

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

АРССАН МХД АМИН

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА
X-ХРОМОСОМ В КУЛЬТУРАХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Шевченко Александр Игоревич,

Новосибирск – 2026

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ	5
Цель и задачи работы	6
Научная новизна	6
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ	7
ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ	7
Личный вклад автора	7
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ И ПУБЛИКАЦИИ	7
СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 ПРАЙМИРОВАННЫЕ И НАИВНЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА	9
1.2 КУЛЬТУРЫ НАИВНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ И ТОТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ИНДУКЦИЯ И ПОДДЕРЖАНИЕ	11
1.3 ОСОБЕННОСТИ НАИВНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ	15
1.4 КЛЮЧЕВЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРАЙМИРОВАННЫХ И НАИВНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК	19
1.5 КОМПЕНСАЦИЯ ДОЗЫ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ	22
1.5.1 Некодирующая РНК гена XIST и её роль в дозовой компенсации у человека	26
1.5.2 Сплайсинг транскрипта XIST	27
1.5.3 Модификации неактивной X-хромосомы	29
1.5.4 Гетерогенность эпигенетического состояния X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ	43
2.1.1 Клеточные линии, использованные в исследовании	43
2.1.2 Культивирование праймированных плюрипотентных стволовых клеток человека	43
2.1.3 Культивирование ПСКч на матригле	44
2.1.4 Замораживание ПСКч	44
2.1.5 Размораживание ПСКч	44
2.1.6 Индукция наивного состояния	44
2.2 ОКРАШИВАНИЕ НА ЩЕЛОЧНУЮ ФОСФАТАЗУ	45
2.3 ПРОТОКОЛ ФИКСАЦИИ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ	45
2.4 ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ПОМОЩЬЮ STR-АНАЛИЗА	46
2.5 ТЕСТИРОВАНИЕ КУЛЬТУР НА КОНТАМИНАЦИЮ МИКОПЛАЗМОЙ И НАЛИЧИЕ ЭПИСОМ	46
2.6 БЕЛКОВЫЙ ИММУНОБЛОТ	46
2.7 ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ	47
2.8 ТЕСТ НА СПОСОБНОСТЬ ФОРМИРОВАТЬ БЛАСТОИДЫ	49
2.9 СПОНТАННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПСКч	50
2.10 ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НАИВНЫХ ПСКч В ПРОИЗВОДНЫЕ ТРОФОБЛАСТА	50
2.11 ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПСКч В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ	51
2.12 ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ (FACS)	51
2.13 ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК	52
2.14 ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ И РНК FISH	52
2.15 ДЕТЕКЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ГЕНОВ X-ХРОМОСОМЫ ЛИНИИ HUES9	54
2.16 ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЕ	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	58
3.1 ПОЛУЧЕНИЕ НАИВНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК	58
3.2 АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КУЛЬТУРАХ HENSM МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ	61
3.3 АНАЛИЗ ХРОМОСОМНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ НАИВНЫХ ПСКч	62

3.4	ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА X-ХРОМОСОМ В ПРАЙМИРОВАННЫХ, НАИВНЫХ И ПОВТОРНО ПРАЙМИРОВАННЫХ ПСК	64
3.5	ПСК С ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИ ЭКВИВАЛЕНТНЫМИ X-ХРОМОСОМАМИ СПОСОБНЫ ВОСПРОИЗВОДИТЬ СЛУЧАЙНУЮ ИНАКТИВАЦИЮ	66
3.6	ПСК С ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИ ЭКВИВАЛЕНТНЫМИ X-ХРОМОСОМАМИ СПОСОБНЫ ВОСПРОИЗВОДИТЬ СЛУЧАЙНУЮ ИНАКТИВАЦИЮ	68
3.7	ИНГИБИТОР КИНАЗЫ SRC И СТАТУС X-ХРОМОСОМ В ПСКЧ	70
	3.7.1 Влияние ингибирования сигнального пути SRC-киназы на статус X-хромосом и способность к инактивации наивных ПСКЧ	70
	3.7.2 Влияние ингибирования сигнального пути SRC-киназы на статус X-хромосом в праймированных ПСКЧ	72
3.8	ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ ПРАЙМИРОВАННЫХ ИПСКЧ В СРЕДЕ iLF	76
	3.8.1 Динамика экспрессии XIST при культивировании праймированных линий ИПСКЧ с эрозией инактивации в среде iLF	77
	3.8.2 Влияние хемокина CCL2 на свойства линий праймированных ПСКЧ и эпигенетический статус X-хромосом	80
3.9	ИСКЛЮЧЕНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА ИЗ СРЕДЫ HENSM ОБОГАЩАЕТ КУЛЬТУРУ ПСКЧ КЛЕТКАМИ, ПОДОБНЫМИ ТОТИПОТЕНТНЫМ, И ВОЗВРАЩАЕТ СПОСОБНОСТЬ К СЛУЧАЙНОЙ ИНАКТИВАЦИИ	88
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ		92
4.1	ИНДУКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НАИВНОЙ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В СРЕДЕ HENSM	92
4.2	ДИНАМИКА X-ХРОМОСОМЫ ПРИ ПЕРЕХОДЕ МЕЖДУ НАИВНЫМ И ПРАЙМИРОВАННЫМ СОСТОЯНИЯМИ: РЕАКТИВАЦИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ	94
4.3	ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ АСИММЕТРИЯ РЕАКТИВИРОВАННЫХ X-ХРОМОСОМ В ПОЛУЧЕННЫХ НАИВНЫХ ПСКЧ	96
4.4	КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ИНГИБИРОВАНИЯ SRC-КИНАЗЫ В КОНТРОЛЕ НАД ИНАКТИВАЦИЕЙ X-ХРОМОСОМЫ В НАИВНЫХ ПСКЧ	98
4.5	ВОССТАНОВЛЕНИЕ XCI В ПРАЙМИРОВАННЫХ ПСКЧ С ЭРОЗИЕЙ: СИНЕРГИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ LIF, FGF2 И ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ SRC	99
4.6	ПСКЧ С ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИ ЭКВИВАЛЕНТНЫМИ X-ХРОМОСОМАМИ СПОСОБНЫ К СЛУЧАЙНОЙ ИНАКТИВАЦИИ	101
4.7	КОМПЕТЕНТНОСТЬ К ВОССТАНОВЛЕНИЮ СЛУЧАЙНОЙ ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ В КУЛЬТУРАХ НАИВНЫХ ПСКЧ КОРРЕЛИРУЕТ С ДОЛЕЙ КЛЕТОК, ПЕРЕХОДЯЩИХ В СОСТОЯНИЕ, ПОДОБНОЕ ТОТИПОТЕНТНОМУ	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		103
БЛАГОДАРНОСТИ		106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		107

Список сокращений

8CLCs – 8С-подобные тотипотентные клетки (8-cell-like cells)
FGF2 – основной фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor 2)
BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)
DAPI – ядерный краситель (4',6-diamidino-2-phenylindole)
FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization)
H3K27me3 – триметилирование лизина 27 гистона H3
H3K4me2 – диметилирование лизина 4 гистона H3
HENSM – усовершенствованная среда для наивных плюрипотентных стволовых клеток человека (human enhanced naïve stem cell media)
KoSR – заменитель сыворотки (knockout serum replacement)
LIF – фактор, ингибирующий лейкемию (leukemia inhibitory factor)
PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)
SRCi – ингибитор киназ **SRC**
Xa – активная X-хромосома
XCI – инактивация X-хромосомы (X chromosome inactivation)
Xd – X-хромосома с демпфированием транскрипции
Xe – X-хромосома с зрозией инактивации
Xi – неактивная X-хромосома
XIST – специфический транскрипт неактивной X-хромосомы (X inactive specific transcript)
ZGA – зиготическая активация генома (zygotic genome activation)
ВКМ – внутренняя клеточная масса (бластоцисты)
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИПСКч – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека
кДНК – комплементарная ДНК
п.н. – пара нуклеотидов
ПСКч – плюрипотентные стволовые клетки человека
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
ЭСКч – эмбриональные стволовые клетки человека
ЭК – эндотелиальные клетки

Введение

Актуальность работы

Плюрипотентные стволовые клетки человека (ПСКч) используют в фундаментальной науке и медицине для исследования процессов раннего развития, моделирования заболеваний, поиска новых лекарств и разработки подходов к клеточной терапии. ПСКч могут превращаться практически в любой тип клеток взрослого организма, давая надежду на регенерацию тканей и коррекцию генетических заболеваний (Hayashi et al. 2017; Kikuchi et al. 2017). Культуры ПСКч отражают эмбриональное развитие, обеспечивая экспериментальный доступ к процессам, которые недостижимы в условиях *in vivo*.

К ПСКч относят эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – производные эмбрионов на стадии бластоцисты и индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК), создаваемые путём репрограммирования зрелых соматических клеток к плюрипотентному состоянию (Zhou et al. 2023). Различают также наивные ПСКч, соответствующие ранним стадиям преимплантационного развития, и праймированные ПСКч, отражающие постимплантационные стадии эмбриогенеза. Наивные ПСКч обладают бóльшим потенциалом к дифференцировке и способны воспроизводить более широкий спектр процессов раннего развития, но их использование в биомедицине ограничено из-за кариотипической и эпигенетической нестабильности. Праймированные ПСКч *in vitro* представляют собой стабильные, длительно культивируемые линии, производные которых на начало 2026 года вовлечены в ~120 зарегистрированных клинических исследований (Kirkeby et al. 2025). Однако ни наивные, ни праймированные ПСКч не способны в полной мере воспроизводить ключевой эпигенетический процесс раннего развития – инактивацию X-хромосомы (XCI), при которой одна из двух X-хромосом в женских клетках становится транскрипционно неактивной и стабильно поддерживается в инактивированном состоянии. Более того, культивируемые линии ПСКч и их дифференцированные производные очень часто имеют нарушения инактивации X-хромосомы. Проблемой праймированных ПСКч является эрозия XCI – неспособность клеток стабильно поддерживать неактивное состояние X-хромосомы, нередко сопровождающаяся реактивацией X-сцепленных генов (Mekhoubad et al. 2012). Возникнув, эрозия усугубляется и передается в дифференцированные производные. В наивных ПСКч неактивная X-хромосома реактивируется, но повторный запуск XCI при дифференцировке возможен лишь для некоторых протоколов получения наивных ПСКч (Vallot et al. 2017). Кроме того, ни один протокол в полной мере не обеспечивает случайную XCI, так как одна из X-хромосом сохраняет эпигенетическую память, вызывающую её преимущественную инактивацию. В результате в культурах ПСКч и их производных наблюдается гетерогенность эпигенетического состояния X-хромосом, зачастую сопровождающаяся дисбалансом дозы X-сцепленных генов, которая проявляется повышением экспрессии ряда онкогенов, неблагоприятными метаболическими изменениями, а также нарушениями созревания клеток, в частности, иммунной и нервной систем.

