

На правах рукописи

**Васькова Евгения Андреевна**

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

**03.02.07 – генетика**

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

**Новосибирск 2014**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук в лаборатории эпигенетики развития, г. Новосибирск.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией эпигенетики развития  
**Закиян Сурен Минасович**

**Официальные оппоненты:** **Баранов Владислав Сергеевич**  
член-корр. РАН, доктор медицинских наук,  
профессор, заведующий лабораторией  
пренатальной диагностики врожденных и  
наследственных болезней, ФГБУ «Научно-  
исследовательский институт акушерства и  
гинекологии им. Д.О.Отта» СЗО РАН, г.  
Санкт-Петербург

**Беляева Елена Сергеевна**  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
молекулярной цитогенетики, ФГБУН Институт  
молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г.  
Новосибирск

**Ведущее учреждение:** ФГБУН Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова  
РАН

Защита диссертации состоится «23» апреля 2014 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090  
тел/факс: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;  
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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.

**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 мышцы *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.

**Основные положения работы, выносимые на защиту.**

1. Ранние этапы импринтированной инактивации X-хромосомы у полевки и мыши характеризуются уникальным спектром и паттерном распределения модификаций неактивного хроматина, отличных от последующих этапов импринтированной и случайной форм инактивации X-хромосомы;
2. При случайной инактивации неактивной X-хромосомы у крысы выявляется два типа гетерохроматина, отличающихся по набору

модификаций гистонов и ассоциированные с различными последовательностями X-хромосомы.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2008 г., 2009 г.), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2009 (Москва, 2009 г.), третьей международной конференции по инактивации X-хромосомы (Оксфорд, 2011 г.), на международной конференции «Хромосома 2009», «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2009 г., 2012 г.), семинарах и отчетных сессиях Института цитологии и генетики СО РАН. По материалам диссертации опубликованы три работы. Две статьи – в рецензируемых отечественном и зарубежном журналах из списка ВАК, глава в коллективной монографии.

**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

**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.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**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 процессе импринтированной инактивации были изучены в трофобластных стволовых (ТС) клетках у двух видов грызунов: полевки *M. levis* и мыши *M. musculus*. Линия ТС клеток мыши (полученная от гибридной самки от скрещивания двух линий мышей: C57Bl6 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. Линия ТС клеток полевки *M. levis* и эмбриональных фибробластов крысы *R. norvegicus* были получены в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН.

### **2. Методы работы с клеточными культурами**

**2.1 Условия культивирования.** Клетки культивировали при 37<sup>0</sup>C в атмосфере 5% углекислого газа. Пересев ТС клеток и фибробластов производили каждые 3-4 дня, в зависимости от плотности клеток. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (phosphate-buffered saline: PBS) (1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2), после чего добавляли 0,05 % для ТС клеток и 0,25% для фибробластов раствор трипсина 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  $10^4/\text{см}^2$ .

## **2.2 Получение культур клеток**

**2.2.1 Получение ТС клеток полевки.** ТС клетки полевки получали согласно протоколу, описанному в работе Tanaka *et al.*, 1998.

**2.2.2 Получение первичных эмбриональных фибробластов 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  $\text{CO}_2$  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  $50\text{--}75 \text{ см}^2$ ).

**3. 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  $4^\circ\text{C}$  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.

**4. Приготовление препаратов ядер и 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. Для приготовления препаратов ядер культура предварительно не обрабатывалась. Метафазные клетки или тотально клеточная культура (для приготовления препаратов ядер) собиралась в коническую пробирку 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  $4^\circ\text{C}$  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.

**5. Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов мейотических и постмейотических стадий сперматогенеза, ядер и метафазных хромосом.**

Препараты ядер и 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  $4^\circ\text{C}$ ) и 40 мин. со вторыми антителами. 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.

