условия их использования (Таблица 2) (Grigor'eva *et al.*, 2009).

Гены	Последовательность нуклеотидов	Праймеры	Длина ПЦР продукта, п.о.	Концентрация ионов Mg ²⁺ , mM	Температура отжига °C	Регистрационный номер в базе данных
<i>β-actin</i>	gacggggtcaccacactgt gagtacttgcgctcaggaggag	β-actin-1 β-actin-2	523	2	55	—
<i>Oct4</i>	ccaagctgctgaagcagaaga tttgaatgcatgggagagcccag	OCT4-2F OCT-5R	631	4	53	EF030115
<i>Nanog</i>	tccataacttcggggagga tcacagagtagttcaggaata	NanogF NanogR	156	4	52	EU285611
<i>Sox2</i>	tccatgaccagctcgcagaccta c ccccccattccctgtttctct	Sox2F Sox2R2	392	3	60	EU285607
<i>Fgf2r</i>	tcttgttcttcaggggacgattc atgcttcccactatttactcctctg	FGFR2F 2 FGFR2R 3	242	3	60	DQ517964
<i>Cdx-2</i>	ccaccatgtacgtgagctacc gactgagcgtgtccaagtt	cdx2f1 cdx2r2	184	3	60	DQ517966
<i>Eomes</i>	attgtccctggaggtcggta gaaggtcgggtcagggtaat	Eom8F Eom6R	316	3	56	EU285608
<i>Errβ</i>	agctgcggtccttcatcaag cttgacttctggcggcctcc	ERRB1F ERRB4R	543	1,5	63	DQ517967
<i>Pl-1</i>	tccagagaatcgagaggaagt acaactcggcacctcaagac	csh1f1 csh1r2	383	3	60	DQ517968
<i>Hand1</i>	ccccatgctccacgaacc aactccctttccgcttgc	Hand1F1 Hand1R4	467	3	58	EU285606
<i>Tpbp</i>	aaacagccactgtgccattg gtaaggttttattagtgtgaacat	tnbp3f tnbp7r	214	2	60	DQ517965
<i>Foxa2</i>	ccctacgccaatatgaactccat g gttctgccggtagaaggga	Foxa2F1 Foxa2R2	220	3	60	EU285609
<i>Hnf4</i>	ggtaagctacgaggacagc agaagatgatggctttgagg	Hnf4F1 Hnf4R5	460	3	60	EU285605
<i>Gata6</i>	caccatcatcaccaccgacctac cagggccagagcacaccaagaatc	Gata6F Gata6R	788	3	60	EU285604
<i>Sall4</i>	tcaccaacgccgtcatgttacag c ggtgggctgtgctcggataaatg t	Sall4F Sall4R	604	3	60	EU285610
<i>Xist</i>	ttgctcagattagctag gtgattaattcattctatct	MSX27 MSX19	765	3	55	AJ310130
<i>Tsix</i>	ccatgtgacattgctgatgaaacc ctctcctgcgctccctcac	SNTF SNTR	411	2	60	-

2.9 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК разделяли в 1-1,5% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE (40 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 20 мМ ацетат натрия; 1 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия (0,01 мкг/мл). В гель наносили образцы, содержащие 0.3-0.5 мкг ДНК, с добавлением 0,1 объема буфера, содержащего 15% фикола и 0,025% ксиленцианола. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 3-7 В/см. После электрофореза гель фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью BabyImager.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификации неактивного хроматина при различных формах инактивации X-хромосомы исследовали с помощью иммунофлуоресцентного анализа у трех видов грызунов: обыкновенной полевки *M. levis*, домашней мыши *M. musculus* и крысы *R. norvegicus*.

Диплоидный набор *M. levis* $2n=54$ хромосомы, X-хромосома данного вида это крупная акроцентрическая хромосома и содержит крупный блок гетерохроматина.

Диплоидный набор *M. musculus* $2n=40$ хромосом, X-хромосома – крупная акроцентрическая хромосома.

Диплоидный набор *R. norvegicus* $2n=42$ хромосом, X-хромосома – также акроцентрическая хромосома.

Исследовали следующие модификации неактивного хроматина: триметилированный H3K9, триметилированный H4K20, триметилированный H3K27 и uH2A, а также гетерохроматиновый белок HP1 (γ и β изоформы). Для исследований был выбран данный спектр модификаций хроматина поскольку, ранее была показана их вовлеченность в формирование неактивной структуры хроматина X-хромосомы у ряда представителей млекопитающих. Причем, было показано, что данные модификации формируют два различных типа гетерохроматина (Duthie *et al.*, 1999; Chadwick, Willard, 2004; de Napoles *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Kohlmaier *et al.*, 2004). Так, первый тип гетерохроматина включает в себя триметилированный H3K27 и uH2A, которые выявляются преимущественно в G-негативных бэндах X-хромосомы. Второй тип гетерохроматина представлен триметилированными H3K9, H4K20 и HP1 и характерен для G-позитивных районов неактивной X-хромосомы и конститутивного гетерохроматина.

3.1 Модификации неактивного хроматина X-хромосомы в составе полового тельца в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга у полевки *M. levis*

Анализ модификаций неактивного хроматина, ассоциированных с X-хромосомой на различных стадиях сперматогенеза у *M. levis* было проведено с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания мейотических препаратов антителами к: триметилированным формам H3K9, H4K20 и H3K27, а также к uH2A и гетерохроматиновому белку HP1 (γ и β изоформам). Для приготовления мейотических препаратов использовали материал, полученный из семенников самцов *M. levis* в возрасте 30-40 дней.

В результате, было показано, что на стадии пахитены, несмотря на то, что половые хромосомы полевки *M. levis* не конъюгируют (Borodin *et al.*, 1995) происходит формирование структуры, характеризующейся более конденсированным хроматином на периферии ядра, т.е. полового тельца, солокализуемой с районом обогащения ряда модификаций неактивного хроматина (Рисунок 6А, Б). Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в составе хроматина полового тельца наблюдалось обогащение триметилированного H3K9, uH2A и HP1¹. Соответствие данной структуры половому тельцу подтверждается также ДНК FISH анализом с зондом на повтор MS4. Повтор MS4 гибридизуется на Y-хромосоме в прицентромерном и прителомерном районах и на X-хромосоме – в блоке гетерохроматина (Elisaphenko *et al.*, 1998). Было показано, что сигнал повтора MS4 на X-, и Y-хромосомах солокализуется с районом конденсированного хроматина на периферии ядра и обогащением модификаций неактивного хроматина. Окрашивание мейотических препаратов антителами к SCP3 (synaptonemal complex protein 3) – осевого элемента синаптонемного комплекса мейотических хромосом позволило дополнительно маркировать стадию пахитены мейоза, когда имеет место MSC1 (Рисунок 6б', 6б'').

¹ Здесь и далее, если не указана конкретная изоформа гетерохроматинового белка HP1, значит результаты справедливы для обеих изоформ. Иллюстрации приведены для γ изоформы белка HP1.

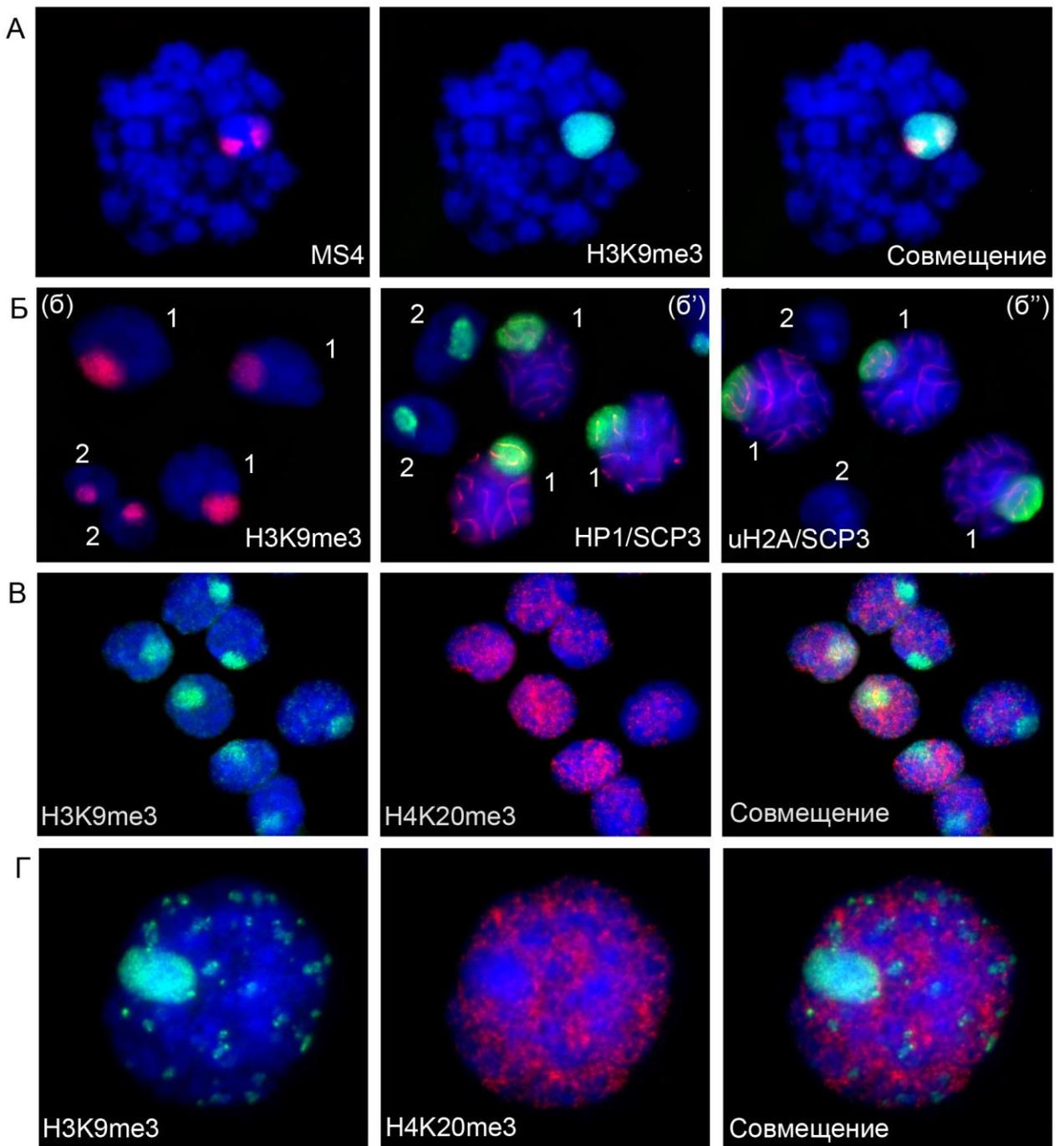


Рисунок 6. Модификации неактивного хроматина X- и Y-хромосом на мейотических и постмейотических стадиях сперматогенеза у полевки *M. levis*.

(А). Флуоресцентная *in situ* гибридизация с зондом на повтор MS4 совместно с иммуофлуоресцентным окрашиванием мейотических препаратов антителами к триметилированному H3K9;

(Б) (б) Иммуофлуоресцентное окрашивание мейотических препаратов антителами к триметилированному H3K9.

Остальные пояснения к рисунку приведены на следующей странице.

Рисунок 6. (продолжение). Модификации неактивного хроматина X- и Y-хромосом на мейотических и постмейотических стадиях сперматогенеза полевки *M. levis*.

(Б) Коиммунофлуоресцентное окрашивание мейотических препаратов антителами к белку SCP3 (красный) – осевого элемента синаптонемного комплекса и (б') HP1 (зеленый) и (б'') uH2A (зеленый). Цифрой (1) обозначены ядра на стадии пахитены мейоза; цифрой (2) – ядра на постмейотических стадиях сперматогенеза.

На панели (В) представлена общая панорама иммунофлуоресцентного окрашивания мейотических препаратов антителами к триметилированному H4K20.

На панели (Г) продемонстрировано коиммунофлуоресцентное окрашивание антителами к триметилированному H3K9 (зеленый) и триметилированному H4K20 (красный), демонстрирующее исключение триметилированного H4K20 из района половых хромосом. Для общего окрашивания ядер использовали DAPI.