Нестабильный статус X-хромосом и негативные последствия от нарушения инактивации затрудняют получение адекватных научных результатов при исследовании ПСКч в биомедицинских исследованиях, а также тормозят разработку подходов к их использованию в регенеративной медицине. Это делает особо актуальным выяснение механизмов инактивации X-хромосомы в клетках человека, причин нестабильности эпигенетического статуса X-хромосом и поиск способов управлять статусом X-хромосом при культивировании линий ПСКч.

Цель и задачи работы

Цель диссертационной работы – поиск подходов к регуляции эпигенетического статуса X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека.

Задачи:

1. Исследовать влияние среды HENSM на состояние X-хромосом в наивных плюрипотентных стволовых клетках человека и их праймированных плюрипотентных производных.
2. Выявить ключевые компоненты культуральных сред (ростовые факторы и ингибиторы киназ), позволяющие перезапускать инактивацию X-хромосомы при возврате наивных плюрипотентных стволовых клеток человека в праймированное состояние.
3. Выяснить возможности применения ростовых факторов и ингибиторов киназ, используемых в средах для наивных клеток, для контроля эпигенетического статуса X-хромосомы в праймированных плюрипотентных стволовых клетках человека.
4. Определить условия, позволяющие воспроизводить процесс случайной инактивации X-хромосомы человека на клеточных моделях.

Научная новизна

В данном исследовании впервые показано, что ингибитор киназ SRC является ключевым фактором, позволяющим наивным ПСКч осуществлять процесс инактивации X-хромосомы при переходе в праймированное состояние или при дифференцировке. Впервые установлено, что сочетание сигнальных путей SRC, LIF и FGF2 позволяет восстанавливать экспрессию гена *XIST* и обогащение неактивной X-хромосомы репрессивной меткой H3K27me3, эффективно исправляя эрозию инактивации X-хромосомы. Впервые продемонстрировано, что способностью к случайной инактивации обладают культуры клеток человека, совершившие переход из состояния наивной плюрипотентности к тотипотентности. Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на сигнальные пути, управляющие эпигенетической регуляцией X-хромосом, и открывают перспективы для оптимизации условий культивирования ПСКч, способных обеспечивать сохранение плюрипотентности и эпигенетическую стабильность.

Теоретическая и практическая значимость работы

Эта работа раскрывает новые механизмы эпигенетической регуляции X-хромосомы в ПСКч как в наивном, так и в праймированном состояниях. Выявлены ключевые компоненты культуральной среды, обеспечивающие реализацию механизмов инактивации X-хромосомы и возможности коррекции состояния эрозии. Полученные данные формируют необходимую теоретическую и методическую базы для разработки стандартизированных систем культивирования ПСКч со стабильным статусом X-хромосом, что имеет значение для повышения надёжности и воспроизводимости результатов при моделировании патологических процессов, скрининге лекарственных препаратов и реализации задач трансляционной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ингибитор киназ SRC является фактором, обеспечивающим способность культивируемых плюрипотентных стволовых клеток человека к инактивации X-хромосомы.
2. Способностью к случайному выбору X-хромосомы для инактивации обладают культивируемые клетки человека, совершившие переход от ранней (наивной) плюрипотентности в состояние, близкое к тотипотентному.

Личный вклад автора

Автор участвовал в выполнении всех этапов диссертационной работы, а также в анализе, представлении и публикации экспериментальных данных. Автор самостоятельно проводил получение и характеристику наивных ПСКч, исследовал роль и возможности применения ингибитора киназ SRC для регуляции эпигенетического статуса X-хромосом в ПСКч. Эксперименты по характеристике эпигенетического состояния X-хромосом с помощью комбинации методов иммунофлуоресценции и РНК FISH, иммунофлуоресцентное окрашивание метафазных хромосом, получение трофобластных производных ПСКч и бластоидов проводились совместно с к.б.н. А. И. Шевченко. Направленная дифференцировка ПСКч в эндотелиальные производные, характеристика их свойств и эксперименты по проточной цитометрии осуществлялись с участием к.б.н. И.С. Захаровой. Цитогенетический анализ культур ПСКч выполнен к.б.н. Ю.А. Мининой.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. **Арссан М.А.** Проблемы эпигенетической гетерогенности плюрипотентных стволовых клеток человека и их значение для биомедицинских исследований. Конференция "Новые подходы к генетической диагностике, лечению и профилактике частых наследственных заболеваний в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре" в рамках проекта "Югра-ген – 2022", Россия.

2. Шевченко А.И., **Арссан М.А.**, Д.Е. Поливцев, С.П. Медведев, С.М. Закиян, И.С. Захарова
Наивные плюрипотентные стволовые клетки человека: моделирование заболеваний и CRISPR-технологии, 11 – 13 сентября 2023, Новосибирск, Россия.
3. **Arssan M.A.** Regulation of the epigenetic status of X chromosome in human naïve pluripotent stem cells. "Wurzburg 3R Initiative WI3R" in Fraunhofer Translational Center –Regenerative medicine TLC-RT, 5-7 June 2024, Wurzburg, Germany.
4. **Арссан М.А.** На пути к совершенству: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека и возможность воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы, "VI национальный конгресс по регенеративной медицине" - научной конференции в области стволовых клеток и регенеративной медицины, 13 – 15 ноября 2024, Санкт Петербург, Россия.
5. **Arssan M.A.**, Shevchenko A.I., Zakharova I.S. Playing with X-chromosome epigenetics in human primed and naïve pluripotent stem cells, "CRISPR 2025" 5 – 10 October, 2025, Yerevan, Armenia.

По результатам работы подготовлены три статьи в рецензируемых журналах:

1. Шевченко А.И., **Арссан М.А.**, Закиян С.М., Захарова И.С. Хемокин CCL2 активирует факторы гипоксического ответа, регулирует плюрипотентность и направленную эндотелиальную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток человека // *Онтогенез*. 2023. Т. 54. №2. С. 148-161.
2. Shevchenko A.I., **Arssan A.M.**, Zakharova I.S. Towards the generation of safe naïve human pluripotent cell lines // *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya (Tomsk State University Journal of Biology)*. 2025. № 69. С. 184-193.
3. **Arssan M. A.**, Shevchenko A. I., Zakian S. M., Zakharova I. S. Naïve human iPSCs obtained by culturing the ICGi22-A cell line with primed pluripotency in HENSM medium efficiently differentiate into endothelial derivatives // *Vavilov Journal of Genetics and breeding*. 2026. Т. 30 №2. С. 181 – 193.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 202 источника. Работа изложена на 122 страницах, содержит 24 рисунка и 4 таблицы.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Праймированные и наивные плюрипотентные стволовые клетки человека

Плюрипотентные клетки – клетки, способные давать во время дифференцировки производные трех примитивных зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы (Geens and Chuva De Sousa Lopes 2017). В отсутствие стимулов к дифференцировке в культуре *in vitro* такие клетки могут поддерживать недифференцированное состояние в течение многих клеточных делений. Культивируемые линии плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) получают из преимплантационных эмбрионов (ЭСК– эмбриональные стволовые клетки), а также из соматических клеток, которые возвращают в плюрипотентное состояние при помощи сверхэкспрессии в них определенного набора транскрипционных факторов (ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки). Линии плюрипотентных стволовых клеток являются замечательным объектом для исследования процессов раннего развития, используются для моделирования заболеваний, фармакологических исследований и позволяют получать любые клетки взрослого организма. Выделяют два основных состояния плюрипотентности: праймированное и наивное (Nichols and Smith 2009). Однако между наивным и праймированным состоянием могут существовать ряд переходных стадий (рис. 1).

Большинство линий плюрипотентных стволовых клеток человека (ПСКч), полученных и используемых на сегодняшний день, находятся в праймированном состоянии (primed state), напоминая постимплантационный эпибласт. Эти клетки стабильны при длительном культивировании и широко применяются в биомедицинских исследованиях и клинических испытаниях. Однако они обладают ограниченными потенциалом развития и возможностями дифференцировки, демонстрируя феномен эпигенетической памяти, смещающий их дифференцировку в сторону определенных типов клеток (Dekel et al. 2022; Gafni et al. 2013; Hu et al. 2020; Lee et al. 2017; Stadtfeld and Hochedlinger 2010; Valamehr et al. 2014; Yu et al. 2021c). Они не могут быть использованы для моделирования ранних стадий эмбрионального развития, таких как инактивация X-хромосомы, а их хроматин находится в более закрытом состоянии, что делает их менее доступными для редактирования генома с помощью программируемых нуклеаз. Кроме того, у них часто наблюдаются нарушения инактивации X-хромосомы, называемые «эрозией» (Mekhoubad et al. 2012).