**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 (Department of Biology II, Humanbiology and Bioimaging, Center for Integrated Protein Science Munich, Ludwig Maximilians University Germany). 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 0.1M 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 4×SSC/0,1% Tween-20.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В диссертационной работе для исследования были выбраны следующие модификации неактивного хроматина: триметилированные формы H3K9, H4K20, H3K27, также uH2A и гетерохроматиновый белок HP1 ( $\gamma$  и  $\beta$  изоформы), поскольку, ранее была показана их вовлеченность в формирование неактивной структуры хроматина X-хромосомы у ряда представителей млекопитающих.

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

Иммунофлуоресцентное окрашивание мейотических препаратов, приготовленных из семенников половозрелых самцов *M. levis* показало, что на стадии пахитены в процессе мейотического сайленсинга с X-хромосомой в составе полового тельца ассоциированы триметилированный H3K9, uH2A и гетерохроматиновый белок HP1. Здесь и далее, если не указана конкретная изоформа гетерохроматинового белка HP1, значит результаты справедливы для обеих изоформ. Иллюстрации приведены для  $\gamma$  изоформы белка HP1. Стадия пахитены была маркирована окраской антителами к белку SCP3 – осевого элемента синаптонемного комплекса. Триметилированный H3K9 и HP1 сохраняются также на постмейотических стадиях (на стадии округлых сперматид) (Рисунок 1А, Б). На мейотических и постмейотических стадиях развития мы выявили отсутствие обогащения, в большинстве ядер – даже исключение триметилированных H3K27 (иллюстрация не приведена) и H4K20 из



области хроматина половых хромосом (Рисунок 1В, Г). В целом, картина спектра модификаций неактивного хроматина, ассоциированных с половыми хромосомами в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга 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 свидетельствует о консервативности данного процесса.

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

В качестве модели для изучения модификаций неактивного хроматина X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации были выбраны ТС клетки, т.к. они являются первой клеточной популяцией предимплантационного эмбриона и, вероятно, отражают начальные этапы процесса импринтированной инактивации. На первом этапе была получена стабильная линия недифференцированных ТС клеток самки полевки *M. levis*. Принадлежность полученных клеток к ТС была подтверждена ОТ-ПЦР анализом, который выявил экспрессию генов, ответственных за развитие по трофобластическому 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). Также была показана экспрессия генов *Xist* и *Tsix*, что свидетельствует о наличии двух X-хромосом в культуре: одной неактивной и одной активной, соответственно. Иммунофлуоресцентный анализ метафазных хромосом ТС клеток полевок показал, что на неактивной X-хромосоме выявляется обогащение триметилированных форм H3K9, H4K20, а также HP1 и uH2A (Рисунок 2). Данные модификации распределены равномерно вдоль неактивной X-хромосомы и выявляются также в районах конститутивного гетерохроматина. Было отмечено, что в ~50% случаев данные модификации выявляются также в гетерохроматиновом блоке активной X-хромосомы, что может свидетельствовать о том, что формирование гетерохроматинового блока на активной X-хромосоме является более поздним событием по сравнению с другими гетерохроматиновыми районами. Таким образом, у полевки на ранних этапах процесса импринтированной инактивации в хроматине X-хромосомы выявляется уникальный спектр и паттерн модификаций хроматина. Данная структура неактивного хроматина отличается от спектра и паттерна, описанного для неактивной X-хромосомы *M. levis* на более поздних стадиях импринтированной инактивации (в клетках экстраэмбриональной эндодермы) и случайной инактивации (в эмбриональных фибробластах (Shevchenko *et al.*, 2009). Особо стоит отметить тот факт, что uH2A выявляется не только на неактивной X-хромосоме, но и в районах конститутивного гетерохроматина. Принимая во внимание, что в ТС самца *M. levis* с хроматином Y-хромосомы, полностью состоящим из гетерохроматина (Закиян *и др.*, 1991) также ассоциирован uH2A (Рисунок 3), можно предположить, что данный спектр модификаций в раннем эмбриогенезе обуславливает не столько специфическую инактивацию X-хромосомы, сколько представляет собой общий механизм формирования неактивного хроматина на данных стадиях развития.