На постмейотических стадиях сперматогенеза – на стадии округлых сперматид, несущих уже гаплоидный набор хромосом, вследствие чего они легко идентифицируются на препаратах благодаря сравнимо меньшему размеру ядра, с X- и Y-хромосомами остаются ассоциированы триметилированный H3K9 и HP1, тогда как uH2A на данной стадии не детектируется (Рисунок 6Б).

Также стоит отметить, что ни на мейотических, ни на постмейотических стадиях сперматогенеза мы не обнаружили обогащения в районе половых хромосом триметилированных H3K27 (иллюстрация не приведена) и H4K20 (Рисунок 6В). Более того, большинство ядер характеризовалось исключением данных модификаций из районов половых хромосом (Рисунок 6В, Г).

Таким образом, полученные данные говорят о том, что у полевки *M. levis* на стадии пахитены мейоза имеет место процесс MSCI. X-хромосома в составе полового тельца характеризуется ассоциацией с триметилированным H3K9, uH2A и HP1. При этом триметилированный H3K9 и HP1 участвуют также в формировании PMSC.

В целом, общая картина спектра и динамики установления/исключения модификаций неактивного хроматина полового тельца у самцов *M. levis* согласуется с известными литературными данными по мышам, сумчатым, человеку и крысе (Khalil *et al.*, 2004; Greaves *et al.*, 2006; Godmann *et al.*, 2007, Namekawa *et al.*, 2007), что говорит о консервативности данного процесса.

У полевки *M. levis* на постмейотических стадиях сперматогенеза мы не детектировали uH2A. Однако для мыши на данной стадии сперматогенеза также было описано снижение уровня uH2A в половом хроматине, тогда как на стадии элонгации сперматид, предшествующей замене гистонов на протамины, происходит новая волна убиквитинирования гистона H2A (Baarends *et al.*, 2005). Мы полагаем, что у полевки, учитывая консервативность процесса MSCI, данная модификация, вероятно, также может устанавливаться на стадии элонгации сперматид подобно мыши.

Известно также, что, несмотря на то, что в процессе MSCI с X-хромосомы выявляется экспрессия гена *Xist*, тем не менее, для инициации сайленсинга и поддержания неактивного состояния половых хромосом транскрипт гена *Xist* не является необходимым (McCarrey *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002). В связи с этим стоит отметить, что аккумуляция *Xist*-зависимого триметилированного H3K27 в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга половых хромосом даже при наличии транскрипта гена *Xist*, не происходит. Можно предположить, что на данных этапах сперматогенеза для репрессии транскрипции генов половых хромосом требуется определенная комбинация модификаций хроматина, не включающая *Xist*-зависимые.

Таким образом, структура неактивного хроматина половых хромосом при мейотическом сайленсинге у полевки *M. levis* представлена уникальной комбинацией маркеров гетерохроматина первого типа – uH2A и второго типа – триметилированного H3K9 и HP1. В постмейотическом половом хроматине сохраняются, по крайней мере, триметилированный H3K9 и HP1.

3.2 Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у полевки *M. levis*

Трофобластные стволовые клетки и клетки экстраэмбриональной эндодермы представляют собой две экстраэмбриональные клеточные линии, где происходит процесс импринтированной инактивации X-хромосомы (Takagi, Sasaki, 1975; Kunath *et al.*, 2005). Первичный процесс дифференцировки, происходящий на стадии поздней морулы, приводит к обособлению наружного слоя клеток –

трофоэктодермы, из которой при культивировании появляются трофобластные стволовые клетки, и образованию внутренней клеточной массы. Вторая волна дифференцировки происходит, когда ВКМ подразделяется на эпибласт и примитивную эндодерму (экстраэмбриональную эндодерму). Таким образом, ТС клетки представляют собой наиболее раннюю клеточную популяцию предимплантационного эмбриона и, вероятно, отражают начальные этапы процесса импринтированной инактивации.

3.2.1 Получение и анализ линии ТС клеток полевки *M. levis*

Ранее в лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН были получены и охарактеризованы линии ТС клеток полевки *M. levis* (Grigor'eva *et al.*, 2009). Однако данные линии были получены без использования факторов FGF4 (fibroblast growth factor 4) и гепарина, являющихся необходимыми для мыши. У мыши фактор FGF4, связавшись с гепарином, активирует поверхностный рецептор *Fgfr2*, в результате происходит запуск сигнального пути, благодаря которому ТС клетки поддерживают недифференцированное состояние и способность к неограниченной пролиферации (Tanaka *et al.*, 1998). Чтобы исключить вероятность того, что особые условия получения и культивирования ТС клеток полевки окажут влияние на структуру хроматина и/или распределение модификаций неактивного хроматина, необходимо было получить новые линии ТС клеток самок *M. levis* согласно стандартному протоколу получения и культивирования ТС клеток мыши (Oda *et al.*, 2006).

Для получения культур ТС клеток было посажено 27 бластоцист полевки *M. levis*. В результате 2 бластоцисты дали первичные колонии ТС клеток. Из одних первичных колоний при культивировании удалось получить стабильную линию ТС клеток – V1. Колонии клеток, образовавшиеся из второй бластоцисты, были потеряны в результате спонтанной дифференцировки на 2-3 пассаже. Исследуемая линия V1 ТС клеток пассировалась, как минимум, 50 пассажей, существенно не меняя фенотипические характеристики.

Полученные клетки растут уплотненными колониями эпителиальной морфологии с четкими границами. Колонии полученных клеток образованы

мелкими клетками с большим ядерно-цитоплазматическим соотношением (Рисунок 7А) В процессе культивирования V1 линии ТС клеток в норме происходила спонтанная дифференцировка небольшого числа клеток (8–15 %). Индуцированная дифференцировка осуществлялась путем культивирования ТС клеток в среде без факторов FGF4 и гепарина. В результате образовывались клетки, похожие на производные трофобласта – гигантские клетки трофобласта (Рисунок 7Б)

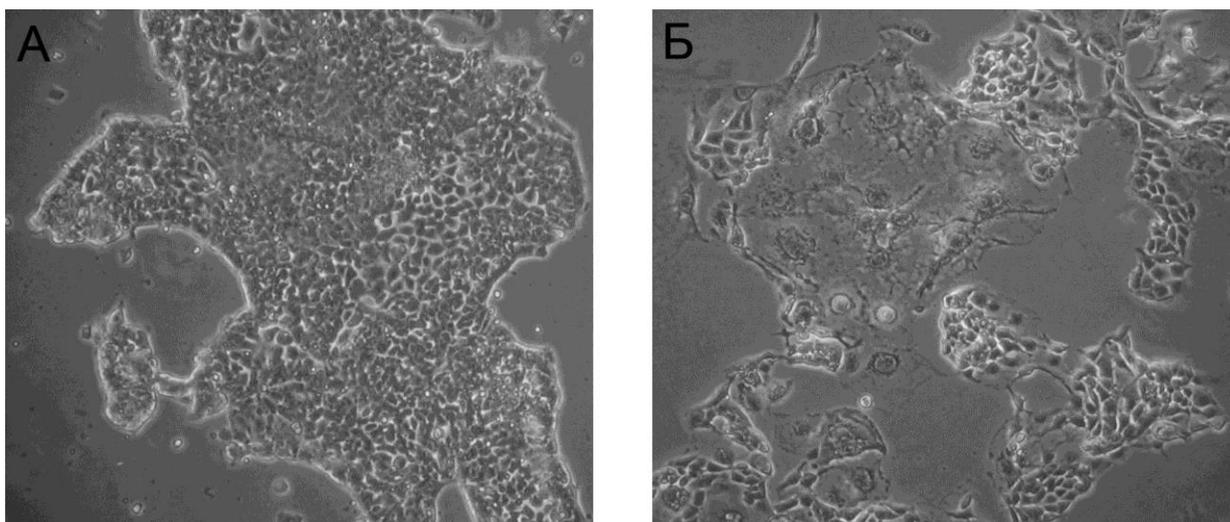


Рисунок 7. (А) Морфология недифференцированной колонии линии V1 ТС клеток полевки. Плоская монослойная колония, клетки в колонии имеют видимые границы. По краю колонии находится валик пролиферирующих клеток; (Б) Морфология линии V1 ТС клеток на 3 день дифференцировки.

Увеличение х60. Фазовый контраст.

ОТ-ПЦР-анализ показал, что в полученных клетках не экспрессируются гены *Oct4* и *Nanog*, однако выявляется экспрессия гена *Sox2* (Рисунок 8). Присутствие в недифференцированных клетках продукта гена *Sox2* говорит о стволовых качествах полученных трофобластных линий клеток (Avilion *et al.*, 2003). Наиболее убедительным доказательством принадлежности полученной линии клеток к ТС является экспрессия генов, ответственных за развитие по трофобластному типу – *Cdx-2*, *Eomes* (Niwa *et al.*, 2005; Strumpf *et al.*, 2005) и гена *Errβ*, обеспечивающего поддержание недифференцированного состояния и пролиферацию клеток трофобласта (Luo *et al.*, 1997; Rossant, Cross, 2001). Присутствие РНК гена *Hand1* (транскрипционного фактора трофобластных

гигантских клеток) в недифференцированной культуре ТС клеток можно объяснить спонтанной дифференцировкой незначительного количества клеток. Экспрессия гена *Pl-1* (*Placental lactogen 1*) также объясняется наличием в культуре клеток некоторого количества дифференцированных производных и, кроме того, неопровержимо подтверждает факт их дифференцировки в направлении гигантских клеток трофобласта.

Однако, несмотря на то, что поддержание недифференцированного состояния полученных клеток полевки зависит от факторов FGF-4 и гепарина, мы не наблюдали экспрессии гена *Fgfr2*. Этот результат можно объяснить тем, что у полевки, вероятно, задействован иной рецептор из семейства FGF-рецепторов.

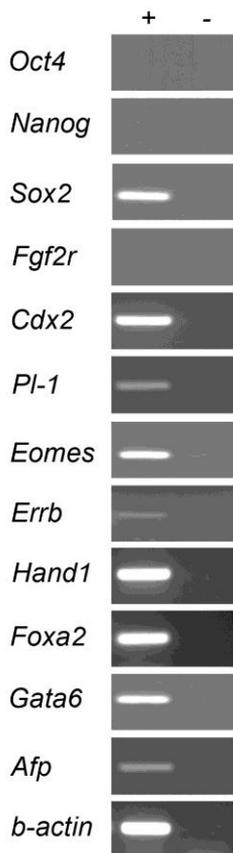


Рисунок 8. ОТ-ПЦР анализ линии V1 ТС клеток *M. levis*

(-) негативный контроль реакции обратной транскрипции.

Для того чтобы определить пол и статус X-хромосом/ы в полученной линии V1 ТС клеток *M. levis* был проведен анализ экспрессии генов *Xist* и *Tsix*. Известно, что у самцов полевки с единственной X-хромосомы осуществляется экспрессия гена *Tsix*, у самок полевок одна из X-хромосом, экспрессирующая ген *Xist*, инактивирована, а вторая X-хромосома находится в активном состоянии, что обеспечивается экспрессией гена *Tsix* (Grigor'eva *et al.*, 2009). ОТ-ПЦР анализ

показал, что в полученной культуре выявляется экспрессия и гена *Xist*, и гена *Tsix* (Рисунок 9), что свидетельствует о наличии двух X-хромосом в культуре: одной неактивной и одной активной, соответственно.

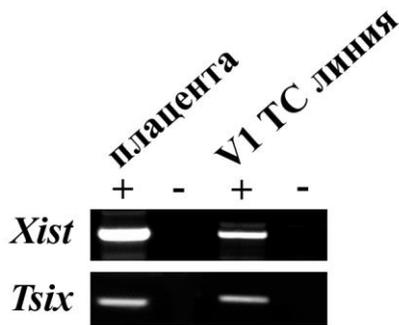


Рисунок 9. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *Xist* и *Tsix* в линии V1 ТС клеток *M. levis*

Плацента использовалась в качестве положительного контроля.

(-) негативный контроль реакции обратной транскрипции.

Таким образом, для изучения модификаций хроматина неактивной X-хромосомы была получена линия ТС клеток самки полевки *M. levis*.