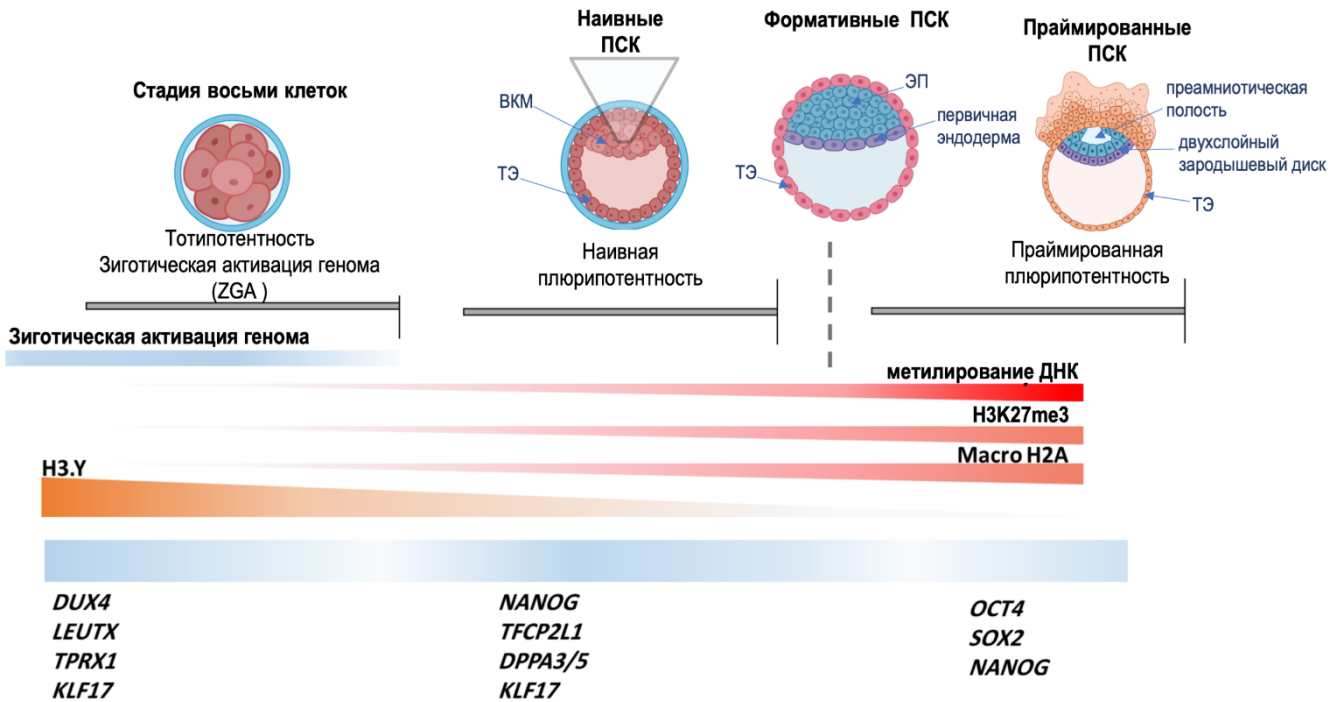


Рисунок 1. Плюрипотентные клетки в раннем развитии человека. После оплодотворения тотипотентная зигота проходит дробления, образуя тотипотентные 2-, 4- и 8-клеточные эмбрионы. Зиготическая активация генома (ZGA) у человека происходит между 4- и 8-клеточными стадиями. На стадии ранней бластоцисты внутренняя клеточная масса (ВКМ) отделяется от трофэктодермы (ТЭ), а затем дифференцируется в эпибласт (ЭП) и первичную эндодерму: ЭП формирует эмбрион, эндодерма — желточный мешок, ТЭ — плаценту. Наивные ПСК соответствуют эпибласту ранней доимплантационной бластоцисты, праймированные ПСК соответствуют постимплантационному эпибласту в начале гастрюляции на стадии первичной полоски.

Клетки 8-клеточного эмбриона тотипотентны, тогда как клетки ВКМ и ЭП — плюрипотентны. В моделях *in vitro* 8С-подобные клетки воспроизводят особенности тотипотентной стадии во время ZGA. 8С-подобные клетки транзиторно возникают в культурах из наивных ПСКч и способны возвращаться в это состояние. Тотипотентные клетки характеризуются накоплением гистона H3.Y, замещаемого макроH2A при переходе к плюрипотентности, а также повышением уровней H3K27me3 и ДНК-метилирования. Они экспрессируют гены зиготической активации (*DUX*, *LEUTX*, *TPRX1*), в то время как наивные и праймированные плюрипотентные клетки имеют собственные транскрипционные и эпигенетические профили.

Напротив, наивные (naïve) ПСКч находятся в более примитивном состоянии, которое тесно соответствует преимплантационным бластомерам эпибласта. Это обеспечивает более широкую пластичность и выбор путей развития по сравнению с праймированными ПСКч (Collier and Rugg-Gunn 2018; Rostovskaya 2022; Theunissen et al. 2016). Эта уникальная пластичность включает способность давать начало как эмбриональным, так и внезародышевым линиям, повышенную пролиферацию и клоногенность (Pham et al. 2022; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). За счет снижения репрессивных меток хроматина для наивных ПСКч характерна более высокая эффективность редактирования

генома, а также утрата эпигенетической памяти, что повышает их дифференцировочный потенциал. Последние достижения продемонстрировали возможность перехода праймированных ПСКч в наивное состояние в определенных средах, состоящих из малых молекул и факторов роста (Bayerl et al. 2021; Buckberry et al. 2023; Chan et al. 2013; Duggal et al. 2015; Gafni et al. 2013; Guo et al. 2017; Khan et al. 2021; Lee et al. 2017; Szczerbinska et al. 2019; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014; Zimmerlin et al. 2016). Несмотря на эти преимущества, получение и долгосрочное поддержание наивных чПСК остается сложной задачей. Наивным ПСКч свойственна геномная и эпигенетическая нестабильность особенно при длительном культивировании или в субоптимальных условиях. Наблюдались хромосомные aberrации, нарушения кариотипа и переменный статус реактивации X-хромосомы как в самих наивных ПСКч, так и в процессе их дифференцировки (Fischer et al. 2025; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). Имеющиеся проблемы подчеркивают необходимость дальнейшей оптимизации протоколов получения и культивирования наивных ПСКч.

1.2 Культуры наивных плюрипотентных и тотипотентных клеток человека, индукция и поддержание

Наивные плюрипотентные стволовые клетки впервые были получены у мыши в условиях культивирования 2iL, сочетающих цитокин LIF с ингибиторами сигнальных путей MEK/ERK и GSK3 (Ying et al. 2008). Эта среда эффективно поддерживала длительное сохранение состояния наивной плюрипотентности в культурах клеток мыши. Успех применения данной стратегии у мышей стимулировал попытки адаптировать её для ПСКч. Оказалось, что среда 2iL сама по себе недостаточна для индукции и поддержания наивной плюрипотентности в ПСКч. Однако получение наивных ПСКч было возможно, если клетки содержали трансгены, обеспечивающие эктопическую экспрессию ключевых транскрипционных факторов, связанных с плюрипотентностью (Hanna et al. 2010), а также культивировались с использованием бессывороточной среды на основе многокомпонентной добавки N2B27 в присутствии LIF и малых молекул PD0325901 и SHIR99021, ингибирующих киназы MEK/ERK и GSK3. Полученные клетки имели куполообразную морфологию, характерную для наивных колоний в присутствии в среде доксициклина, запускающего экспрессию трансгенных транскрипционных факторов с тетрациклин-зависимого промотора. Тем не менее, после отмены доксициклина клетки возвращались к уплощённой морфологии, характерной для праймированных ПСКч.

Основной стратегией получения наивных ПСКч является трансформация (перезагрузка, *resetting*) конвенциональных праймированных ПСКч в наивное состояние под действием химического коктейля малых молекул и цитокинов. Для скрининга компонентов, позволяющих возвращать праймированные ПСКч в наивное состояние использовали системы флуоресцентных репортеров, такие как *OCT4-GFP* и *OCT4-ΔPE-GFP*, для систематической оценки комбинаций факторов, способных поддерживать эндогенную экспрессию *OCT4* после отмены эктопической экспрессии (Gafni et al. 2013; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). Эти исследования основывались на динамике энхансеров гена *OCT4*: дистальный энхансер (DE) активен в наивных плюрипотентных клетках, тогда как проксимальный энхансер (PE) обеспечивает экспрессию в праймированном состоянии (Tesar et al. 2007). Путём нокаута PE и отслеживания активности DE эти системы предоставили инструмент для выявления клеток, способных поддерживаться в состоянии наивной плюрипотентности (Theunissen et al. 2014). Эти работы привели к разработке нескольких надёжных сред для индукции и поддержания культур наивных ПСКч без использования трансгенов, включая NHSM (Naïve Human Stem Cell Medium), 5iLAF и 2iLGö (Gafni et al. 2013; Theunissen et al. 2014; Takashima et al. 2014). Состав используемых ингибиторов в этих средах различается, однако, их объединяет общая цель — подавление сигнального пути MEK/ERK, известного как фактор, стимулирующий дифференцировку. Эти среды обеспечили более стабильное получение и поддержание наивных ПСКч в контролируемых условиях. Изначально протоколы возврата в наивное состояние выполнялись с использованием подложки из митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. Однако использование питающего слоя клеток и неопределённых субстратов животного происхождения, таких как Matrigel, существенно ограничивает клиническое применение ПСКч. В связи с этим основное внимание уделяется бессывороточным системам культивирования, свободным от ксеногенных компонентов. В качестве субстрата для клинически применимых наивных ПСКч широко используется рекомбинантный витронектин человека. Наивные ПСКч, поддерживаемые в NHSM, демонстрировали стабильный рост без эмбриональных фибробластов мыши, что способствовало развитию коммерческих платформ для культивирования, таких как RSeT и t2iLGö (Gafni et al. 2013; Takashima et al. 2014). Однако наивные клетки, полученные в условиях 5iLAF, изначально зависели от присутствия эмбриональных фибробластов мыши. Это потребовало дальнейшей оптимизации условий культивирования, в частности, замены ингибиторов MEK/ERK и SRC, которая в конечном

итоге позволила получать стабильные наивные ПСКч без необходимости использования питающего слоя клеток (Szczerbinska et al. 2019). Эти достижения существенно повысили доступность и клиническую значимость наивных ПСКч.