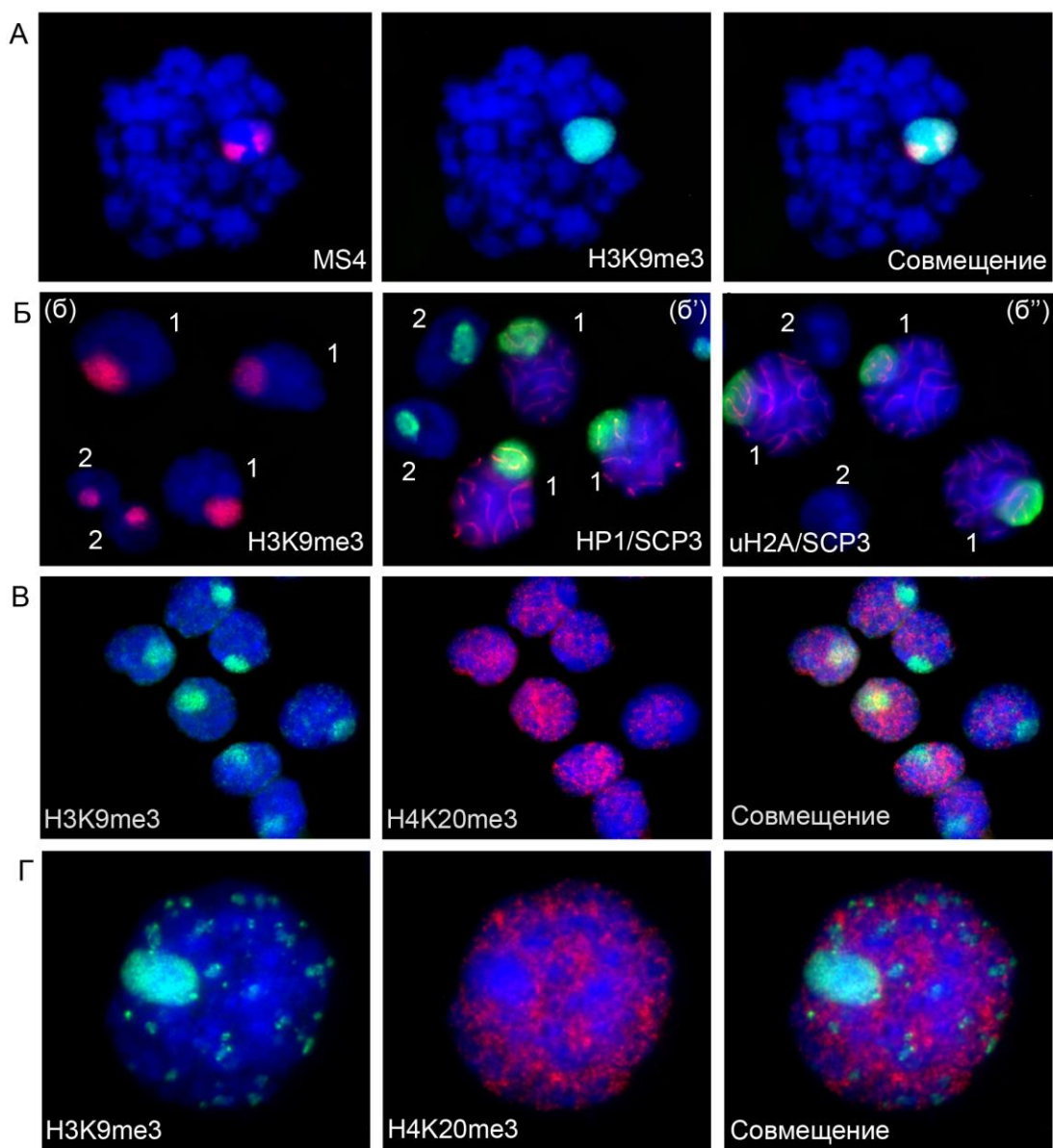


Рисунок 1. Модификации неактивного хроматина X- и Y-хромосом на мейотических и постмейотических стадиях сперматогенеза у полевки *M. levis*. (А). Флуоресцентная *in situ* гибридизация с зондом на повтор MS4 совместно с иммуофлуоресцентным окрашиванием мейотических препаратов антителами к триметилированному H3K9; (Б) (б) Иммуофлуоресцентное окрашивание мейотических препаратов антителами к триметилированному H3K9. (Б) Коиммуофлуоресцентное 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 иммуофлуоресцентного окрашивания мейотических препаратов антителами к триметилированному H4K20. На панели (Г) продемонстрировано коиммуофлуоресцентное окрашивание антителами к триметилированному H3K9 (зеленый) и триметилированному H4K20 (красный), демонстрирующее исключение триметилированного H4K20 из района половых хромосом. Для общего окрашивания ядер использовали DAPI.