3.2.2 Модификации хроматина в недифференцированных ТС клетках самки полевки *M. levis*

Известно, что у самки мыши в ядрах ТС клеток на неактивной X-хромосоме выявляется обогащение триметилированного H3K27 (Mak *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003) и uH2A (de Napoles *et al.*, 2004). Однако при иммунофлуоресцентном анализе препаратов метафазных хромосом недифференцированных ТС клеток полевки мы не детектировали ассоциацию триметилированного H3K27 с неактивной X-хромосомой (иллюстрация не представлена). В то же время было обнаружено обогащение на неактивной X-хромосоме триметилированных H3K9 и H4K20, а также HP1 и uH2A. Данные модификации также выявлялись в районах конститутивного гетерохроматина (в центромерных и теломерных районах) (Рисунок 10А, Б, В, Г). Особый интерес представляет характер распределения: данные модификации равномерно выявляются вдоль всей неактивной X-хромосомы. Такой паттерн модификаций неактивного хроматина является отличным от описанного паттерна в клетках экстраэмбриональной эндодермы (где имеет место процесс импринтированной инактивации) и в клетках эмбриональных фибробластов (где происходит процесс случайной инактивации) полевки (Рисунок

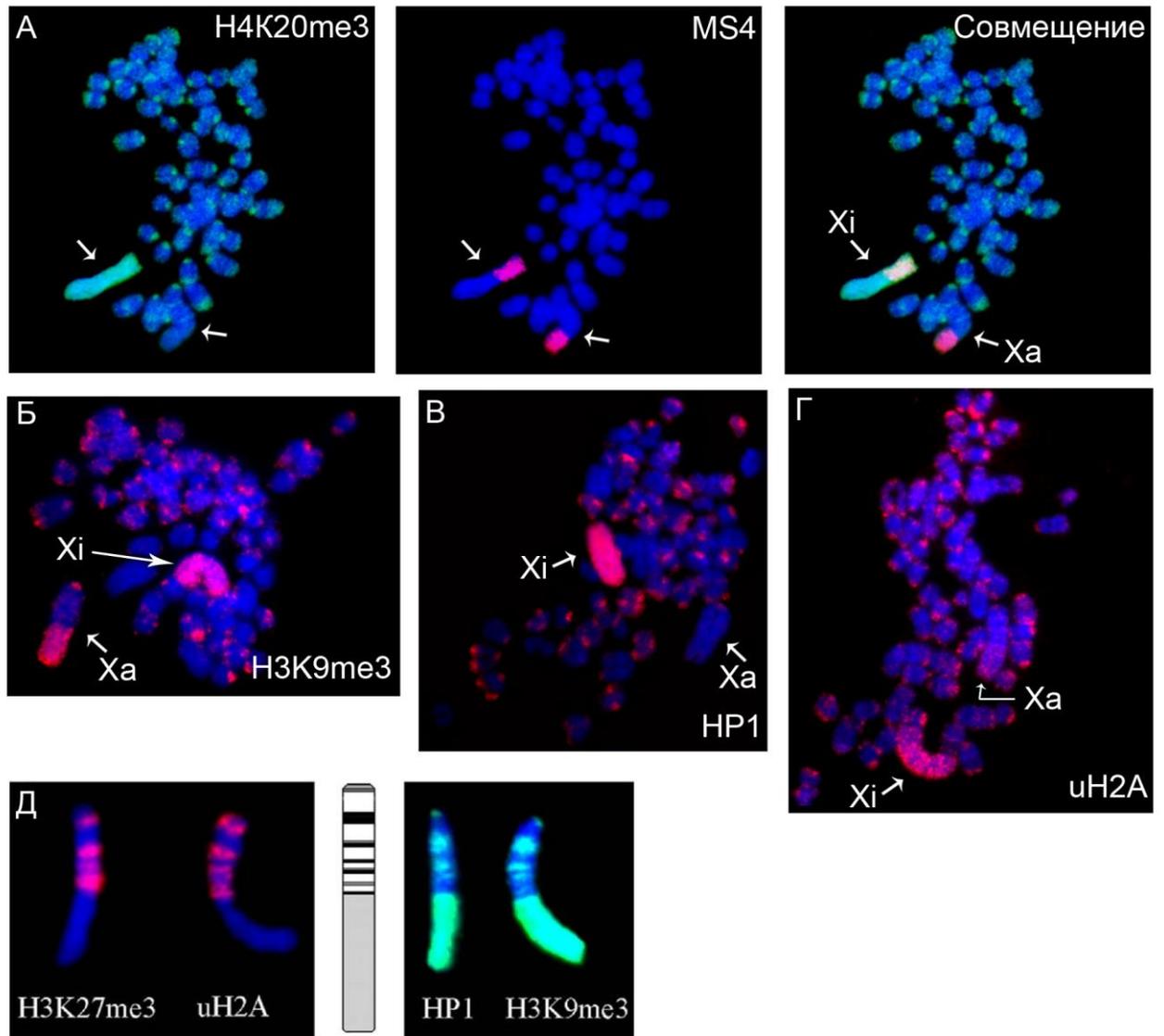


Рисунок 10. Модификации неактивного хроматина X-хромосомы в недифференцированных ТС клетках полевки *M. levis*

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом антителами к триметилированному H4K20 с последующей *in situ* гибридизацией с зондом на повтор MS4 для детекции X-хромосом;

Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом антителами к триметилированному H3K9; (В) HP1; (Г) uH2A.

Xi – неактивная X-хромосома; Xa – активная X-хромосома.

Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

(Д) Из Shevchenko *et al.*, 2009: характер распределения модификаций хроматина неактивной X-хромосомы в клетках экстраэмбриональной эндодермы и эмбриональных фибробластах полевки *M. levis*.

10Д) (Shevchenko *et al.*, 2009). В данных типах клеток было показано наличие двух

неперекрывающихся типов гетерохроматина. Один из них представлен триметилированным H3K27 и uH2A, локализованных в G-негативных бэндах X-хромосомы. Второй тип гетерохроматина характеризуется ассоциацией с гетерохроматиновым белком HP1, триметилированными H3K9 и H4K20. Данные модификации локализуются в G-позитивных бэндах X-хромосомы и районах конститутивного гетерохроматина.

Таким образом, наши данные свидетельствуют, о том, что в недифференцированных ТС клетках полевки структура хроматина организована уникальным спектром модификаций и, вероятно, может зависеть от стадии развития.

Интересно отметить, что из 100 проанализированных метафазных пластинок *M. levis* HP1 и триметилированные H3K9 и H4K20 детектируются в гетерохроматиновом блоке на активной X-хромосоме только в ~50% случаев. Это можно объяснить тем, что формирование гетерохроматинового блока на активной X-хромосоме является более поздним событием по сравнению с другими гетерохроматиновыми районами.

Особое внимание стоит также обратить на тот факт, что у полевки uH2A выявляется не только на неактивной X-хромосоме, но также в районах конститутивного гетерохроматина (в центромерных и теломерных районах), хотя для мыши обогащение uH2A было показано исключительно для неактивной X-хромосомы (Smith *et al.*, 2004). По всей видимости, обогащение uH2A не является уникальным для неактивной X-хромосомы, а на определенных стадиях развития может наблюдаться также в районах конститутивного гетерохроматина.

Для исследуемой линии ТС клеток, как было описано выше (Раздел 3.2.1), была выявлена стабильная экспрессия гена *Xist*, тем не менее, структура хроматина неактивной X-хромосомы представлена *Xist*-независимым спектром модификаций хроматина. Схожее явление мы также наблюдали в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга половых хромосом полевки.

Таким образом, в недифференцированных ТС клетках хроматин неактивной X-хромосомы представлен комбинацией маркеров первого (uH2A) и второго (триметилированных H3K9, H4K20 и HP1) типов гетерохроматина, формирующих единую систему сайленсинга.

3.2.3 Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе дифференцировки ТС клеток полевки *M. levis*

Ранее было показано, что на более поздних стадиях импринтированной инактивации – в клетках экстраэмбриональной эндодермы хроматин неактивной X-хромосомы полевки представлен двумя типами гетерохроматина, включая триметилированный H3K27 (Shevchenko *et al.*, 2009). Для того чтобы выяснить, когда на неактивной X-хромосоме в процессе импринтированной инактивации происходит аккумуляция триметилированного H3K27 были исследованы ТС клетки *M. levis* в процессе дифференцировки. Процесс дифференцировки запускали путем удаления из культуральной среды факторов FGF4 и гепарина, от которых зависит поддержание недифференцированного состояния данных клеток.

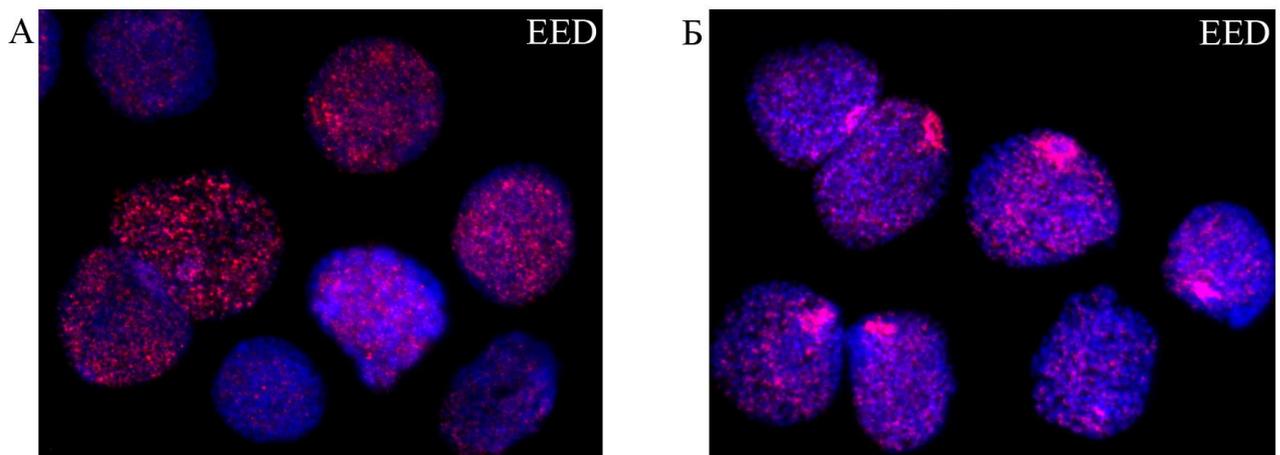


Рисунок 11. Аккумуляция белка EED в процессе дифференцировки ТС клеток самки полевки *M. levis*.

Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер антителами к EED (красный)

(А) в недифференцированных ТС клетках;

(Б) на 5 день дифференцировки ТС клеток.

Для общего окрашивания ядер использовали DAPI.

Иммунофлуоресцентное окрашивание ТС клеток в процессе дифференцировки

антителами к белку EED – компоненту PRC2 комплекса, ответственного за триметилирование H3K27, показало, что в процессе дифференцировки в ТС клетках происходит обогащение неактивной X-хромосомы белком EED. На 4-5 день дифференцировки белок EED выявляется в 90% клеток (Рисунок 11).

За аккумуляцией белка EED следует триметилирование H3K27, что сопровождается значительной реорганизацией структуры хроматина: происходит перераспределение uH2A преимущественно в G-негативные районы и исключение uH2A из районов конститутивного гетерохроматина. На данных стадиях развития триметилированный H3K9 и HP1 остаются распределенными равномерно вдоль неактивной X-хромосомы (Рисунок 12).