После выявления условий получения и поддержания наивных ПСКч были предприняты успешные попытки получения наивных культур ЭСКч непосредственно из преимплантационных бластоцист (Duggal et al. 2015; Guo et al. 2017; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014; Valamehr et al. 2014; Ware et al. 2014). Однако из-за значительных технических и этических ограничений, связанных с манипуляциями эмбрионами человека, прямой подход к получению наивных ЭСК из бластоцист применяется редко. Кроме того, было показано, что наивные ИПСК человека можно получать в результате репрограммирования соматических клеток непосредственно в наивное состояние посредством эктопической экспрессии ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности в сочетании с соответствующими средами для культивирования наивных клеток (Buecker et al. 2010; Kisa et al. 2017; Valamehr et al. 2014). Эти перепрограммированные клетки демонстрируют признаки наивной плюрипотентности, включая глобальное гипометилирование ДНК и транскрипционный профиль, сходный с транскриптомом эпибласта на преимплантационной стадии. Функционально они сохраняют способность дифференцироваться в производные всех трёх зародышевых листков.

Внутри культур наивных ПСКч была выявлена популяция клеток, которая по транскриптному профилю близка к тотипотентным клеткам эмбриона человека на стадии 8 клеток — стадии, характеризующейся зиготической активацией генома (ZGA) (Mazid et al. 2022; Taubenschmid-Stowers and Reik 2023; Wang et al. 2018; Yu et al. 2021b). Эти клетки называют 8С-подобными клетками (8CLCs). При стандартных наивных условиях они обычно составляют 1–2% популяции (Taubenschmid-Stowers and Reik 2023). Их определяют по экспрессии канонических маркеров ZGA, таких как *ZSCAN4* и *LEUTX*, а также по активации определённых транспозонных элементов, включая *HERV1* и *MLT2A1* (Taubenschmid-Stowers and Reik 2023). Однако в культурах наивных плюрипотентных стволовых клеток постоянно происходит динамический взаимный переход между наивными клетками и тотипотентными 8С-подобными клетками. Для обогащения или индукции 8CLCs были разработаны несколько методов (таблица 1).

Таблица 1. Подходы к получению 8С-подобных тотипотентных клеток из культур наивных плюрипотентных клеток человека

Метод	Эффективность	Ключевые особенности	Проблемы
Обогащение с помощью поверхностных маркеров или репортерных систем (например, SLC4A2, TPRX1, LEUTX)	~1%–2%	Выделение редких клеток, имитирующих бластомеры восьмиклеточного эмбриона на стадии ZGA	Низкая производительность; не подходит для масштабного применения
Индукция через сверхэкспрессию DUX4	~10%–20%	Активирует сигнальную сеть типа ZGA в наивных ПСКч	DUX4 не способен полностью восстановить транскрипционную схему 8-клеток
Химическая индукция с использованием коктейля малых молекул: ингибитор EZH2 (снижает H3K27me3); ингибитор MEK; ингибитор WNT; ингибитор PARP1; модулятор FАСТ (активирует p53); GSK872 (ингибитор некроптоза); Ac-DEVD-CHO (ингибитор каспазы-3)	~10%–15% (Mazid et al. 2022)	Индукция тотипотентных клеток в культуре без использования трансгенов с помощью коктейля факторов	Низкая начальная эффективность; индукционный стресс от апоптоза и некроптоза

Один из подходов предполагает изоляцию клеток на основе поверхностных маркеров, таких как SLC4A2, либо с использованием флуоресцентных репортерных систем, управляемых транскрипционными факторами, ассоциированными с ZGA, такими как TPRX1 и LEUTX (Mazid et al. 2022; Yu et al. 2022). Другой метод опирается на индуцированную сверхэкспрессию *DUX4*, гена транскрипционного фактора, вовлечённого в начальную фазу ZGA, благодаря чему доля 8CLCs может увеличиваться до 10–20%. Однако, как отметили Yu и соавт. (2022), DUX4 недостаточен сам по себе для полной реактивации транскрипционного ландшафта, характерного для 8-клеточной стадии (Yu et al. 2022). В связи с этим был разработан химический, свободный от трансгенов, метод создания 8CLCs. Один из таких протоколов использует среду 4CL, содержащую четыре малые молекулы и LIF, для стимулирования транскрипционной перезагрузки и эпигенетического ремоделирования в направлении состояния, подобного тотипотентному (Mazid et al. 2022). Этот подход преимущественно основан на манипуляции

эпигенетическими механизмами: ингибировании гидролазы S-аденозилгомоцистеина, что приводит к подавлению EZH2 (каталитической субъединицы комплекса метилтрансферазы H3K27) с помощью 3-деазанепланоцина A (DZNep) (Mazid et al. 2022). Параллельно используются ингибиторы классов I гистондеацетилаз (HDAC), например, трихостатин A (TSA), а также вальпроевая кислота или бутират натрия (Mazid et al. 2022). Для дальнейшего повышения эффективности трансформации разработана модифицированная версия этого протокола (e4CL) с увеличенной концентрацией DZNep и TSA (Mazid et al. 2022). В этих условиях ПСКч напрямую трансформируются в состояние, подобное тотипотентному, в течение семи дней. Другие компоненты индукционного коктейля включали цитокины LIF и ACTIVIN A, ингибитор MEK/ERK PD0325901 и ингибитор танкиразы IWR1, подавляющий сигнальный путь WNT. Среда для культивирования была бессывороточной, основанной на N2B27, с добавлением витамина C.

1.3 Особенности наивных плюрипотентных клеток в культуре

Праймированные и наивные ПСКч отличаются на морфологическом, молекулярном, метаболическом и других уровнях. Наивные ПСКч формируют компактные колонии, образующие сферические, куполообразные структуры, сходные с морфологией ЭСК мыши (Chan et al. 2013; Duggal et al. 2015; Gafni et al. 2013; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014). При индукции наивного состояния плоские колонии праймированных ПСКч постепенно преобразуются в куполообразные, в соответствии с различными протоколами перепрограммирования обычно в течение 10 пассажей (~30 дней) (Bayerl et al. 2021; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). В процессе перехода к наивной плюрипотентности наблюдается чёткий сдвиг в сторону промоторов, обогащённых метками H3K4me2 и H3K4me3, сопровождающийся сокращением доли бивалентных доменов H3K4me2/H3K27me3 (Wang et al. 2018). Метка H3K4me3 преимущественно концентрируется на промоторах генов раннего эмбриогенеза. Ключевые регуляторы плюрипотентности, включая *OCT4*, *SOX2* и *NANOG*, сохраняют активность, демонстрируя лишь умеренное увеличение H3K4me3 и частичное снижение H3K27me3 (рис. 1). Уровень репрессивной метки H3K27me3 в целом резко уменьшается, особенно в генах, ассоциированных с ранним наивным состоянием (Theunissen et al. 2014; Wang et al. 2018). Одновременно уровень H3K9me3 снижается на транспозонах,

экспрессирующихся исключительно в наивном состоянии, таких как HERVK, что способствует их дерепрессии и функциональной активности (Xu et al. 2022).

Ключевую роль в перестройке эпигенома играет замещение канонических гистонов их вариантами (Turinetta and Giachino 2015). Эти замены определяют архитектуру хромосом, модулируют степень компактизации хроматина, регулируют доступность регуляторных элементов и динамику транскрипции. Как и в моделях *in vivo*, клетки 8CLC характеризуются накоплением варианта H3.Y, уровень которого снижается при переходе к наивным ПСКч. Напротив, праймированные ПСКч демонстрируют специфическое накопление варианта macroH2A, ассоциированного с гетерохроматиновыми регионами (рис. 1). Его присутствие рассматривается как маркер поздних этапов инактивации X-хромосомы и более стабильного состояния хроматина.

Наивные ПСКч и клетки преимплантационных бластоцист имеют сходный уровень метилирования ДНК. Однако в наивных клетках часто наблюдается потеря импринтинга в дифференциально метилированных областях, причём утраченные метки не восстанавливаются даже при возврате в праймированное состояние (De Los Angeles 2025; Theunissen et al. 2016; Wang et al. 2018). Наивным ПСКч характерна высокая экспрессия *TET1* и *TET2* на фоне сниженной активности экспрессии *de novo* метилтрансферазы *DNMT3B*, что обуславливает активное деметилирование (Pastor et al. 2016). Также выявилось, что снижение концентрации ингибитора MEK/ERK PD0325901 уменьшает степень потери импринтинга во время поддержания наивной плюрипотентности (Fischer et al. 2025; Di Stefano et al. 2018).

Анализ доступности хроматина с использованием АТАС-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with sequencing) предоставил ценные сведения о геномной архитектуре наивных ПСК. Этот подход показал, что районы генома, связанные с генами, активированными в наивном состоянии, обладают повышенной доступностью хроматина, что соответствует их активному транскрипционному статусу и роли в поддержании наивной плюрипотентности. По результатам АТАС-seq геномные локусы классифицировали на четыре типа по характеру изменений доступности хроматина при переходе от праймированного к наивному состоянию. Определённый набор локусов остаётся конститутивно открытым в обоих состояниях, включая гены, участвующие в репарации ДНК, поддержании стабильности белков и ключевых регуляторов плюрипотентности, таких как *POU5F1* (*OCT4*) и *SOX2* (Bi et al. 2022). Некоторые локусы становятся закрытыми в наивных клетках, преимущественно соответствуя генам,

связанным с дифференцировкой, таким как *SOX13* и *PAX6* (Vi et al. 2022). Группа локусов проходит переход от открытого до закрытого состояния, включая гены, вовлечённые в метаболизм мРНК, сигнальные пути факторов роста и транскрипционные факторы, характерные для праймированного состояния, например *SOX11* и *OTX2* (Vi et al. 2022). Наконец, четвёртая категория включает локусы, которые переходят из закрытого в открытое состояние, охватывая гены, ассоциированные с наивной плюрипотентностью, такие как *DNMT3L* и *NANOG* (Vi et al. 2022). Эти динамические изменения доступности хроматина подчёркивают масштабную эпигенетическую реорганизацию, сопровождающую приобретение и поддержание наивного плюрипотентного состояния.