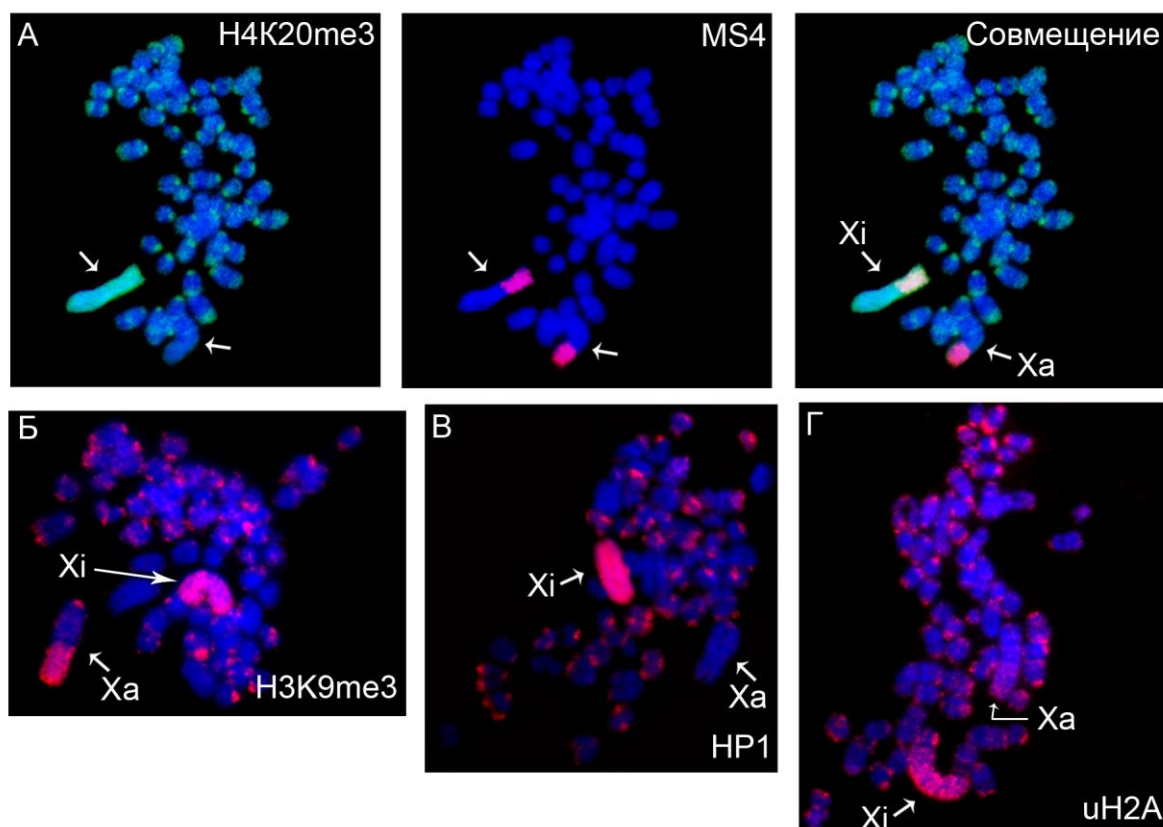


Рисунок 2. Модификации неактивного хроматина X-хромосомы в недифференцированных ТС клетках полевки *M. levis*.

(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 (Б) триметилированному H3K9; (В) HP1; (Г) uH2A.