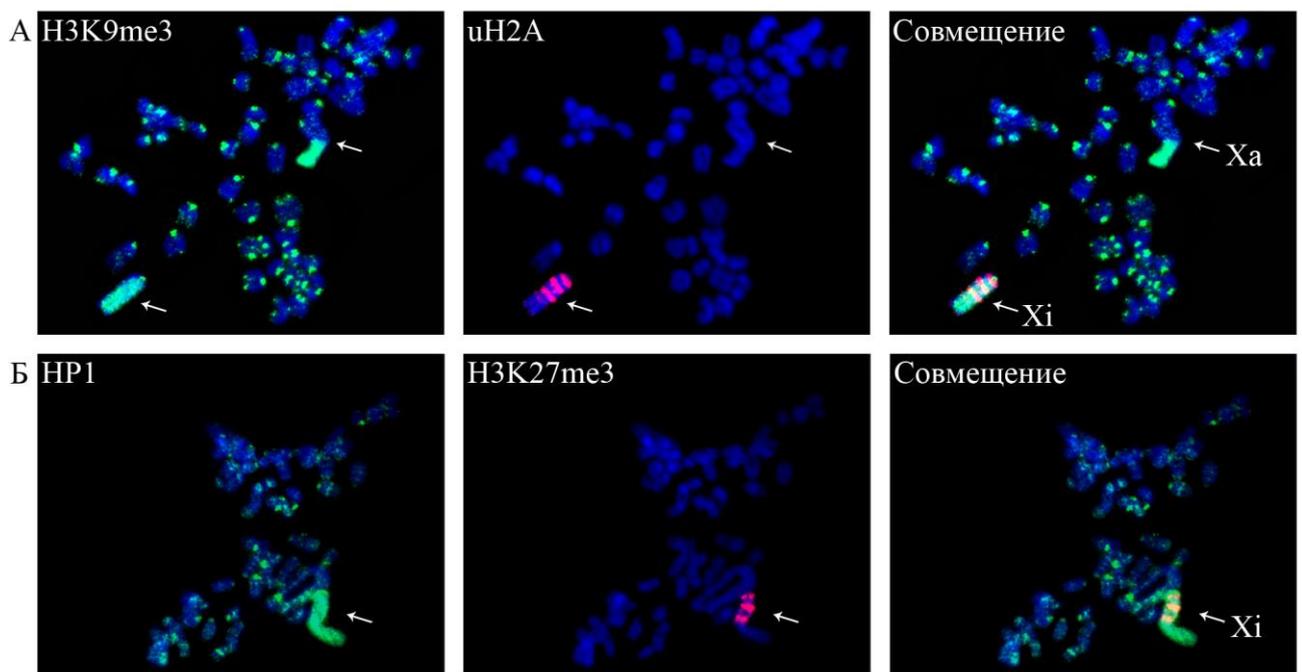


Рисунок 12. Аккумуляция триметилированного H3K27 на неактивной X-хромосоме сопровождается перераспределением модификаций неактивного хроматина вдоль хромосомы.

Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом ТС клеток полевки в процессе дифференцировки антителами к:

(А) триметилированному H3K9 (зеленый) и uH2A (красный);

(Б) HP1 (зеленый) и триметилированному H3K27 (красный).

Xi – неактивная X-хромосома; Xa – активная X-хромосома.

Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

При этом стоит отметить, что обогащение неактивной X-хромосомы триметилированным H3K27 ассоциировано со значительным снижением уровня HP1 и триметилированного H3K9 на неактивной X-хромосоме (Рисунок 13).

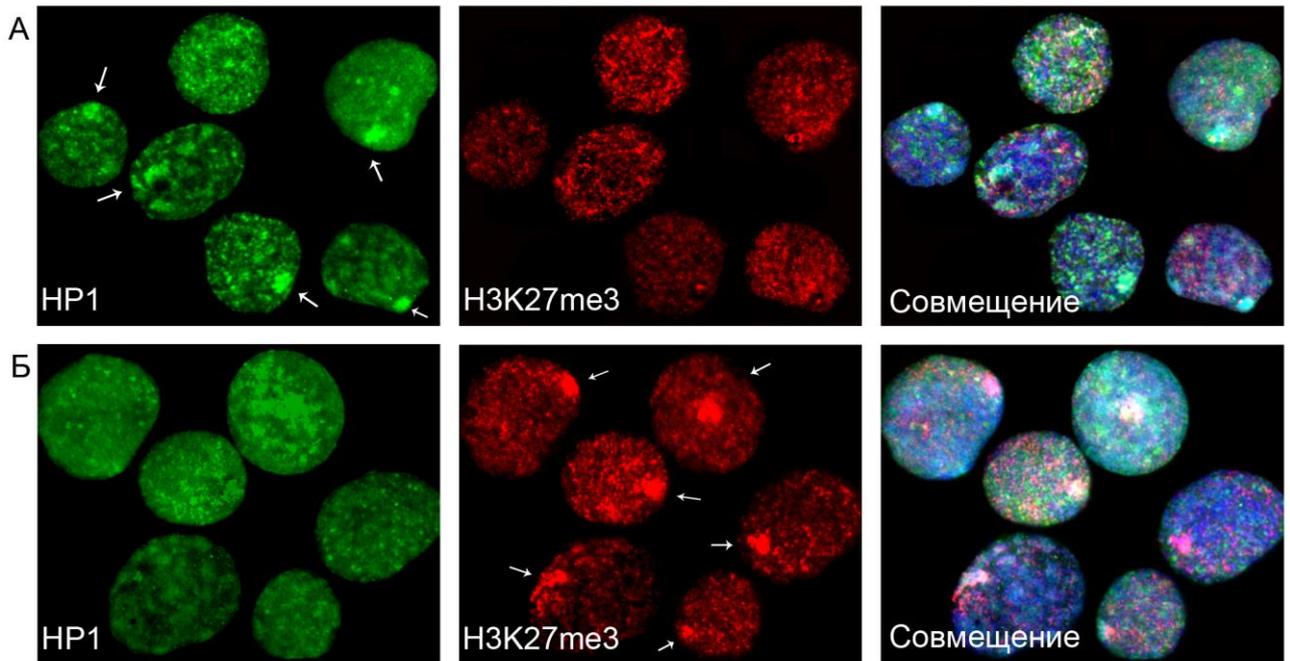


Рисунок 13. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе дифференцировки ТС клеток самки полевки *M. levis*.

Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер антителами к HP1 (зеленый) и триметилированному H3K27 (красный)

(А) на 3 день дифференцировки ТС клеток;

(Б) на 6 день дифференцировки ТС клеток.

Стрелками обозначены районы обогащения в тельцах Барра (А) гетерохроматинового белка HP1; (Б) триметилированного H3K27

Для общего окрашивания ядер использовали DAPI.

Вероятно, снижение уровня триметилированного H3K9 и HP1 на неактивной X-хромосоме является временным событием, способствующим аккумуляции триметилированного H3K27 и изменению локализации триметилированного H3K9 и HP1 преимущественно в G-позитивные районы X-хромосомы, как описано для более поздних стадий импринтированной инактивации у полевки – в клетках экстраэмбриональной эндодермы (Shevchenko *et al.*, 2009).

Таким образом, на более поздних стадиях импринтированной инактивации (в процессе дифференцировки ТС клеток) у полевки на неактивной X-хромосоме происходит аккумуляция *Xist*-зависимого триметилированного H3K27, что, вероятно, приводит к формированию двух типов гетерохроматина.

3.3 Модификации хроматина Y-хромосомы в недифференцированных трофобластных стволовых клетках *M. levis*

В недифференцированных ТС клетках полевки, как было показано выше, модификации хроматина, ассоциированные с неактивной X-хромосомой выявляются также в районах конститутивного гетерохроматина (в центромерных и теломерных районах). Поскольку триметилированные H3K9, H4K20 и H1 являются маркерами конститутивного гетерохроматина, то локализация данных модификаций в соответствующих районах хромосом является характерным. Однако локализация uH2A в районах конститутивного гетерохроматина является особенностью неактивного хроматина на данных стадиях развития. Это наводит на мысль о том, что данный спектр модификаций хроматина в недифференцированных ТС клетках является не столько специфичным для неактивной X-хромосомы, сколько представляет собой общую модель формирования гетерохроматина на данных стадиях развития. Соответственно, если данный спектр модификаций хроматина действительно представляет собой общую систему сайленсинга для всего генома, то хроматин Y-хромосомы в ТС клетках самца, вероятно, должен быть ассоциирован с таким же спектром модификаций, как на неактивной X-хромосоме, так и в районах конститутивного гетерохроматина в ТС клетках самки.

Чтобы проверить данное предположение было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом недифференцированных ТС клеток самца *M. levis* антителами к uH2A с последующей флуоресцентной *in situ* гибридизацией с зондом на повтор MS4 для детекции X-, и Y-хромосом. Повтор MS4 гибридизуется на Y-хромосоме в прицентромерном и прителомерном районах и на X-хромосоме – в блоке гетерохроматина (Elisaphenko *et al.*, 1998).

Y-хромосома *M. levis* – это большая акроцентрическая хромосома, полностью состоящая из гетерохроматина (Закиян *и др.*, 1991).

Было показано, что в недифференцированных ТС клетках полевки *M. levis* Y-хромосома обогащена uH2A, который равномерно распределен по всей хромосоме, а также выявляется в прицентромерных и прителомерных районах (Рисунок 14).

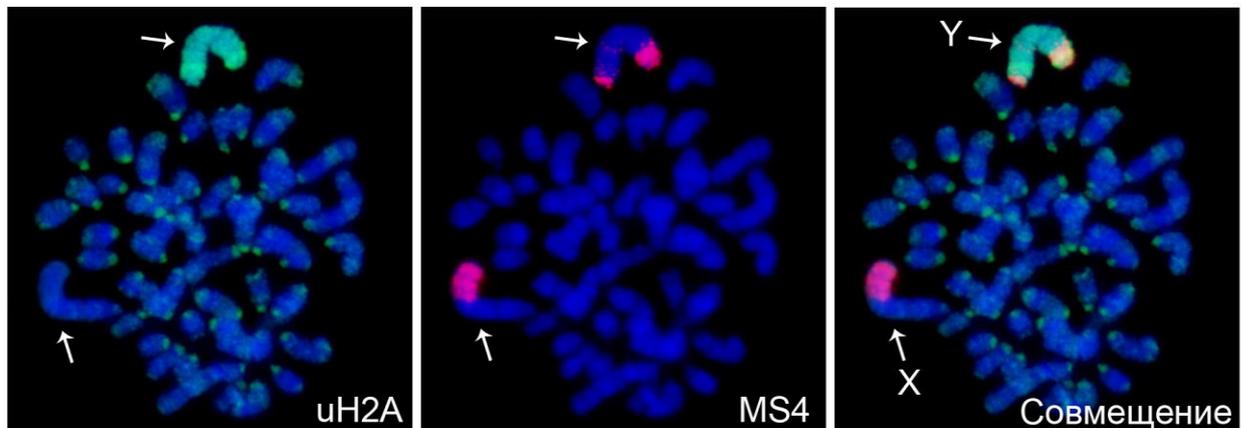


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентный анализ препаратов метафазных хромосом недифференцированных ТС клеток самцов полевки *M. levis* антителами к uH2A (зеленый) с последующей флуоресцентной гибридизацией *in situ* с зондом на повтор MS4 (красный). Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

Таким образом, совокупность данных по модификациям неактивного хроматина при мейотическом и постмейотическом сайленсинге половых хромосом, а также в раннем эмбриогенезе полевки (на ранних этапах импринтированной инактивации, в недифференцированных ТС клетках) свидетельствует о том, что на данных этапах развития uH2A, HP1, триметилированные H3K9, H4K20 задействованы не столько в специфической инактивации X-хромосомы, сколько участвуют в формировании гетерохроматиновых районов в масштабе всего генома.

Сходство структуры хроматина на мейотических, постмейотических стадиях сперматогенеза и на ранних этапах импринтированной инактивации может свидетельствовать также в пользу гипотезы о «преинактивированном» состоянии Xp. Данная гипотеза предполагает, что Xp предрасположена к инактивации, так как переходит в зиготу уже в преинактивированном состоянии в результате наследования ряда маркеров неактивного хроматина, приобретенных в результате процесса MSC1 в сперматогенезе у самцов. Полученные в работе данные по структуре хроматина X-хромосомы в процессе мейотического, постмейотического

сайленсинга половых хромосом и ранних стадиях импринтированной инактивации вписываются в данную концепцию. По крайней мере, в работе показано, что триметилированный H3K9 и гетерохроматиновый белок HP1 выявляются на мейотических, постмейотических стадиях сперматогенеза и в недифференцированных ТС клетках. Поскольку для мыши было показано, что в процессе импринтированной инактивации с двухклеточной стадии вплоть до стадии морулы или даже бластоцисты, неактивными являются районы повторов Хр, установление которых *Xist*-независимым (Namekawa *et al.*, 2010), то стоит отметить, что установление триметилированного H3K9 и HP1 также не зависит от экспрессии гена *Xist*. Соответственно, триметилированный H3K9 и HP1 являются подходящими кандидатами для эпигенетического наследования, обуславливающее «преинактивированное» состояние Хр. Однако эти факты не являются прямым доказательством того, что данное наследование действительно имеет место и данный вопрос требует дополнительного исследования.