Сравнительные исследования показали, что энхансеры и гистоновые модификации функционируют по-разному в праймированных и наивных ПСКч (Buecker et al. 2014; Factor et al. 2014; Nocente et al. 2025). Широко изученным примером является регуляция *OCT4*, ключевого фактора плюрипотентности. В наивных клетках экспрессия *OCT4* преимущественно инициируется дистальным энхансером (DE), тогда как в праймированных клетках экспрессия смещается на проксимальный энхансер (PE) (Tesar et al. 2007; Yeom et al. 1996). Такое стадийное использование энхансеров отражает более широкие различия в пространственных взаимодействиях хроматина и может способствовать изменениям локальной трёхмерной архитектуры хроматина при переходе между состояниями плюрипотентности.

Транскриптомные и эпигенетические профили наивных ПСКч во многом соответствуют таковым во внутренней клеточной массе преимплантационных бластоцист человека. Сравнительный анализ данных разных исследований показал, что наивные ПСКч, полученные по протоколам 5iLA/F, HENSM и t2iLGö, формируют общий кластер с близкими паттернами экспрессии. Для них характерна устойчивая активация набора генов, специфичных наивному состоянию: *KLF4*, *KLF17*, *NANOG*, *TFCP2L1*, *DNMT3L*, *DPPA3* и *DPPA5*, которые обеспечивают поддержание и регуляцию плюрипотентности (Bayerl et al. 2021; Duggal et al. 2015; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014). Кроме того, наивные ПСКч демонстрируют специфический паттерн экспрессии транспозонов. Транспозоны семейств *LTR5Hs-HERVK* и *LTR7Y-HERVH* активны в наивных клетках и функционируют как стадиеспецифические энхансеры (Göke et al. 2015; Levin-Ferreira et al. 2024; Theunissen et al. 2016). Экспрессия субсемейства транспозонов LTR7Y является надежным молекулярным маркером для мониторинга перехода в наивное состояние и его поддержания и было использовано в качестве репортёрной системы при

подборе фидер-независимых условий культивирования наивных ПСКч в среде FINE (Göke et al. 2015; Szczerbinska et al. 2019).

Состояния наивной и праймированной плюрипотентности характеризуются различными профилями экспрессии микроРНК. В частности, miRNA-22-3p, -143-3p и -512-3p экспрессируются преимущественно в наивных ПСКч, тогда как miRNA-92b-3p, -302a-5p и -302b-3p преобладают в праймированных ПСКч (Dodsworth et al. 2020; Wang et al. 2019). Кроме того, микроРНК регулируют ключевые сигнальные пути развития, такие как Hedgehog, а также метаболические пути, включая окислительное фосфорилирование (OXPHOS) и окисление жирных кислот. В наивных ПСКч наблюдается повышение экспрессии miR-10a, нацеленной на гены, участвующие в синтезе жирных кислот (Wang et al. 2019). В то же время miR-18a-5p и miR-17-5p, нацеленные на комплекс IV OXPHOS, демонстрируют пониженную экспрессию в наивных ПСКч (Wang et al. 2019).

Ряд исследований посвящен установлению критериев, отличающих праймированные и наивные ПСКч на основе экспрессии белков на поверхности клеток с использованием коммерческих библиотек антител (Choi et al. 2008; Collier et al. 2017; Henderson et al. 2002; O'Brien et al. 2017; Pastor et al. 2016; Shakiba et al. 2015). В этом контексте выявление специфических поверхностных маркеров наивной плюрипотентности предоставляет возможность идентифицировать и выделять жизнеспособные наивные ПСКч с помощью флуоресцентного и магнитного сортирования. Поверхностные маркеры, такие как SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81, позволяют идентифицировать и изолировать плюрипотентные клетки из гетерогенных культур (Henderson et al. 2002). В среде NHSM экспрессия CD24 на поверхности клеток соответствует их переходу к наивному состоянию (Collier et al. 2017; Shakiba et al. 2015). Однако истинно наивные клетки, индуцированные с помощью 5iLA/F, PXGL или t2iLGöY, как правило, являются CD24-негативными. Аналогично, субпопуляция SSEA4-негативных клеток демонстрирует ранние признаки наивной плюрипотентности, включая низкий глобальный уровень метилирования ДНК и повышенную экспрессию наивно-специфических генов (Bredenkamp et al. 2019a; Collier et al. 2017; Henderson et al. 2002; Liu et al. 2017; Pastor et al. 2016; Shakiba et al. 2015). CD7 и CD130 повышают экспрессию на ранней стадии индукции наивной плюрипотентности, тогда как CD75 обнаруживается преимущественно на поздних этапах (Collier et al. 2017; Göke et al. 2015; Trusler et al. 2018). Высокоспецифичными и надежными маркерами наивного состояния также считают *SUSD2* и *ALPPL2* (Bi et al. 2020; Bredenkamp et al. 2019a).

Наивные ПСК, в отличие от праймированных, обладают уникальной способностью к формированию клеток внезародышевых органов – плаценты и желточного мешка. ПСКч способны давать трофобластные стволовые клетки, которые далее дифференцируются в производные синцитиотрофобласта, цитотрофобласта и экстраворсинчатого трофобласта (Sinkornpumin et al. 2020; Dong et al. 2020; Io et al. 2021b). Наивные ПСКч могут также дифференцироваться в клетки внезародышевой эндодермы (гипобласта и ли примитивной эндодермы), являющиеся предшественниками клеток желточного мешка (Linneberg-Agerholm et al. 2019). Кроме того, было обнаружено, что при культивировании наивных ПСК в низкоагрегационных условиях они способны формировать 3D-структуры, подобные ранним преимплантационным эмбрионам, которые были названы бластоидами (Yanagida et al. 2021). Образующиеся структуры диаметром около 250 мкм соответствуют поздней преимплантационной бластоцисте и формируются с эффективностью около 80%. Бластоиды получают при последовательном культивировании в смесях наивной и трофобластной сред с последующим добавлением сред для дифференцировки гипобласта (Bredenkamp et al. 2019b; Theunissen et al. 2016; Yanagida et al. 2021; Yu et al. 2021b). Бластоиды содержат компартмент, подобный внутренней клеточной массе, экспрессирующий маркеры эпибласта NANOG, OCT4, SOX2 и KLF17, при этом экспрессия KLF17 указывает на сохранение наивной плюрипотентности. Кроме того, бластоиды демонстрируют способность к развитию в направлении периимплантационных стадий и формируют структуры, подобные полости амниона и желточного мешка (Bayerl et al. 2021; Yu et al. 2021b). Бластоиды воспроизводят ключевые события постимплантационного развития человека, включая формирование эмбрионального диска, поляризацию желточного мешка, люменогенез эпибласта, появление первичных половых клеток и экстраэмбриональной мезодермы (Oldak et al. 2023). В целом способность к формированию клеток внезародышевых органов и бластоидов можно рассматривать как критерии наивной плюрипотентности ПСК.

1.4 Ключевые регуляторы сигнальных путей праймированных и наивных плюрипотентных клеток

Основную роль в поддержании культур праймированных ПСКч играют сигнальные каскады ростовых факторов TGF- β /ACTIVIN/NODAL и FGF2. Сигнальный путь TGF- β /ACTIVIN/NODAL регулирует активируемые рецепторами белки SMAD2/3, которые действуют как трансактиваторы ключевых генов плюрипотентности *OCT4*, *SOX2* и *NANOG*

(Greber et al. 2008). Ростовой фактор FGF2 помимо каскада TGF- β /ACTIVIN/NODAL активирует рецепторы к белку FGF. Активированные рецепторы FGF способны передавать сигнал через три сигнальных каскада bRAF/MEK/ERK, PI3k/AKT и PLC γ (Mossahebi-Mohammadi et al. 2020). Источником ростовых факторов TGF- β , ACTIVIN A и FGF2 для культур ПСКч могут быть белки, добавляемые в среду, либо митотически инактивированные фибробласты, которые используют как питающую подложку для плюрипотентных клеток. ACTIVIN A и FGF2 используют в средах для наивных ПСКч, однако известны также протоколы для индукции и поддержания наивной плюрипотентности, которые не включают эти факторы (Bayerl et al. 2021; Bredenkamp et al. 2019a). Ростовой фактор TGF- β как культуральная добавка напрямую не используется в составе сред для наивных ПСКч, однако ингибирование сигнального пути TGF- β приводит к потере наивными клетками плюрипотентности и дифференцировке в сторону трофоэктодермы (Osnato et al. 2021). Сигналинг TGF- β также влияет на эпигенетический ландшафт наивных ПСКч, включая регуляцию экспрессии *XIST*, что, в свою очередь, может влиять на способность к инактивации X-хромосомы.

Ключевым элементом индукции наивного состояния является блокирование сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы MEK (Bayerl et al. 2021; Gafni et al. 2013; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014). В качестве ингибитора киназы MEK используют малую молекулу PD0325901, которая в большинстве случаев является обязательным компонентом сред для наивных ПСКч (Bayerl et al. 2021; Gafni et al. 2013; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014). Основным индуктором каскада bRAF/MEK/ERK является ростовой фактор FGF2, поэтому его стараются не использовать при индукции наивной плюрипотентности (Bayerl et al. 2021; Theunissen et al. 2014). Ингибирование MEK с помощью PD0325901 может приводить к необратимому деметилированию генома и хромосомным перестройкам в наивных ПСКч. Однако безопасного ингибитора каскада MEK/ERK пока не найдено. Для генерации и поддержания наивной плюрипотентности оказалось полезно ингибировать разные ветви сигнального пути MEK/ERK (Bayerl et al. 2021; Gafni et al. 2013; Takashima et al. 2014). Это достигается с помощью сочетания основного ингибитора пути MEK/ERK с дополнительными компонентами, направленными, например, на ингибирование киназ bRAF, SRC и PKC (Bayerl et al. 2021; Bredenkamp et al. 2019a; Theunissen et al. 2014).