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

Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

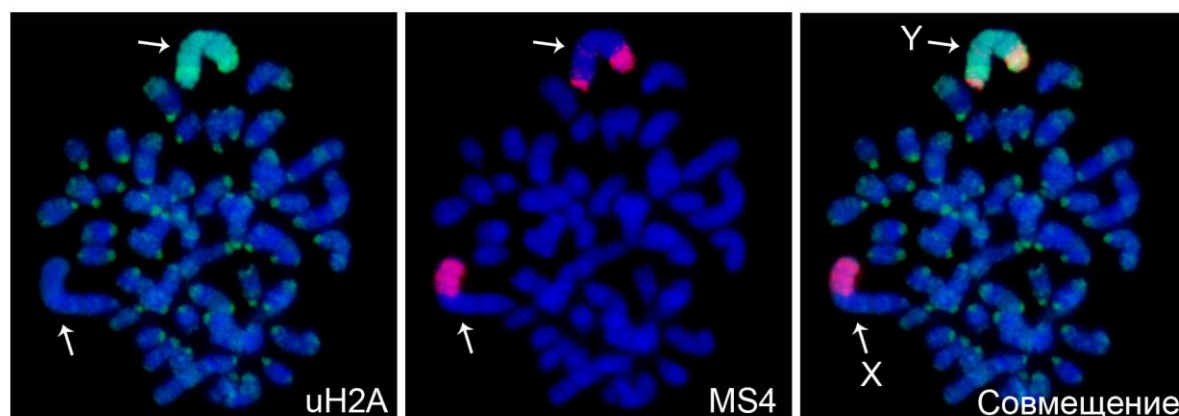


Рисунок 3 Иммунофлуоресцентный анализ препаратов метафазных хромосом недифференцированных ТС клеток самцов полевки *M. levis* антителами к uH2A (зеленый) с последующей флуоресцентной гибридизацией *in situ* с зондом на повтор MS4 (красный). Для общего окрашивания хромосом использовали DAPI.

### 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 у полевки *M. levis* 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 (fibroblast growth factor) и гепарина. В результате, было показано, что на 4-5 день дифференцировки в ~90% ядер на неактивной X-хромосоме выявляется аккумуляция белка EED – компонента PRC2 комплекса, ответственного за триметилирование H3K27. За аккумуляцией белка EED следует установление триметилированного H3K27 в G-негативных районах неактивной X-хромосомы, что сопровождается перераспределением uH2A исключительно в G-негативные районы неактивной X-хромосомы (Рисунок 4). 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.