3.4. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у мыши *M. musculus*

Ранее было показано, что в формировании неактивной структуры X-хромосомы в ТС клетках мыши принимают участие модификации гетерохроматина первого типа: триметилированный H3K27 (Mak *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003) и uH2A (de Napoles *et al.*, 2004).

Для того чтобы выяснить принимают ли участие модификации гетерохроматина второго типа (триметилированный H3K9 и HP1) в инактивации одной из двух X-хромосом при импринтированной инактивации у мыши были исследованы ТС клетки самки на ранних пассажах (3-5).

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало, что в 10% анализируемых препаратов метафазных хромосом мыши неактивная X-хромосома ассоциирована с триметилированным H3K9, который распределен равномерно вдоль X-хромосомы (Рисунок 15А). В 30% метафазных пластинок было обнаружено совместное присутствие маркеров обоих типов гетерохроматина: триметилированных H3K9 и H3K27 (Рисунок 15Б). На большинстве метафазных пластинок структура

неактивной X-хромосомы представлена ассоциацией с триметилированным H3K27, тогда как распределение триметилированного H3K9 ограничено только районами конститутивного гетерохроматина (Рисунок 15B).

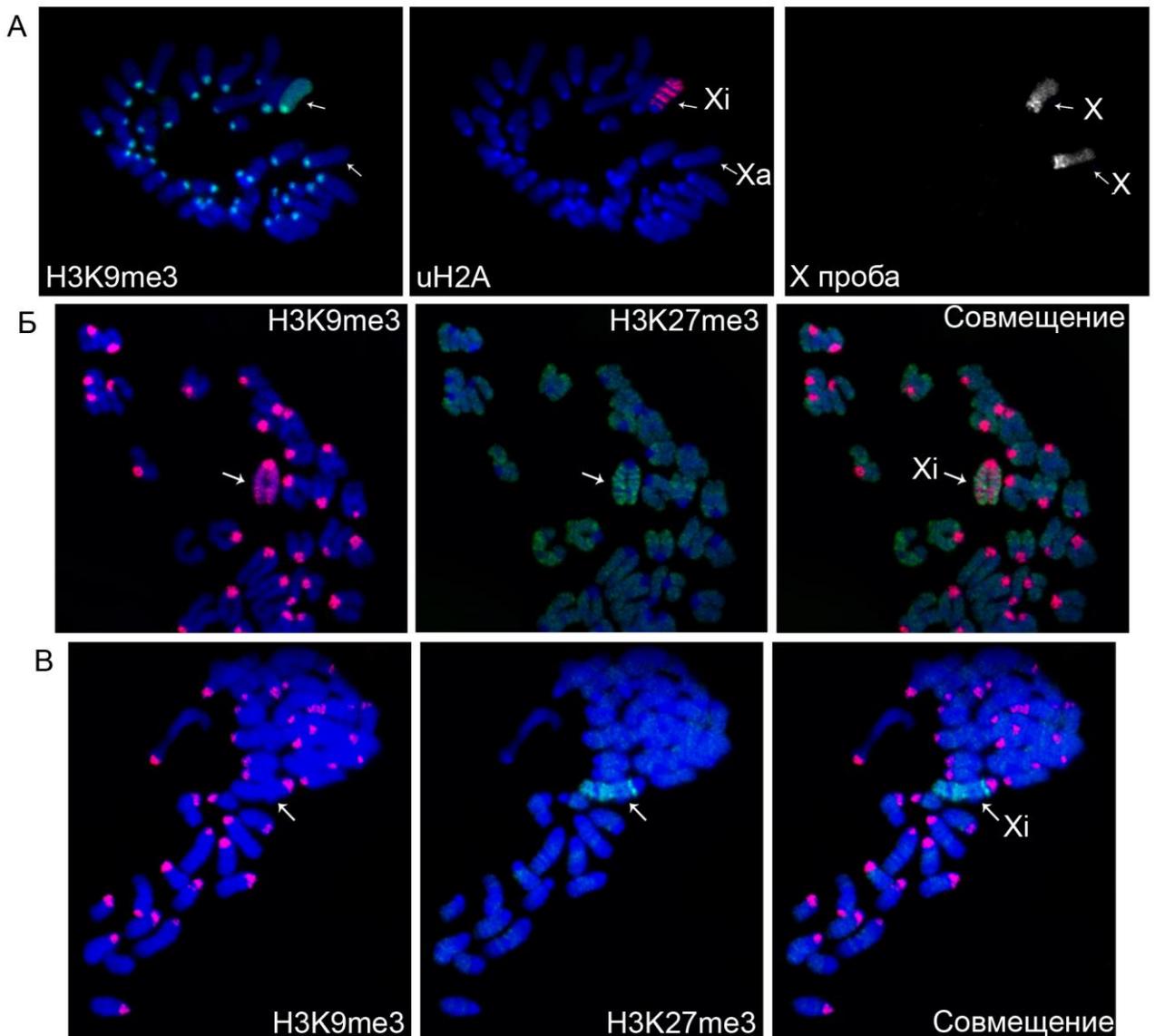


Рисунок 15. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у мыши.

Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом TC клеток антителами к: (А) триметилированному H3K9 (зеленый) и uH2A (красный) совместно с флуоресцентной *in situ* гибридизацией с использованием в качестве зонда библиотеку мышинной X-хромосомы; (Б) триметилированному H3K9 (красный) и триметилированному H3K27 (зеленый); (В) триметилированному H3K9 (красный) и триметилированному H3K27 (зеленый).

Xi – неактивная X-хромосома, Xa-активная X-хромосома

Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

Таким образом, в данной работе впервые показано, что на ранних этапах импринтированной инактивации хроматин неактивной X-хромосомы мыши ассоциирован также с маркерами гетерохроматина второго типа (триметилированным H3K9 и HP1).

Такая ассоциация является кратковременной, и, постепенно, происходит замещение одной системы сайленсинга на другую. Подобный процесс мы также наблюдаем и у полевки в процессе дифференцировки ТС клеток. Особое внимание стоит обратить на динамику замены модификаций хроматина при данной смене двух систем сайленсинга. Сначала происходит аккумуляция триметилированного H3K27, и только, затем наблюдается утрата или снижение уровня триметилированного H3K9 и HP1.

Также интересно отметить, что в отличие от ситуации в недифференцированных ТС клетках полевки, uH2A на неактивной X-хромосоме изначально выявляется только в дискретных бэндах X-хромосомы и не детектируется в районах конститутивного гетерохроматина (Рисунок 15А).

Данные об организации структуры хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации, а также в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга половых хромосом у полевки и мыши согласуются с 2-х стадийной моделью процесса импринтированной инактивации. Было показано, что процесс импринтированной инактивации включает в себя *Xist*-независимый и *Xist*-зависимый этапы. *Xist*-независимый включает в себя сайленсинг некодирующих последовательностей и происходит, по крайней мере, с 2-х клеточной стадии до стадии морулы (Escamilla-Del-Arenal *et al.*, 2011; Namekawa *et al.*, 2010; Payer *et al.*, 2011; Rens *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2005; Kalantry *et al.*, 2009; Patrat *et al.*, 2009). Со стадии морулы начинается *Xist*-зависимый этап сайленсинга, включающий в себя инактивацию кодирующих последовательностей ДНК (Namekawa *et al.*, 2010; Payer *et al.*, 2011). В данной работе было показано, что у мыши и полевки выявляются два различных спектра модификаций, формирующие неактивную структуру X-хромосомы на разных этапах процесса импринтированной инактивации. Это позволяет предположить, что два различных спектра модификаций неактивного хроматина X-хромосомы являются отражением двух описанных этапов процесса инактивации X-хромосомы.

Так, на ранних этапах импринтированной инактивации в формировании неактивного состояния X-хромосомы принимают участие триметилированные H3K9, H4K20 и uH2A, HP1. Все данные модификации (за исключением uH2A) являются маркерами конститутивного гетерохроматина и, таким образом, являются удобным инструментом в качестве механизма для сайленсинга некодирующих последовательностей. Тогда как, на более поздних стадиях импринтированной инактивации происходит аккумуляция *Xist*-зависимого триметилированного H3K27. Данная модификация совместно с uH2A обеспечивает репрессию транскрипции кодирующих последовательностей X-хромосомы.

В свете такой картины процесса импринтированной инактивации X-хромосомы интересно отметить, что у полевки *M. levis* модификации неактивного хроматина в недифференцированных TC клетках распределены равномерно, а не только в некодирующих районах X-хромосомы.

Стоит также отметить, что спектр модификаций хроматина неактивной X-хромосомы на ранних стадиях импринтированной инактивации сходен с таковым у сумчатых. Сумчатые, как известно, являются наиболее древними млекопитающими, у которых на всех стадиях развития, во всех органах и тканях имеет место процесс импринтированной инактивации (Sharman, 1971; Davidow *et al.*, 2007; Hore *et al.*, 2007). При этом у сумчатых не было найдено ортолога гена *Xist* (Shevchenko *et al.*, 2007). Так, модификации конститутивного гетерохроматина, такие как триметилированные H3K9, H4K20 и HP1 стабильно ассоциированы с неактивной X-хромосомой у сумчатых. В тоже время аккумуляция *Xist*-зависимого триметилированного H3K27 на неактивной X-хромосоме является кратковременной и нестабильной (Chaumeil *et al.*, 2011, Rens *et al.*, 2010; Zakharova *et al.*, 2011). Суммируя эти данные, можно предположить, что модификации хроматина, обуславливающие сайленсинг половых хромосом в герминальной линии представляют собой древний механизм инактивации X-хромосомы у млекопитающих.

3.5 Модификации хроматина при случайной инактивации X-хромосомы у крысы *R. norvegicus*

Исследование модификаций хроматина неактивной X-хромосомы при случайной инактивации у крысы проводили на культуре соматических клеток – эмбриональных фибробластах. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что неактивная структура X-хромосомы у крысы представлена двумя типами гетерохроматина (Рисунок 16). Так, показано, что триметилированный H3K27 и uH2A формируют на неактивной X-хромосоме единую систему сайленсинга: обе модификации локализуются в районах, которые соответствуют G-негативным бэндам. Тогда как, другая модификация неактивного хроматина – триметилированный H3K9 – выявляется в центромерных и теломерных районах хромосом и на неактивной X-хромосоме в районах, соответствующих G-позитивным бэндам и не перекрываются с районами локализации триметилированного H3K27 и uH2A.

До настоящего времени существование двух различных типов гетерохроматина на неактивной X-хромосоме было установлено лишь для человека (приматы), коровы (парнокопытные) и обыкновенной полевки *M. levis* (грызуны) (Chadwick, Willard, 2004; Coppola *et al.*, 2008, Schevchenko *et al.*, 2009). Тогда как у мыши при случайной инактивации в соматических тканях структура неактивной X-хромосомы представлена только модификациями гетерохроматина первого типа (Rens *et al.*, 2010). В данной работе два типа гетерохроматина выявлены на неактивной X-хромосоме у крысы еще одного представителя отряда грызунов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о едином принципе поддержания неактивного состояния при случайной инактивации X-хромосомы у большинства изученных представителей инфракласса млекопитающих. Отсутствие модификаций гетерохроматина второго типа на неактивной X-хромосоме у мыши представляет собой отдельное направление для исследований.