В плюрипотентных клетках SRC-киназы работают как мощные медиаторы сигналов от рецепторов факторов роста (Sandilands et al. 2007). Даже когда каскад MEK/ERK

заблокирован, киназы SRC могут продолжать передавать сигналы на другие мишени каскада MEK/ERK и частично активировать его, препятствуя наивной плюрипотентности. Ингибиторы киназ SRC способны полностью отсекают передачу сигнала от рецептора FGF к нижележащим эффекторам, что способствует индукции и стабильности наивного плюрипотентного состояния. Кроме того, блокада SRC стабилизирует E-кадгерин на мембране, что может помогать колониям наивных клеток сохранять компактную морфологию (Owens et al. 2000). Ингибирование SRC также снижает активность связи клеток с матриксом, заставляя их отдавать приоритет связям друг с другом, а не прикреплению к чашке Петри (Närvä et al. 2017; Stubb et al. 2019). Наконец, SRC участвуют в передаче сигналов, способствующих эпителиально-мезенхимальному переходу, поэтому ингибирование SRC позволяет удерживать клетки в эпителиальном состоянии, характерном для раннего эпибласта (Patel et al. 2016).

Частичную активацию каскадов MEK/ERK и NF- κ B, которые подталкивают клетки к выходу из наивного состояния, могут вызывать протеинкиназы PKC, присутствующие в ПСКч (Guo et al. 2021). Следовательно, блокада PKC может стабилизировать наивное состояние ПСКч. В качестве ингибитора PKC используют малую молекулу Gö6983. Подавление PKC поддерживает высокий уровень экспрессии специфических маркеров наивности, таких как *NANOG*, *KLF4*, *TFCP2L1* и *REX1*, а также участвует в переключении метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование, что является биоэнергетическим маркером наивного состояния (Takashima et al. 2014).

Препятствием для получения наивных ПСКч является активность сигнального пути WNT. (Guo et al. 2017; Khan et al. 2021; Zimmerlin et al. 2016). Сообщается, что WNT играет функциональную роль в поддержании плюрипотентности, однако этот путь также важен для индукции генов, ответственных за спецификацию мезодермы (Lindsley et al. 2006). Недавние исследования показали, что активность WNT является главной причиной эпигенетической и хромосомной нестабильности наивных ПСКч (Bayerl et al. 2021). В результате несколько последних исследований направлены на снижение или репрессию WNT за счет удаления ингибиторов GSK3 и добавления ингибиторов WNT, преимущественно канонических, таких как IWP2 и XAV939 (Bayerl et al. 2021; Khan et al. 2021; Zimmerlin et al. 2016). Аутокринные лиганды, секретируемые наивными ПСКч, активируют как канонические, так и неконвенциональные WNT-пути. Таким образом, введение WNT-ингибиторов, например, IWP2, в среду приводит к увеличению экспрессии

генов наивного состояния и одновременному снижению экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой.

Необходимым условием для получения и поддержания культур наивных ПСКч является активация сигнального пути JAK/STAT3. Этот путь в норме неактивен в праймированных ПСКч, но может быть запущен добавлением индуктора (Chan et al. 2013). Активатором сигнального пути JAK/STAT3 является цитокин LIF, который относится к семейству интерлейкина-6 и регулирует пролиферацию клеток, одновременно подавляя их дифференцировку (Nicola and Babon 2015). LIF – второй незаменимый компонент в составе сред для наивных ПСКч. После введения LIF наблюдается активация киназ JAK1/2, фосфорилирование транскрипционного фактора STAT3 и его локализация в ядре, что способствует активации генов наивной плюрипотентности *NANOG*, *KLF4*, *TFCP2L1* (An et al. 2020; Theunissen et al. 2016). В последнее время наблюдается тенденция к снижению концентрации LIF и других ростовых факторов в средах для наивных ПСКч, что подчеркивает основную роль для состояния наивной плюрипотентности ингибиторов киназ (Bayerl et al. 2021; Takashima et al. 2014).

Таким образом, взаимодействие сигнальных путей ростовых факторов и ингибиторов киназ формирует сложную регуляторную сеть, управляющую праймированными и наивными состояниями ПСКч. Эти пути тесно связаны с эпигенетическими механизмами, в том числе с регуляцией X-хромосомы, что подчеркивает важность скоординированного сигналинга и изменений состояния хроматина для поддержания клеточной идентичности и пластичности. Будущие исследования, сосредоточенные на взаимодействии этих путей и их связи с эпигенетическими последствиями, будут иметь ключевое значение для оптимизации условий культивирования, повышения эффективности репрограммирования и полного раскрытия потенциала ПСКч в биологии развития и регенеративной медицине.

1.5 Компенсация дозы генов X-хромосомы

X-хромосома содержит более тысячи генов, многие из которых участвуют в фундаментальных клеточных процессах, включая регуляцию транскрипции, метаболизм и эмбриональное развитие. Ввиду высокой плотности функционально значимых генов корректная регуляция экспрессии X-сцепленных генов является критически важной для нормального эмбриогенеза и поддержания тканевого гомеостаза. Для выравнивания дозы генов между полами у млекопитающих реализуется механизм инактивации X-хромосомы

(X chromosome inactivation, XCI), при котором одна из двух X-хромосом у женщин подвергается транскрипционному сайленсингу. Этот процесс регулируется длинными некодирующими РНК и многоуровневыми эпигенетическими механизмами инактивации хроматина, что обеспечивает баланс экспрессии генов X-хромосомы у женщин (XX) и мужчин (XY).

Современное понимание механизмов XCI на ранних стадиях развития в значительной степени сформировано на основе данных, полученных на мышинных моделях. У мышей XCI следует импринтированному паттерну, зависящему от родительского происхождения X-хромосомы: отцовская X-хромосома подвергается инактивации уже на доимплантационной стадии и сохраняется в неактивном состоянии во внезародышевых органах, включая плаценту (Takagi 2003). В соответствии с этим, развитие мышинных эмбрионов с дополнительной X-хромосомой (XXX или XXY) невозможно в случае, если лишняя хромосома унаследована от матери (Goto and Takagi 1998). Предполагается, что такая избирательная летальность обусловлена устойчивостью материнской X-хромосомы к ранней импринтированной инактивации, что связано с ооцит-специфическим эпигенетическим программированием, включая материнский импринтинг в локусе *Xist* (Inoue et al. 2017). Однако регуляция X-хромосомы у человека демонстрирует существенные видоспецифические отличия. В отличие от мышей, у человека наличие дополнительной X-хромосомы, например, при кариотипах XXX у женщин или XXY у мужчин (синдром Клайнфельтера), как правило, не препятствует относительно нормальному эмбриональному и постнатальному развитию независимо от родительского происхождения дополнительной X-хромосомы (Skakkebaek et al. 2014). В этих случаях только одна X-хромосома остаётся транскрипционно активной, тогда как все дополнительные X-хромосомы подвергаются инактивации посредством механизма, который, по-видимому, не зависит от родительского происхождения. Это указывает на отсутствие импринтированной XCI у человека (Patrat et al. 2020; Skakkebaek et al. 2014). Анализ распределения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на X-хромосоме в доношенной плаценте человека выявил обширные клональные области, в которых инактивирована либо материнская, либо отцовская X-хромосома, что согласуется со случайным характером XCI в этой ткани (Patrat et al. 2020). Такой мозаичный паттерн объясняется клональным происхождением трофобласта, при котором каждая область плаценты формируется из одной клетки-предшественницы. Это наблюдение позволило пересмотреть интерпретацию ранних исследований, основанных на анализе

ограниченного числа образцов плаценты, которые, вероятно, представляли собой моноклональные популяции и привели к ошибочным выводам о смещенной инактивации X-хромосомы во внезародышевых тканях эмбриона человека (Patrat et al. 2020). В то же время более поздние транскриптомные и эпигеномные исследования выявили слабый сдвиг в сторону инактивации отцовской X-хромосомы в плаценте человека, что указывает на возможные тканеспецифические или стадийно-зависимые эффекты (Hamada et al. 2016). Дополнительные данные, полученные при анализе преимплантационных эмбрионов человека, подтвердили отсутствие импринтированной XCI и выявили уникальные особенности компенсации дозы X-сцепленных генов на ранних стадиях развития. Первоначально было показано, что некодирующая РНК *XIST* — ключевой регулятор XCI — экспрессируется с материнской X-хромосомы как на стадии дробления, так и в бластоцистах, что окончательно опровергло концепцию импринтированной инактивации отцовской X-хромосомы у человека (Hamada et al. 2016; Inoue et al. 2017; Teklenburg et al. 2012). Эти наблюдения впоследствии были подтверждены на уровне отдельных клеток (Okamoto et al. 2011; Petropoulos et al. 2016; Vallot et al. 2017). Экспрессия *XIST* инициируется примерно на стадии четырёх клеток, синхронно с ZGA, и характеризуется асинхронной динамикой между отдельными бластомерами. Примечательно, что *XIST* транскрибируется не только с обеих X-хромосом у женских эмбрионов, но и с единственной X-хромосомы у мужских эмбрионов (Okamoto et al. 2011; Petropoulos et al. 2016; Vallot et al. 2017). Это подчёркивает существование уникальной и транзиторной фазы неклассической активности *XIST* на ранних стадиях развития человека, известной как демпфирование X-хромосомы. У мужских эмбрионов РНК *XIST* аккумулируется на X-хромосоме на 5-й день развития, но резко снижается к 6–7-му дню, тогда как у женских эмбрионов наблюдается биаллельная аккумуляция *XIST* на стадии поздней бластоцисты (дни 6–7) (Okamoto et al. 2011; Petropoulos et al. 2016; Vallot et al. 2017). Важно отметить, что, несмотря на интенсивное накопление *XIST*, анализ отдельных X-сцепленных генов в морулах и бластоцистах (дни 5–6) выявил устойчивую биаллельную экспрессию и отсутствие аккумуляции на X-хромосоме H3K27me3 — ключевого эпигенетического маркера транскрипционной инактивации (Okamoto et al. 2011). Позднее эти наблюдения были подтверждены на уровне всего генома, продемонстрировав биаллельную экспрессию X-сцепленных генов, начинающуюся уже на стадии ZGA и сохраняющуюся с 4-го по 7-й день развития (Petropoulos et al. 2016). Эти данные свидетельствуют о том, что, в отличие от мыши, накопление *XIST* в ранних эмбрионах человека не приводит к