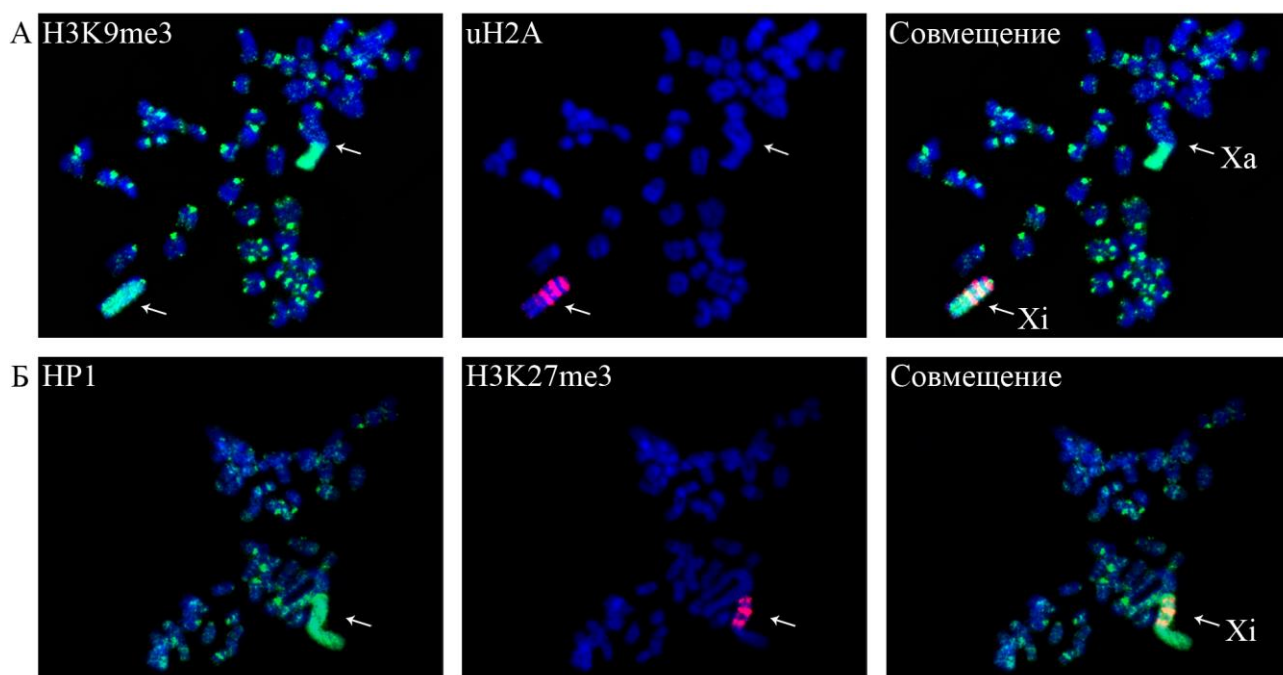


Рисунок 4. Аккумуляция триметилированного H3K27 на неактивной X-хромосоме сопровождается перераспределением модификаций неактивного хроматина вдоль хромосомы. Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов метафазных хромосом ТС клеток полевки в процессе дифференцировки антителами к: (А) триметилированному 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.

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.

#### **4. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у мыши *Mus musculus***

Известно, что у мыши в ТС клетках самки хроматин неактивной X-хромосомы обогащен модификациями гетерохроматина первого типа (триметилированный H3K27/uH2A), однако данных об участии модификации второго типа (триметилированные H4K20, H3K9 и HP1) в формировании неактивной структуры не было. Для того чтобы ответить на данный вопрос, мы проанализировали препараты метафазных пластинок ТС клеток самки мыши на ранних пассажах. В результате, было показано, что в 10% анализируемых препаратов метафазных хромосом мыши неактивная X-хромосома ассоциирована с триметилированным H3K9, который распределен равномерно вдоль X-хромосомы (Рисунок 5А). В 30% метафазных пластинок было обнаружено совместное присутствие маркеров обоих типов гетерохроматина: триметилированных H3K9 и H3K27 (Рисунок 5Б). На большинстве метафазных пластинок структура неактивной X-хромосомы представлена ассоциацией с триметилированным H3K27, тогда как распределение триметилированного H3K9 ограничено только районами конститутивного гетерохроматина (Рисунок 5В).

Таким образом, в данной работе впервые было показано, что на ранних этапах импринтированной инактивации в недифференцированных ТС клетках у мыши в формировании неактивной структуры X-хромосомы принимают участие модификации гетерохроматина второго типа.

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

Ранее было показано, что при случайной инактивации в соматических тканях человека, коровы, полевки модификации хроматина на неактивной X-хромосоме формируют два типа гетерохроматина, которые ассоциированы с различными типами G-бэндов и отличаются по времени репликации в поздней S-фазе (Chadwick, Willard, 2004; Coppola *et al.*, 2008; Shevchenko *et al.*, 2009), тогда как у мыши в формировании неактивного хроматина X-хромосомы вовлечен только один тип гетерохроматина, образованный триметилированным H3K27 и uH2A (Rens *et al.*, 2010). Чтобы составить более полную картину о модификациях хроматина, вовлеченных в формирование неактивного хроматина X-хромосомы при случайной инактивации у грызунов было решено проанализировать модификации хроматина неактивной X-хромосомы у крысы *R. norvegicus*. Так, иммунофлуоресцентный анализ препаратов метафазных хромосом эмбриональных фибробластов самки крысы, где произошел процесс случайной инактивации, показал, что структура хроматина неактивной X-хромосомы

образована двумя типами гетерохроматина, ассоциированные с различными районами X-хромосомы (Рисунок 6). Первый тип представлен триметилированным H3K27 и uH2A, второй – триметилированным H3K9 и HP1 (иллюстрация не представлена). Таким образом, полученные данные свидетельствует о едином принципе поддержания неактивного состояния при случайной инактивации X-хромосомы у большинства изученных представителей инфракласса млекопитающих.