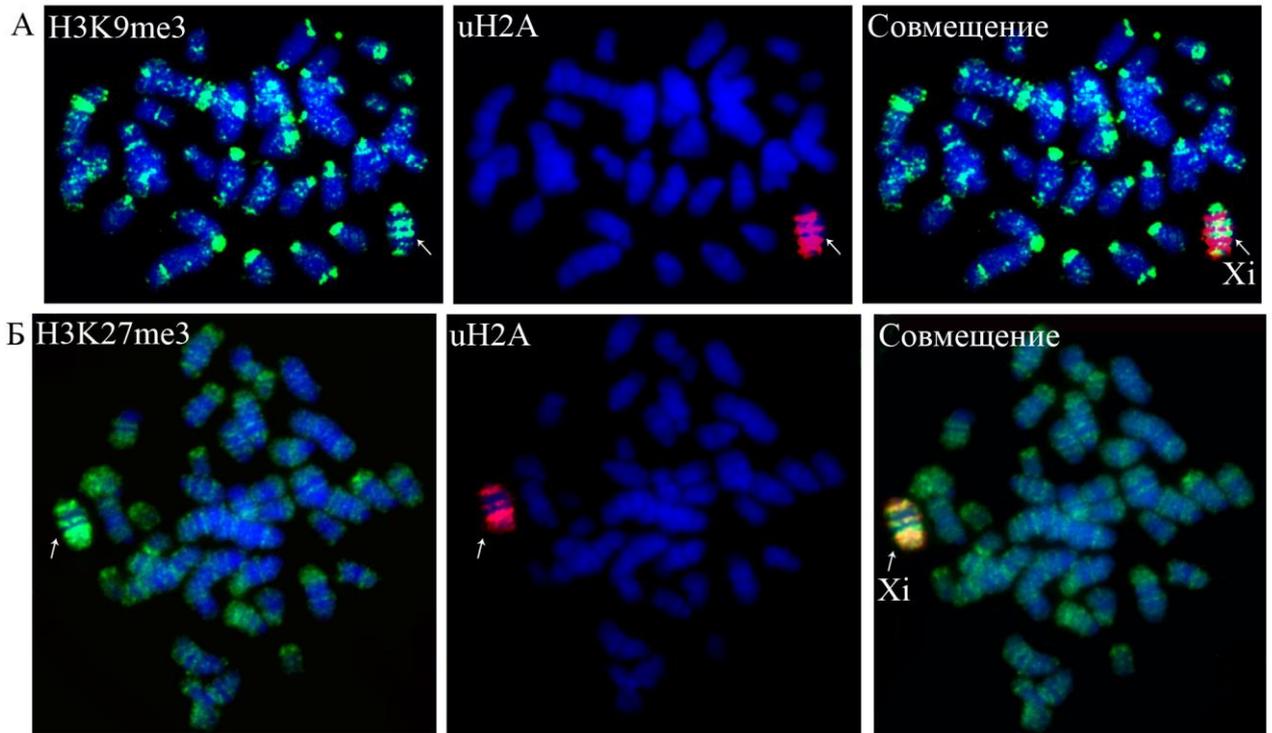


Рисунок 16. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы при случайной инактивации крысы

Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом эмбриональных фибробластов крысы (А) триметилированный H3K9 (зеленый) и uH2A (красный); (Б) триметилированный H3K27 (зеленый) и uH2A (красный).

Xi – неактивная X-хромосома

Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа направлена на изучение модификаций хроматина неактивной X-хромосомы при различных формах инактивации X-хромосомы у грызунов: в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга половых хромосом в сперматогенезе у самцов полевки, в процессе импринтированной инактивации X-хромосомы у полевки и мыши, а также при случайной инактивации у крысы.

Исследование структуры X-хромосомы в составе полового тельца полевки *M. levis* показало, что в ходе MSCI и далее в PMSC в репрессии транскрипции генов половых хромосом принимают участие триметилированный H3K9, HP1 и, на некоторых этапах, uH2A. Сравнение полученных результатов с данными по другим видам плацентарных (человеку, мыши, крысе), а также сумчатым показало, что спектр модификаций хроматина, ассоциированный с неактивной X-хромосомой в процессе MSCI и PMSC высоко консервативен.

При изучении модификаций неактивного хроматина, ассоциированных с X-хромосомой в TC клетках самки мыши, впервые было показано участие *Xist*-независимой системы сайленсинга (триметилированный H3K9/HP1) в структуре хроматина неактивной X-хромосомы. Более того, была установлена динамика формирования неактивной структуры хроматина при импринтированной инактивации у полевки и мыши. В результате, было показано, что структура X-хромосомы на ранних стадиях импринтированной инактивации у грызунов отличается от структуры, описанной для неактивной X-хромосомы на более поздних стадиях импринтированной инактивации и процесса случайной инактивации.

Исследование модификаций неактивного хроматина, вовлеченных в поддержание неактивного состояния X-хромосомы при случайной инактивации у крысы, показало, что структура неактивной X-хромосомы представлена двумя неперекрывающимися типами гетерохроматина: один образован триметилированным H3K27 и uH2A, другой - триметилированным H3K9. Поскольку данные типы гетерохроматина были ранее обнаружены в соматических клетках человека, коровы и обыкновенной полевки, то они, по-видимому,

представляют собой наиболее универсальную структуру хроматина для неактивной X-хромосомы у плацентарных млекопитающих.

В целом можно заключить, что процесс инактивации X-хромосомы у различных представителей инфракласса млекопитающих, а именно участие модификаций неактивного хроматина имеет видоспецифичные особенности (Okamoto *et al.*, 2011). Так, например, у мыши на предимплантационных стадиях развития триметилированный H4K20 был обнаружен только в районах конститутивного гетерохроматина (Wongtawan *et al.*, 2011), тогда как в данной работе мы показали, что у полевки данная модификация ассоциирована не только с районами конститутивного гетерохроматина, но и с неактивной X-хромосомой. Это может свидетельствовать о более раннем вовлечении триметилированного H4K20 в процесс импринтированной инактивации у полевки. И наоборот, аккумуляция триметилированной формы H3K27 у полевки происходит лишь в процессе дифференцировки ТС клеток, тогда как у мыши данная модификация выявляется уже в недифференцированных ТС клетках.

Таким образом, результаты по изучению модификаций неактивного хроматина X-хромосомы у различных представителей млекопитающих представляет собой важный материал для понимания эволюционных связей между различными видами, основ эпигенетических механизмов, вовлеченных в репрессию транскрипции генов. Также данные результаты представляют собой интересную информацию для исследований в области раннего эмбриогенеза грызунов.

ВЫВОДЫ:

1. Установлено, что в процессе мейотической инактивации половых хромосом в формировании структуры хроматина X-хромосомы полевки *M. levis* принимают участие uH2A, триметилированный H3K9 и гетерохроматиновый белок HP1. В постмейотическом половом хроматине сохраняются триметилированный H3K9 и гетерохроматиновый белок HP1;
2. Показано, что на ранних этапах импринтированной инактивации (в недифференцированных ТС клетках) неактивную структуру X-хромосомы у полевки образуют uH2A, триметилированный H3K9, триметилированный H4K20 и гетерохроматиновый белок HP1;
3. На более поздних этапах импринтированной инактивации (в процессе дифференцировки ТС клеток) на неактивной X-хромосоме полевки *M. levis* происходит аккумуляция триметилированного H3K27, что приводит к перераспределению модификаций неактивного хроматина вдоль X-хромосомы;
4. Впервые показано, что на ранних этапах импринтированной инактивации у мыши в формировании неактивной структуры X-хромосомы принимают участие модификации гетерохроматина второго типа (триметилированный H3K9), которые впоследствии замещаются модификациями гетерохроматина первого типа (триметилированный H3K27);
5. Установлено, что структура хроматина неактивной X-хромосомы при случайной инактивации у крысы представлена двумя типами гетерохроматина: первый тип образуют триметилированный H3K27 и uH2A, второй тип – триметилированный H3K9 и гетерохроматиновый белок HP1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аноприенко О.В., Закиян С.М. Evolution of mammalian sex chromosomes: cooperation of genetic and epigenetic factors // Генетика - 2004. - V. 40. - № 8. - P. 1013-1033.
2. Закиян С.М., Нестерова Т.Б., Черяукене О.В., Бочкарев М.Н. Гетерохроматин как фактор, влияющий на инактивацию X-хромосомы у гибридов обыкновенной полевки (*Microtidae, Rodentia*) // Генетика - 1991. - V. 27. - № 3. - P. 425-433.
3. Шевченко А.И, Павлова С.В., Дементьева Е.В., Закиян С.М. Модификации хроматина в процессе инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих // Генетика - 2006. - V. 42. - № 9. - P. 1225-1234.
4. Aagaard L., Laible G., Selenko P., Schmid M., Dorn R., Schotta G., Kuhfitting S., Wolf A., Lebersorger A., Singh P.B., Reuter G., Jenuwein T. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31 // *EMBO J.* - 1999. - V. 18. - № 7. - P. 1923-1938.
5. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function // *Genes Dev.* - 2003. - V. 17. - № 1. - P. 126-140.
6. Avner P., Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation // *Nat. Rev. Genet.* - 2001. - V. 2. - № 1. - P. 59-67.
7. Ayoub N., Richler C., Wahrman J. Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis // *Chromosoma* - 1997. - V. 106. - № 1. - P. 1-10.
8. Baarends W.M., Hoogerbrugge J.W., Roest H.P., Ooms M., Vreeburg J., Hoeijmakers J.H., Grootegoed J.A. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis // *Dev. Biol.* - 1999. - V. 207. - № 2. - P. 322-333.
9. Baarends W.M., Wassenaar E., van der Laan R., Hoogerbrugge J., Sleddens-Linkels E., Hoeijmakers J.H., de Boer P., Grootegoed J.A. Silencing of unpaired

- chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis // *Mol. Cell Biol.* - 2005. - V. 25. - № 3. - P. - 1041-1053.
10. Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain // *Nature* - 2001. - V. 410. - № 6824. - P. 120-124.
 11. Borodin P.M., Sablina O.V., Rodionova M.I. Pattern of X-Y chromosome pairing in microtine rodents // *Hereditas* - 1995. - V. 123. - № 1. - P. 17-23.
 12. Boumil R.M., Lee J.T. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation // *Hum. Mol. Genet.* - 2001. - V. 10. - № 20. - P. 2225-2232.
 13. Carrel L., Willard H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females // *Nature* - 2005. - V. 434. - № 7031. - P. 400-404.
 14. Casas-Delucchi C.S., Brero A., Rahn H.P., Solovei I., Wutz A., Cremer T., Leonhardt H., Cardoso M.C. Histone acetylation controls the inactive X chromosome replication dynamics // *Nat. Commun.* - 2011. - V. 2. - P. 222.
 15. Chadwick B.P. Variation in Xi chromatin organization and correlation of the H3K27me3 chromatin territories to transcribed sequences by microarray analysis // *Chromosoma* - 2007. - V. 116. - № 2. - P. 147-157.
 16. Chadwick B.P., Willard H.F. Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome // *J. Cell Biol.* - 2002. - V. 157. - № 7. - P. 1113-1123.
 17. Chadwick B.P., Willard H.F. Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome // *Hum. Mol. Genet.* - 2003. - V. 12. - № 17. - P. 2167-2178.
 18. Chadwick B.P., Willard H.F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2004. - V. 101. - № 50. - P. 17450-17455.
 19. Chaumeil J., Okamoto I., Guggiari M., Heard E. Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells // *Cytogenet. Genome Res.* - 2002. - V. 99. - № 1-4. - P. 75-84.
 20. Chaumeil J., Waters P.D., Koina E., Gilbert C., Robinson T.J., Graves J.A. Evolution from XIST-independent to XIST-controlled X-chromosome

- inactivation: epigenetic modifications in distantly related mammals // PLoS One - V. 6. - № 4. - P. e19040.
21. Chen H.Y., Sun J.M., Zhang Y., Davie J.R., Meistrich M.L. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. - № 21. - P. 13165-13169.
 22. Chow J.C., Ciaudo C., Fazzari M.J., Mise N., Servant N., Glass J.L., Attreed M., Avner P., Wutz A., Barillot E., Grealley J.M., Voinnet O., Heard E. LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation // Cell – 2010. - V. 141. - № 6. - P. 956-969.
 23. Cooper D.W. Directed genetic change model for X chromosome inactivation in eutherian mammals // Nature - 1971. - V. 230. - № 5292. - P. 292-294.
 24. Coppola G., Pinton A., Joudrey E.M., Basrur P.K., King W.A. Spatial distribution of histone isoforms on the bovine active and inactive X chromosomes // Sex Dev. - 2008. - V. 2. - № 1. - P. 12-23.
 25. Costa Y., Speed R.M., Gautier P., Semple S.A., Maratou K., Turner J.M., Cooke H.J. Mouse MAELSTROM: the link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and microRNA pathway? // Hum. Mol. Genet. - 2006. - V. 15. - № 15. - P. 2324-2334.
 26. Costanzi C., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals // Nature - 1998. - V. 393. - № 6685. - P. 599-601.
 27. Costanzi C., Stein P., Worrad D.M., Schultz R.M., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos // Development - 2000. - V. 127. - № 11. - P. 2283-2289.
 28. Csankovszki G., Nagy A., Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation // J. Cell Biol. - 2001. - V. 153. - № 4. - P. 773-784.
 29. Csankovszki G., Panning B., Bates B., Pehrson J.R., Jaenisch R. Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation // Nat. Genet. - 1999. - V. 22. - № 4. - P. 323-324.