немедленной хромосомной инактивации. Интересно, что при нормализации транскрипционных данных на общий уровень экспрессии X-хромосомы на клетку женские эмбрионы демонстрируют постепенное снижение экспрессии X-сцепленных генов от стадии морулы (день 4) до поздней бластоцисты (день 7). Это явление было интерпретировано как транскрипционное демпфирование X-хромосомы, специфическая форма компенсации дозы генов, предшествующая установлению классической XCI у человека (Petroopoulos et al. 2016).

Для изучения ранних стадий XCI у человека исследователи использовали эмбрионы, полученные методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), что сопряжено с этическими и техническими трудностями (Csokmay et al. 2009; Luna et al. 2007). Большинство ЭКО-эмбрионов происходит из случаев родительского бесплодия, включая потенциально ослабленные гаметы и использование искусственных процедур, которые могут влиять на развитие. Эмбрионы человека также характеризуются высокой частотой анеуплоидии, главным образом вследствие ошибок мейоза ооцитов, оцениваемой в 5–20%, что значительно превышает показатели у мышей (0,5–1%) (Alfarawati et al. 2011; Richter et al. 2006). Эффективность развития ограничена: только 40–60% делящихся эмбрионов достигают стадии бластоцисты (Richter et al. 2006). Кроме того, во многих исследованиях не применяются стандартизированные критерии оценки развития эмбрионов, вместо чего эмбрионы часто обозначают обобщённо как «типичные» на 5 или 6 день, что затрудняет точное определение стадии развития и вносит вариабельность в результаты. В совокупности эти факторы ограничивают надёжность использования эмбрионов человека для изучения ранних процессов развития, включая инактивацию X-хромосомы. Специфическая для полов экспрессия генов, локализованных на X- и Y-хромосомах, может влиять на экспрессию аутосомных генов на ранних стадиях развития человека. Нарушение инактивации X-хромосомы, вызванное манипуляциями с эмбрионами *in vitro* в ходе ЭКО, может снижать жизнеспособность женских эмбрионов и объяснять наблюдаемое смещение соотношения полов в сторону мужских эмбрионов (Alfarawati et al. 2011; Chang et al. 2009; Csokmay et al. 2009; Khan and Theunissen 2023; Luna et al. 2007; Maalouf et al. 2014; Richter et al. 2006). Корректная компенсация дозы X-сцепленных генов имеет критическое значение, поскольку некоторые из них, включая *SLC38A5*, участвующий в транспорте аспарагина, и *G6PD*, регулирующий метаболизм глюкозы, контролируют ключевые метаболические пути (Picton et al. 2010). Баланс

экспрессии генов X-хромосомы необходим для поддержания метаболического гомеостаза и обеспечения нормального развития.

1.5.1 Некодирующая РНК гена *XIST* и её роль в дозовой компенсации у человека

Согласно современным данным, РНК *XIST* играет ключевую роль в демпфировании и инактивации транскрипции X-хромосомы посредством формирования рибонуклеопротеинового комплекса (Alfeghaly et al. 2024; Brockdorff et al. 2020; Li et al. 2022; Plath et al. 2002; Zlotorynski 2015). Белок SPEN соединяется с *XIST* посредством РНК-связывающих мотивов (Dossin et al. 2020; Posynick and Brown 2019). Это взаимодействие является ключевым для регуляции статуса X-хромосомы, демпфирования и инактивации. При установлении инактивации к неактивной X-хромосоме (X_i) привлекается SPEN, который связывается с *XIST* через домен А-повтора на её 5'-конце (Dossin et al. 2020; Posynick and Brown 2019). Параллельно *XIST* привлекает первый репрессорный комплекс белков Polycomb (PRC1) через hnRNPК, что приводит к накоплению метки H2AK119ub на X_i (Dossin et al. 2020; Pintacuda et al. 2017). Эта метка затем способствует привлечению второго репрессорного комплекса белков Polycomb (PRC2), который добавляет на X_i метку неактивного хроматина H3K27me3 с помощью каталитических субъединиц EZH1/2 (Pintacuda et al. 2017; Żylicz et al. 2019). Считается, что такие эпигенетические изменения, обеспечивающие инактивацию хроматина, поддерживают ХСІ на начальных стадиях процесса. В дифференцированных соматических клетках метилирование ДНК в CpG-островках на X_i рассматривается как ключевая модификация, стабилизирующая неактивное состояние. Однако новые данные, полученные с использованием чувствительных методов, таких как RNA FISH и аллельное детектирование мРНК, показывают, что утрата *XIST* может приводить к реактивации генов на X_i или к повышению экспрессии генов, частично избегающих ХСІ, с потенциальными последствиями для тканевого гомеостаза и патологии (Hauth et al. 2024; Richart et al. 2022; Żylicz et al. 2019). Эти данные ставят под сомнение устоявшееся представление о том, что *XIST* функционирует исключительно на этапе инициации ХСІ, предполагая вместо этого, что *XIST* может продолжать активно поддерживать подавление транскрипции генов X-хромосомы в дифференцированных клетках. У человека и мышей удаление или снижение уровня *XIST/Xist* приводит к снятию репрессии или ослаблению дозозависимого подавления экспрессии генов, частично избегающих ХСІ, которые обычно экспрессируются на более низком уровне в X_i по сравнению с активной X-хромосомой

(Ха) (Hauth et al. 2024). *XIST* сохраняет способность снижать экспрессию генов, избегающих инактивации. В экспериментах с эктопической индукцией *Xist* в дифференцированных клетках было показано, что *Xist* может снижать экспрессию генов, избегающих инактивации (Chow et al. 2007; Hauth et al. 2024; Yu et al. 2021a). В частности, в течение трёх дней после индукции *Xist* наблюдалось снижение аллельного отношения большинства избегающих инактивации генов как минимум на 50% (Hauth et al. 2024). Эти результаты свидетельствуют о том, что *Xist* сохраняет функциональную компетентность для модуляции экспрессии избегающих инактивации генов после дифференцировки и может участвовать в тонкой настройке дозы генов X-хромосомы в соматических клетках (Marks et al. 2015; Richart et al. 2022; Yildirim et al. 2013).

В наивных ПСКч на стадии демпфирования транскрипции РНК *XIST* демонстрирует более диффузное распределение в ядре по сравнению с компактным облаком, окружающим *Xi* после инактивации (Cecalev et al. 2024; Sahakyan et al. 2017). Вероятно, на ранней стадии до инактивации рибонуклеопротеидный комплекс РНК *XIST* может неэффективно локализоваться на X-хромосоме, формируя диффузное распределение. Пока остается неясным, обусловлено ли такое рассеянное распределение неполной или неэффективной сборкой рибонуклеопротеидного комплекса, препятствующей полной инактивации хроматина, или же оно отражает уникальную архитектуру хроматина X-хромосом в клетках до имплантации (Morey et al. 2025).

1.5.2 Сплайсинг транскрипта *XIST*

Аккумуляция РНК *XIST* на X-хромосоме наблюдаются как на стадии до имплантации, когда обе X-хромосомы остаются активными, так и в период после имплантации, когда происходит инактивация X-хромосомы (Alfeghaly et al. 2024; Morey et al. 2025; Takahashi et al. 2018). Совместное присутствие РНК *XIST* на активной и неактивной X-хромосомах стало ключевым объектом современных исследований. Такая двухфазная экспрессия указывает на возможность различных функций *XIST* на разных этапах развития. *In vitro* исследования с использованием моделей формирования эмбрионидных телец показали выраженное повышение экспрессии *XIST* в течение 48 часов после индукции дифференцировки, что соответствует началу XCI (Stork et al. 2019). Новые данные указывают на два основных механизма, которые могут лежать в основе этого феномена: (1) структурные особенности и повторяющиеся элементы в транскрипте *XIST*, влияющие на его регуляторный потенциал, и (2) белковые комплексы, ассоциированные с