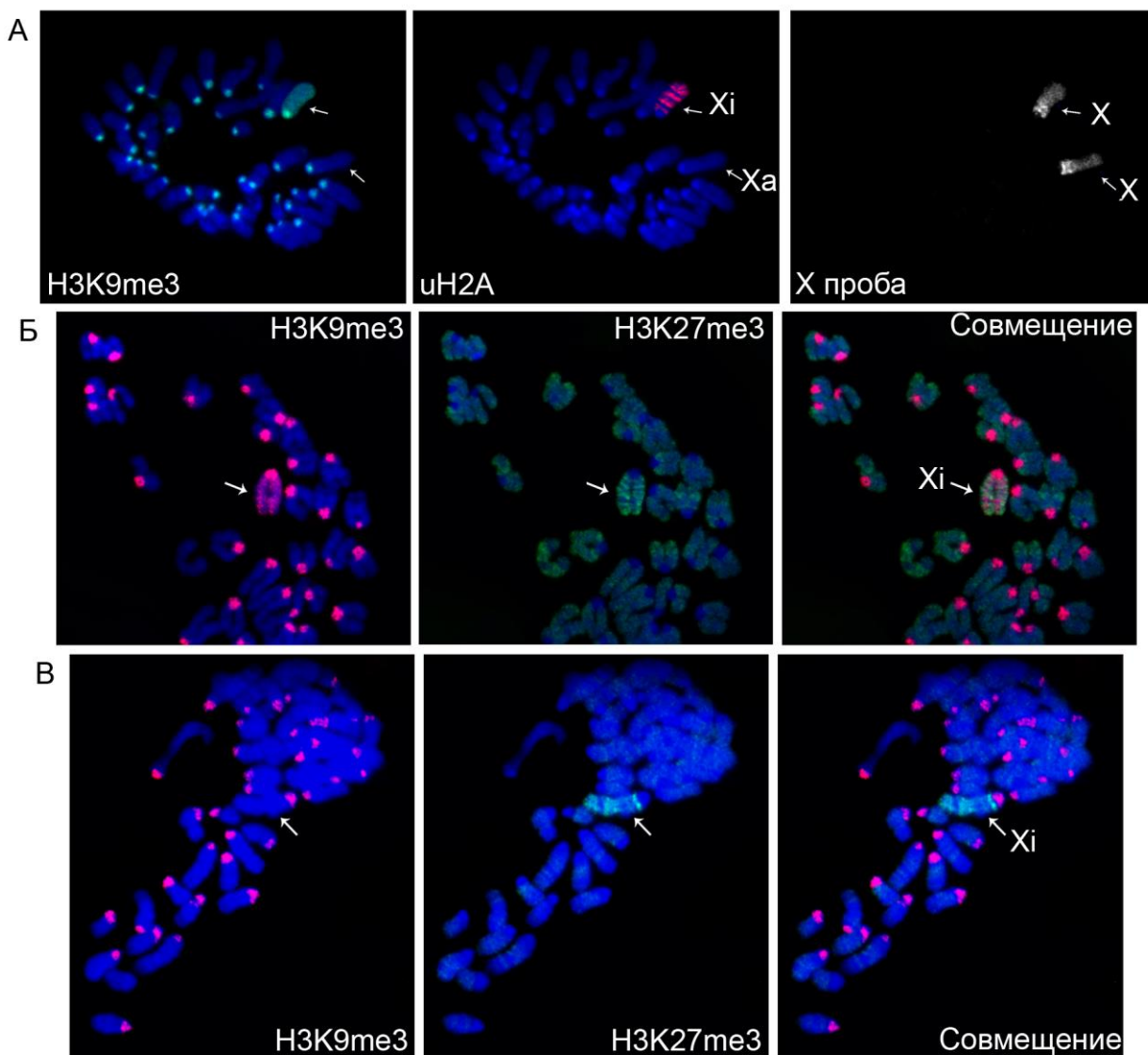


Рисунок 5. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы в процессе импринтированной инактивации у мыши.