30. Davidow L.S., Breen M., Duke S.E., Samallow P.B., McCarrey J.R., Lee J.T. The search for a marsupial XIC reveals a break with vertebrate synteny // *Chromosome Res.* - 2007. - V. 15. - № 2. - P. 137-146.
31. 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., Koseki H., Brockdorff N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation // *Dev. Cell* - 2004. - V. 7. - № 5. - P. 663-676.
32. Do J.T., Han D.W., Gentile L., Sobek-Klocke I., Stehling M., Schöler H.R. Enhanced Reprogramming of Xist by induced upregulation of Tsix and Dnmt3a // *Stem Cells* - 2008. - V. 26(11) - P. 2821-2831.
33. Do J.T., Han D.W., Gentile L., Sobek-Klocke I., Stehling M., Schöler H.R. Enhanced reprogramming of Xist by induced upregulation of Tsix and Dnmt3a // *Stem Cells* - 2008. - V. 26. - № 11. - P. 2821-2831.
34. Doyen C.M., An W., Angelov D., Bondarenko V., Mietton F., Studitsky V.M., Hamiche A., Roeder R.G., Bouvet P., Dimitrov S. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A // *Mol. Cell Biol.* - 2006. - V. 26. - № 3. - P. 1156-1164.
35. Duthie S.M., Nesterova T.B., Formstone E.J., Keohane A.M., Turner B.M., Zakian S.M., Brockdorff N. Xist RNA exhibits a banded localization on the inactive X chromosome and is excluded from autosomal material in cis // *Hum. Mol. Genet.* - 1999. - V. 8. - № 2. - P. 195-204.
36. Elisaphenko E.A., Nesterova T.B., Duthie S.M., Ruldugina O.V., Rogozin I.B., Brockdorff N., Zakian S.M. Repetitive DNA sequences in the common vole: cloning, characterization and chromosome localization of two novel complex repeats MS3 and MS4 from the genome of the East European vole *Microtus rossiaemeridionalis* // *Chromosome Res.* - 1998. - V. 6. - № 5. - P. 351-360.
37. Escamilla-Del-Arenal M., da Rocha S.T., Heard E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation // *Hum. Genet.* - V. 130. - № 2. - P. 307-327.
38. Fang J., Chen T., Chadwick B., Li E., Zhang Y. - Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation // *J Biol Chem.* - 2004 – V. 279 – P. 52812-52815

39. Fernandez-Capetillo O., Mahadevaiah S.K., Celeste A., Romanienko P.J., Camerini-Otero R.D., Bonner W.M., Manova K., Burgoyne P., Nussenzweig A. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis // *Dev. Cell* - 2003. - V. 4. - № 4. - P. 497-508.
40. Godmann M., Auger V., Ferraroni-Aguiar V., Di Sauro A., Sette C., Behr R., Kimmins S. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis // *Biol. Reprod.* - 2007. - V. 77. - № 5. - P. 754-764.
41. Goto T., Kinoshita T. Maternal transcripts of mitotic checkpoint gene, Xub3, are accumulated in the animal blastomeres of *Xenopus* early embryo // *DNA Cell Biol.* - 1999. - V. 18. - № 3. - P. 227-234.
42. Goto Y., Takagi N. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse // *Development* - 1998. - V. 125. - № 17. - P. 3353-3363.
43. Greaves I.K., Rangasamy D., Devoy M., Marshall Graves J.A., Tremethick D.J. The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing facultative heterochromatin following meiosis // *Mol. Cell Biol.* - 2006. - V. 26. - № 14. - P. 5394-5405.
44. Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Mazurok N.A., Elisaphenko E.A., Zhelezova A.I., Shilov A.G., Dyban P.A., Dyban A.P., Noniashvili E.M., Slobodyanyuk S.Y., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. FGF4 independent derivation of trophoblast stem cells from the common vole // *PLoS One* - 2009. - V. 4. - № 9. - P. e7161.
45. Handel M.A. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain // *Exp Cell Res* - 2004. - V. 296. - № 1. - P. 57-63.
46. Heard E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome // *Curr. Opin. Genet. Dev.* - 2005. - V. 15. - № 5. - P. 482-489.
47. Heard E., Clerc P., Avner P. X-chromosome inactivation in mammals // *Annu. Rev. Genet.* - 1997. - V. 31. - P. 571-610.
48. Heard E., Distèche C.M. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome // *Genes Dev.* - 2006. - V. 20. - № 14. - P. 1848-1867.

49. Heard E., Rougeulle C., Arnaud D., Avner P., Allis C.D., Spector D.L. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation // *Cell* - 2001. - V. 107. - № 6. - P. 727-738.
50. Hernandez-Munoz I., Lund A.H., van der Stoop P., Boutsma E., Muijers I., Verhoeven E., Nusinow D.A., Panning B., Marahrens Y., van Lohuizen M. Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2005. - V. 102. - № 21. - P. 7635-7640.
51. Hernandez-Munoz I., Taghavi P., Kuijl C., Neefies J., van Lohuizen M. Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1 // *Mol. Cell. Biol.* - 2005. - V. 25. - № 24. - P. 11047-11058.
52. Hore T.A., Koina E., Wakefield M.J., Marshall Graves J.A. The region homologous to the X-chromosome inactivation centre has been disrupted in marsupial and monotreme mammals // *Chromosome Res.* - 2007. - V. 15. - № 2. - P. 147-161.
53. Hornecker J.L., Samollow P.B., Robinson E.S., Vandenberg J.L., McCarrey J.R. Meiotic sex chromosome inactivation in the marsupial *Monodelphis domestica* // *Genesis* - 2007. - V. 45. - № 11. - P. 696-708.
54. Hoyer-Fender S., Czirr E., Radde R., Turner J.M., Mahadeviah S.K., Pehrson J.R., Burgoyne P.S. Localisation of histone macroH2A1.2 to the XY-body is not a response to the presence of asynapsed chromosome axes // *J. Cell Sci.* - 2004. - V. 117. - № Pt 2. - P. 189-198.
55. Huynh K.D., Lee J.T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos // *Nature* - 2003. - V. 426. - № 6968. - P. 857-862.
56. Jacobs S.A., Taverna S.D., Zhang Y., Briggs S.D., Li J., Eissenberg J.C., Allis C.D., Khorasanizadeh S. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3 // *EMBO J* - 2001. - V. 20. - № 18. - P. 5232-5241.
57. Kalantry S., Magnuson T. The Polycomb group protein EED is dispensable for the initiation of random X-chromosome inactivation // *PLoS Genet.* - 2006. - V. 2. - № 5. - P. e66.

58. Kalantry S., Purushothaman S., Bowen R.B., Starmer J., Magnuson T. Evidence of Xist RNA-independent initiation of mouse imprinted X-chromosome inactivation // *Nature* - 2009. - V. 460. - № 7255. - P. 647-651.
59. Kay G.F., Barton S.C., Surani M.A., Rastan S. Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine Xist expression in early mouse development // *Cell* - 1994. - V. 77. - № 5. - P. 639-650.
60. Kelly W.G., Aramayo R. Meiotic silencing and the epigenetics of sex // *Chromosome Res* - 2007. - V. 15. - № 5. - P. 633-651.
61. Keohane A.M., O'Neill L P., Belyaev N.D., Lavender J.S., Turner B.M. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells // *Dev. Biol.* - 1996. - V. 180. - № 2. - P. 618-630.
62. Khalil A.M., Boyar F.Z., Driscoll D.J. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2004. - V. 101. - № 47. - P. 16583-16587.
63. Khil P.P., Smirnova N.A., Romanienko P.J., Camerini-Otero R.D. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation // *Nat. Genet.* - 2004. - V. 36. - № 6. - P. 642-646.
64. Kohlmaier A., Savarese F., Lachner M., Martens J., Jenuwein T., Wutz A. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation // *PLoS Biol* - 2004. - V. 2. - № 7. - P. E171.
65. Koina E., Chaumeil J., Greaves I.K., Tremethick D.J., Graves J.A. Specific patterns of histone marks accompany X chromosome inactivation in a marsupial // *Chromosome Res.* - 2009. - V. 17. - № 1. - P. 115-126.
66. Krouwels I.M., Wiesmeijer K., Abraham T.E., Molenaar C., Verwoerd N.P., Tanke H.J., Dieks R.W. A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain // *J. Cell Biol.* - 2005. - V. 170. - № 4. - P. 537-549.
67. Kunath T., Arnaud D., Uy G.D., Okamoto I., Chureau C., Yamanaka Y., Heard E., Gardner R.L., Avner P., Rossant J. Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts // *Development* - 2005. - V. 132. - № 7. - P. 1649-1661.

68. Lachner M., O'Carroll D., Rea S. Mechtler K., Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins // *Nature* - 2001. - V. 410. - № 6824. - P. 116-120.
69. Lifschytz E., Lindsley D.L. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis (Drosophila-alloocyly-chromosome evolution-male sterility-dosage compensation) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 1972. - V. 69. - № 1. - P. 182-186.
70. Lucchesi J.C., Kelly W.G., Panning B. Chromatin remodeling in dosage compensation // *Annu. Rev. Genet.* - 2005. - V. 39. - P. - 615-651.
71. Luo J., Sladek R., Bader J.A., Matthyssen A., Rossant J., Giquere V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta // *Nature* - 1997. - V. 388.- № 6644. - P. 778-782.
72. Lyon M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) // *Nature* - 1961. - V. 190. - P. 372-373.
73. Mak W., Baxter J., Silva J., Newall A.E., Otte A.P., Brockdorff N. Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells // *Curr. Biol.* - 2002. - V. 12. - № 12. - P. 1016-1020.
74. Mak W., Nesterova T.B., de Napoles M., Appanah R., Yamanaka S., Otte A.P., Brockdorff N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos // *Science* - 2004. - V. 303. - № 5658. - P. 666-669.
75. McCarrey J.R., Thomas K. Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene // *Nature* - 1987. - V. 326. - № 6112. - P. 501-505.
76. McCarrey J.R., Watson C., Atencio J., Ostermeier G.C., Marahrens Y., Jaenish R., Krawetz S.A. X-chromosome inactivation during spermatogenesis is regulated by an Xist/Tsix-independent mechanism in the mouse // *Genesis* - 2002. - V. 34. - № 4. - P. 257-266.
77. McKee B.D., Handel M.A. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation // *Chromosoma* - 1993. - V. 102. - № 2. - P. 71-80.

78. Mermoud J.E., Costanzi C., Pehrson J.R., Brockdorff N. Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation // *J. Cell Biol.* - 1999. - V. 147. - № 7. - P. 1399-1408.
79. Metzler-Guillemain C., Luciani J., Depetris D. Guichaoua M.R., Mattei M.G. HP1beta and HP1gamma, but not HP1alpha, decorate the entire XY body during human male meiosis // *Chromosome Res.* - 2003. - V. 11. - № 1. - P. 73-81.
80. Mietton F., Sengupta A.K., Molla A., Picchi G., Barral S., Heliot L., Grange T., Wutz A., Dimitrov S. Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome // *Mol. Cell Biol.* - 2009. - V. 29. - № 1. - P. 150-156.
81. Mueller J.L., Mahadevaiah S.K., Park P.J., Warburton P.E., Page D.C., Turner J.M. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression // *Nat. Genet.* - 2008. - V. 40. - № 6. - P. 794-799.
82. Namekawa S.H., Park P.J., Zhang L.F., Shima J.E., McCarrey J.R., Griswold M.D., Lee J.T. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice // *Curr. Biol.* - 2006. - V. 16. - № 7. - P. 660-667.
83. Namekawa S.H., Payer B., Huynh K.D., Jaenisch R., Lee J.T. Two-step imprinted X inactivation: repeat versus genic silencing in the mouse // *Mol. Cell Biol.* - V. 30. - № 13. - P. 3187-3205.
84. Namekawa S.H., VandeBerg J.L., McCarrey J.R., Lee J.T. Sex chromosome silencing in the marsupial male germ line // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2007. - V. 104. - № 23. - P. 9730-9735.
85. Nesterova T.B., Barton S.C., Surani M.A., Brockdorff N. Loss of Xist imprinting in diploid parthenogenetic preimplantation embryos // *Dev. Biol.* - 2001. - V. 235. - № 2. - P. 343-350.
86. Nguyen D.K., Disteche C.M. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals // *Nat. Genet.* - 2006. - V. 38. - № 1. - P. 47-53.
87. Niwa H., Toyooka Y., Shimosato D., Strumpf D., Takahashi K., Yagi R., Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation // *Cell* - 2005. - V. 123. - № 5. - P. 917-929.
88. Oda H., Hubner M.R., Beck D.B., Vermeulen M., Hurwitz J., Spector D.L., Reinberg D. Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by

- CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage // *Mol. Cell* - V. 40. - № 3. - P. 364-376.
89. Oda H., Okamoto I., Murphy N. Chu J., Price S.M., Shen M.M., Torres-Padilla M.E., Heard E., Reinberg D. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development // *Mol. Cell Biol.* - 2009. - V. 29. - № 8. - P. 2278-2295.
90. Oda M., Shiota K., Tanaka S. Trophoblast stem cells // *Methods Enzymol.* - 2006. - V. 419. - P. 387-400.
91. Odorisio T., Rodriguez T.A., Evans E.P., Clarke A.R., Burgoyne P.S. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis // *Nat. Genet.* - 1998. - V. 18. - № 3. - P. 257-261.
92. Ohhata T., Tachibana M., Tada M., Tada T., Sasaki H., Shinkai Y., Sado T. X-inactivation is stably maintained in mouse embryos deficient for histone methyltransferase G9a // *Genesis* - 2004. - V. 40. - № 3. - P. 151-156.
93. Okamoto I., Arnaud D., Le Baccon P., Otte A.P., Disteché C.M., Avner P., Heard E. Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice // *Nature* - 2005. - V. 438. - № 7066. - P. 369-373.
94. Okamoto I., Heard E. The dynamics of imprinted X inactivation during preimplantation development in mice // *Cytogenet. Genome Res.* - 2006. - V. 113. - № 1-4. - P. 318-324.
95. Okamoto I., Otte A.P., Allis C.D., Reinberg D., Heard D. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development // *Science* - 2004. - V. 303. - № 5658. - P. 644-649.
96. Okamoto I., Patrat C., Thepot D., Peynot N., Faugue P., Daniel N., Diabangouaya P., Wolf J.P., Renard J.P., Duranthon V., Heard E. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development // *Nature* - 2011. - V. 472. - № 7343. - P. 370-374.
97. Ooi S.L., Henikoff S. Germline histone dynamics and epigenetics // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 2007. - V. 19. - № 3. - P. 257-265.
98. Patrat C., Okamoto I., Diabangouaya P., Vialon V., Le Baccon P., Chow J., Heard E. Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted

- X-chromosome inactivation in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - 2009. - V. 106. - № 13. - P. 5198-5203.
99. Pauler F.M., Sloane M.A., Huang R., Regha K., Koerner M.V., Tamir I., Sommer A., Aszodi A., Jenuwein T., Barlow D.P. H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome // *Genome Res.* - 2009. - V. 19. - № 2. - P. 221-233.
100. Payer B., Lee J.T., Namekawa S.H. X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells // *Hum. Genet.* - V. 130. - № 2. - P. 265-280.
101. Peters A.H., Mermoud J.E., O'Carroll D., Pagani M., Schweizer D., Brockdorff N., Jenuwein T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin // *Nat. Genet.* - 2002. - V. 30. - № 1. - P. 77-80.
102. Plath K., Fang J., Mlynarczyk-Evans S.K., Cao R., Worringer K.A., Wang H., de la Cruz C.C., Otte A.P., Panning B., Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation // *Science* - 2003. - V. 300. - № 5616. - P. 131-135.
103. Plath K., Talbot D., Hamer K.M., Otte A.P., Yang T.P., Jaenisch R., Panning B. Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex 1 proteins on the inactive X chromosome // *J. Cell Biol.* - 2004. - V. 167. - № 6. - P. 1025-1035.
104. Raefski A.S., O'Neill M.J. Identification of a cluster of X-linked imprinted genes in mice // *Nat. Genet.* - 2005. - V. 37. - № 6. - P. 620-624.
105. Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases // *Nature* - 2000. - V. 406. - № 6796. - P. 593-599.
106. Rens W., Wallduck M.S., Lovell F.L., Ferguson-Smith M.A., Ferguson-Smith A.C. Epigenetic modifications on X chromosomes in marsupial and monotreme mammals and implications for evolution of dosage compensation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* - V. 107. - № 41. - P. 17657-17662.
107. Rossant J., Cross J.C. Placental development: lessons from mouse mutants // *Nat. Rev. Genet.* - 2001. - V. 2. - № 7. - P. 538-548.

108. Rougeulle C., Chaumeil J., Sarma K., Allis C.D., Reinberg D., Avner P., Heard E. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome // *Mol. Cell. Biol.* - 2004. - V. 24. - № 12. - P. 5475-5484.
109. Schoeftner S., Sengupta A.K., Kubicek S., Mechtler K., Spahn L., Koseki H., Jenuwein T., Wutz A. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing // *EMBO J* - 2006. - V. 25. - № 13. - P. 3110-3122.
110. Sharman G.B. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos // *Nature* - 1971. - V. 230. - № 5291. - P. 231-232.
111. Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Dementyeva E.V., Zakian S.M. Mosaic heterochromatin of the inactive X chromosome in vole *Microtus rossiaemeridionalis* // *Mamm. Genome* - 2009. - V. 20. - № 9-10. - P. 644-653.
112. Shevchenko A.I., Zakharova I.S., Elisaphenko E.A., Kolesnikov N.N., Whitehead S., Bird C., Ross M., Weidman J.R., Jirtle R.L., Karamysheva T.V., Rubtsov N.B., VandeBerg J.L., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. Genes flanking Xist in mouse and human are separated on the X chromosome in American marsupials // *Chromosome Res.* - 2007. - V. 15. - № 2. - P. 127-136.
113. Silva J., Mak W., Zvetkova I., Appanah R., Nesterova T.B., Webster Z., Peters A.H., Jenuwein T., Otte A.P., Brockdorff N. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes // *Dev. Cell* - 2003. - V. 4. - № 4. - P. 481-495.
114. Smallwood A., Esteve P.O., Pradhan S., Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing // *Genes Dev.* - 2007. - V. 21. - № 10. - P. 1169-1178.
115. Smith K.P., Byron M., Clemson C.M., Lawrence J.B. Ubiquitinated proteins including uH2A on the human and mouse inactive X chromosome: enrichment in gene rich bands // *Chromosoma* - 2004. - V. 113. - № 6. - P. 324-335.
116. Solari A.J., Bianchi N.O. The synaptic behaviour of the X and Y chromosomes in the marsupial *Monodelphis dimidiata* // *Chromosoma* - 1975. - V. 52. - № 1. - P. 11-25.

117. Strumpf D., Mao C.A., Yamanaka Y., Ralston A., Chawengsaksophak K., Beck F., Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst // *Development* - 2005. - V. 132. - № 9. - P. 2093-2102.
118. Sugawara O., Takagi N., Sasaki M. Allocyclic early replicating X chromosome in mice: genetic inactivity and shift into a late replicator in early embrogenesis // *Chromosoma* - 1983. - V. 88. - № 2. - P. 133-138.
119. Takagi N., Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse // *Nature* - 1975. - V. 256. - № 5519. - P. 640-642.
120. Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., Nagy A., Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4 // *Science* - 1998. - V. 282. - № 5396. - P. 2072-2075.
121. Thorvaldsen J.L., Verona R.I., Bartolomei M.S. X-tra! X-tra! News from the mouse X chromosome // *Dev. Biol.* - 2006. - V. 298. - № 2. - P. 344-353.
122. Turner J.M. Meiotic sex chromosome inactivation // *Development* - 2007. - V. 134. - № 10. - P. 1823-1831.
123. Turner J.M., Aprelikova O., Xu X., Wang R., Kim S., Chandramouli G.V., Barret J.C., Burgoyne P.S., Deng C.X. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation // *Curr. Biol.* - 2004. - V. 14. - № 23. - P. 2135-2142.
124. Turner J.M., Burgoyne P.S., Singh P.B. M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis // *J. Cell Sci.* - 2001. - V. 114. - № Pt 18. - P. 3367-3375.
125. Turner J.M., Mahadevaiah S.K., Elliott D.J., Garchon H.J., Pehrson J.R., Jaenisch R., Burgoyne P.S. Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist // *J. Cell Sci.* - 2002. - V. 115.- № Pt 21. - P. 4097-4105.
126. van Attikum H., Gasser S.M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? // *Nat .Rev. Mol. Cell Biol.* - 2005. - V. 6. - № 10. - P. 757-765.
127. van der Heijden G.W., Derijck A.A., Posfai E., Giele M., Pelczar P., Ramos L., Wansink D.G., van derVlag J., Peters A.H., de Boer P. Chromosome-wide

- nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation // *Nat. Genet.* - 2007. - V. 39. - № 2. - P. 251-258.
128. van der Heijden G.W., Derijck A.A., Ramos L., Giele M., van derVlag J., de Boer P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin // *Dev. Biol.* - 2006. - V. 298. - № 2. - P. 458-469.
129. VandeBerg J.L., Cooper D.W. and Sharman G.B. Phosphoglycerate kinase A polymorphism in the wallaby *Macropus parryi*: activity of both X chromosomes in muscle // *Nat. New Biol.* - 1973. - V. 243. - № 123. - P. 47-48.
130. Verschure P.J., van der Kraan I., de Leeuw W., van derVlag J., Carpenter A.E., Belmont A.S., van Driel R. In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation // *Mol. Cell Biol.* - 2005. - V. 25. - № 11. - P. 4552-4564.
131. Vigodner M. Sumoylation precedes accumulation of phosphorylated H2AX on sex chromosomes during their meiotic inactivation // *Chromosome Res.* - 2009. - V. 17. - № 1. - P. 37-45.
132. Wang P.J. X chromosomes, retrogenes and their role in male reproduction // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2004. - V. 15. - № 2. - P. 79-83.
133. Wang P.J., Page D.C., McCarrey J.R. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse // *Hum. Mol. Genet.* - 2005. - V. 14. - № 19. - P. 2911-2918.
134. Wongtawan T., Taylor J.E., Lawson K.A., Wilmut I., Pennings S. Histone H4K20me3 and HP1 α are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells // *J. Cell Sci.* - 2011. - V. 124. - № Pt11. - P. 1878-1890.
135. Wutz A., Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation // *Mol. Cell* - 2000. - V. 5. - № 4. - P. 695-705.
136. Yamamoto K., Sonoda M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2003. - V. 301. - № 2. - P. 287-292.

137. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Shilov A.G., Nesterova T.B., VandeBerg J.L., Zakian S.M. Histone H3 trimethylation at lysine 9 marks the inactive metaphase X chromosome in the marsupial *Monodelphis domestica* // *Chromosoma* – 2011 - V. 120. - № 2. - P. 177-183.
138. Zhang L.F., Huynh K.D. and Lee J.T. Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing // *Cell* - 2007. - V. 129. - № 4. - P. 693-706.
139. Zuccotti M., Boiani M., Ponce R., Guizzardi S., Scandroglio R., Garagna S., Redi C.A. Mouse Xist expression begins at zygotic genome activation and is timed by a zygotic clock // *Mol. Reprod. Dev.* - 2002. - V. 61. - № 1. - P. 14-20.