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.

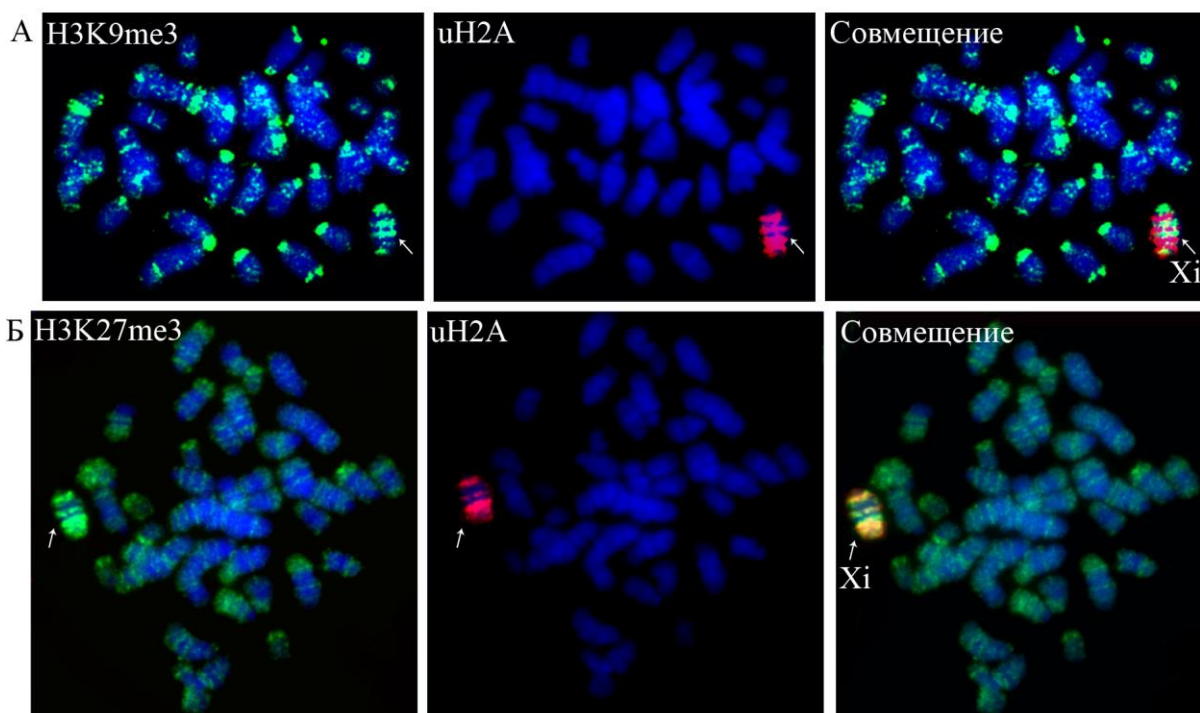


Рисунок 6. Модификации хроматина неактивной X-хромосомы при случайной инактивации у крысы.

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

Xi – неактивная

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 MSC1 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 MSC1 и PMSC высоко консервативен.

При изучении модификаций неактивного хроматина, ассоциированных с X-хромосомой в ТС 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 и HP1. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Васькова Е.А.**, Павлова С.В., Шевченко А.И., Закиян С.М. Мейотическая инактивация половых хромосом у млекопитающих // Генетика – 2010. - Т. 46. - №4 .стр. 437- 447
2. **Васькова Е.А.**, Шевченко А.И, Павлова С.В., Закиян С.М Мейотическая инактивация половых хромосом // 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 - V. 9(2): e88256.
4. **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
5. **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
6. **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
7. **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
8. **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
9. 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
10. **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
11. **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», г. Новосибирск, 2012, стр.64

Подписано к печати 20.02.2014 г.

Формат бумаги 60×90 1/16 Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7

Тираж 110 экз. Заказ №

---

Отпечатано на полиграфической базе ИЦиГ СО РАН

630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10