XIST, которые опосредуют его роль в установлении и поддержании неактивной X-хромосомы (Stork et al. 2019). Одним из структурных факторов является посттранскрипционная модификация РНК *XIST*, в частности, процесс сплайсинга транскрипта. Исторически значение сплайсинга *XIST* в регуляции было значительно недооценено по нескольким причинам. Во-первых, *XIST* первоначально клонировали из соматических клеток преимущественно в форме сплайсированной кДНК, что породило широкое убеждение, что сплайсинг является неотъемлемой и конститутивной характеристикой РНК *XIST*. Во-вторых, функциональные исследования показали, что введение трансгена со сплайсированной кДНК *XIST* само по себе способно индуцировать инактивацию X-хромосомы. Это привело к формированию мнения, что сплайсинг не играет активной регуляторной роли. В-третьих, большинство методик обнаружения были специально разработаны для распознавания сплайсированных транскриптов *XIST*, что ограничивало выявление несплайсированных или частично сплайсированных форм. Наконец, долгое время считалось, что сплайсинг *XIST* происходит быстро и пассивно, что дополнительно снижало интерес к его потенциальной регуляторной роли. Тем не менее, недавно было показано, что зрелые, сплайсированные варианты *XIST* преимущественно индуцируются после начала дифференцировки (Loda and Heard 2019; Yue and Ogawa 2018). Количественный анализ соотношения сплайсированных и несплайсированных транскриптов *XIST* с нормализацией на общий уровень РНК *XIST* показал примерно двукратное увеличение содержания сплайсированных транскриптов, сопровождаемое примерно трехкратным снижением несплайсированных форм на ранних стадиях дифференцировки наивных ПСКч (Stork et al. 2019). Дальнейшие исследования подтверждают гипотезу о том, что дифференцировка активирует специфический сплайсинг, что является основной причиной наблюдаемого изменения соотношения сплайсированных и общих транскриптов *XIST* (Khan et al. 2017; Stork et al. 2019). С помощью полуколичественной ПЦР в режиме реального времени было установлено, что присутствуют лишь полностью сплайсированные и несплайсированные формы транскрипта *XIST* (Stork et al. 2019). Для устранения возможных искажений, вызванных ПЦР, особенно при сниженной эффективности амплификации длинных несплайсированных транскриптов, было использовано нанопоровое секвенирование длинных матриц (Herzel et al. 2018). Этот подход подтвердил результаты полуколичественной ПЦР в режиме реального времени и позволил исключить опасения, что наблюдаемое накопление сплайсированных транскриптов обусловлено техническими

искажениями в пользу более коротких (сплайсированных) продуктов. Широкий массив данных, полученных на наивных ПСКч, дополнительно подчеркивает критическую регуляторную роль сплайсинга в экспрессии РНК *XIST*. При этом несплайсированные транскрипты *XIST* преимущественно экспрессируются в наивных ПСК (Loda and Heard 2019; Stork et al. 2019). Интересно, что эктопическая экспрессия только сплайсированной формы *XIST* оказывается достаточной для инициирования процесса инактивации X-хромосомы (Yue and Ogawa 2018). Этот результат указывает на то, что все остальные факторы, необходимые для запуска XCI, за исключением сплайсированной формы *XIST*, уже присутствуют в эмбриональных стволовых клетках, что подчеркивает ключевую роль процесса сплайсинга транскрипта *XIST* в контроле XCI.

Для того, чтобы транскрипты *XIST* выполняли свою центральную функцию в запуске инактивации X-хромосомы, ключевое значение может иметь их укладка. Способность *XIST* формировать нужную конформацию напрямую зависит от его сплайсинга: только сплайсированная форма *XIST* эффективно распространяется и акумулируется на X-хромосоме. Несплайсированные транскрипты *XIST* сохраняют интронные участки, которые накладывают структурные ограничения или служат сайтами связывания ингибирующих факторов, тем самым ограничивая способность РНК закрепляться, распространяться и стабильно связываться с X-хромосомой. В отличие от этого, экзон–экзонные соединения, образующиеся при сплайсинге, могут формировать уникальные структурные мотивы или элементы распознавания, которые выступают в качестве высокоаффинных сайтов для РНК-связывающих белков, модификаторов хроматина или других регуляторных кофакторов (Heard et al. 1999). Эти взаимодействия могут быть необходимы для привлечения или стабилизации молекулярного аппарата, управляющего инициацией и распространением XCI, в этом плане сплайсинг может рассматриваться как регуляторный этап функционального созревания РНК *XIST*.

1.5.3 Модификации неактивной X-хромосомы

X-хромосома, экспрессирующая *XIST*, в соматических клетках характеризуется накоплением модификации неактивного хроматина H3K27me3 и исключением РНК-полимеразы II, что выявляется методами иммунофлуоресценции (Plath et al. 2003; Teklenburg et al. 2012). Однако в контексте раннего развития человека и наивных плюрипотентных стволовых клеток эти классические маркеры XCI проявляются непоследовательно. Несмотря на отсутствие полной индукции XCI на доимплантационной

стадии, остаётся неясным, происходит ли накопление H3K27me3 на X-хромосомах клеток женских эмбрионов и как это соотносится с глобальным снижением экспрессии X-сцепленных генов и феноменом X-хромосомного демпфирования.

Появились противоречивые данные относительно накопления H3K27me3 на X-хромосомах наивных ПСКч и эмбрионов на стадии до имплантации. Так, Патрат и соавторы отметили, что несмотря на накопление *XIST*, эмбрионы на стадиях морулы и бластоцисты демонстрируют широкую биалельную экспрессию генов X-хромосомы и отсутствие заметного обогащения H3K27me3, что согласуется с предыдущими наблюдениями (Okamoto et al. 2011; Patrat et al. 2020). Кроме того, Валлот и соавторы показали, что в наивных ПСКч, несмотря на экспрессию *XIST*, модификации H3K27me3 и H3K9me3 отсутствуют или снижены на X-хромосоме, покрытой *XIST*, что свидетельствует о недостаточности *XIST* для рекрутирования репрессивного хроматина в данном контексте (Vallot et al. 2017). Эти данные согласуются с результатами Теуниссен с соавторами, которые с использованием протоколов 5iLA/F подтвердили отсутствие обогащения H3K27me3 на X-хромосомах наивных ПСКч (Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). В отличие от этого, Саакян и соавторы наблюдали локальное накопление H3K27me3 на *XIST*-экспрессирующей активной X-хромосоме в наивных ПСКч UCLA1, хотя полного транскрипционного подавления не происходило, о чём свидетельствовало присутствие РНК-полимеразы II (Sahakyan et al. 2017). Согласно современным данным, аккумуляция H3K27me3 происходит на X-хромосоме во время демпфирования транскрипции на стадии преимплантационной бластоцисты. Для изучения взаимосвязи между экспрессией *XIST* и накоплением гистоновых меток были проанализированы четыре женских преимплантационных эмбриона человека на наличие аккумуляции H3K27me3 в клетках трофобласта и эпибласта. В трёх из четырёх эмбрионов выявлялись одна или две области аккумуляции H3K27me3 (Alfeghaly et al. 2024). Дополнительные данные показали, что H3K27me3 и H2AK119Ub накапливаются совместно с РНК *XIST* вдоль демпфированных X-хромосом в наивных ЭСКч. Более 60 % клеток в полученной наивной культуре демонстрировали колокализованное обогащение этих эпигенетических маркеров и облаков *XIST*. Кроме того, потеря РНК *XIST* в клонах с нокаутом гена *XIST* приводила к почти полному исчезновению этих репрессивных меток, что подтверждает связь между *XIST* и рекрутированием комплексов PRC в регуляции состояния X хромосомы до установления инактивации (Alfeghaly et al. 2024). Эти данные указывают на особую роль H3K27me3 в регуляции экспрессии генов X-хромосомы, поскольку на данном этапе до

имплантации обе X-хромосомы остаются активными, что противоречит классической функции репрессии. Противоречия между исследованиями могут отражать не только различия во временных рамках развития и чувствительности методов, но и гетерогенность состояния клеток, включая номер пассажа, эпигенетическую память и вариации условий культивирования *in vitro*, такие как концентрация кислорода или сигнальный контекст при возврате к наивной плюрипотентности. В целом, эти наблюдения подчеркивают видоспецифическую и контекст-зависимую роль *XIST* и репрессии, опосредованной комплексами белков Polycomb, на ранних этапах развития человека.

1.5.4 Гетерогенность эпигенетического состояния X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека

У ПСКч в праймированном состоянии процесс инактивации уже завершён и они, как правило, содержат одну транскрипционно активную (X_a) и одну неактивную (X_i) X-хромосому (рис. 2). Однако при длительном культивировании *in vitro* праймированные ПСКч часто демонстрируют явление эрозии инактивации X-хромосомы (X_e) (Geens et al. 2016; Mekhoubad et al. 2012; Patel et al. 2017; Silva et al. 2008).

Эрозия XCI характеризуется прогрессирующей потерей на X_i экспрессии *XIST*, а также репрессивной гистоновой модификации H3K27me3, селективным деметилированием CpG-островков, накоплением длинной некодирующей РНК *HACT* и реактивацией X-сцепленных генов (Mekhoubad et al. 2012; Vallot et al. 2015). Примечательно, что появление *HACT* наблюдается на ранних стадиях эрозии — до утраты *XIST* и до детектируемой реактивации генов, локализованных на X-хромосоме. Это указывает на потенциальную роль *HACT* в дестабилизации XCI, вероятно, через модуляцию экспрессии *XIST*, активности РНК или её ядерной локализации (Vallot et al. 2015). Пассирование клеток представляет собой один из наиболее мощных факторов, способствующих эрозии XCI, хотя скорость и степень этого процесса существенно зависят от условий культивирования (Geens et al. 2016; Patel et al. 2017; Silva et al. 2008). Линии ЭСКч и ИПСКч, длительно культивируемые в стандартных праймированных условиях, нередко утрачивают экспрессию *XIST*, что способствует дальнейшему развитию эрозии инактивации X-хромосомы (Mekhoubad et al. 2012; Vallot et al. 2015).

Культуры праймированных ПСКч характеризуются выраженной гетерогенностью по эпигенетическому статусу X-хромосомы. В зависимости от статуса инактивации X-хромосомы культуры ЭСКч подразделяют на три ключевые категории: (1) X_aX_a , (2) X_aX_i

и (3) ХаХе (Bar et al. 2019; Raposo et al. 2025). Сопоставимые категории были описаны и для ИПСКч на основе транскриптомных данных и анализа глобального метилирования ДНК (Bar et al. 2019). Культуры праймированных ПСКч с двумя активными Х-хромосомами очень редки и, вероятно, представляют собой крайнюю степень эрозии неактивной Х-хромосомы. Наличие комбинации ХаХе является преобладающим среди культур ПСКч с двумя Х-хромосомами.

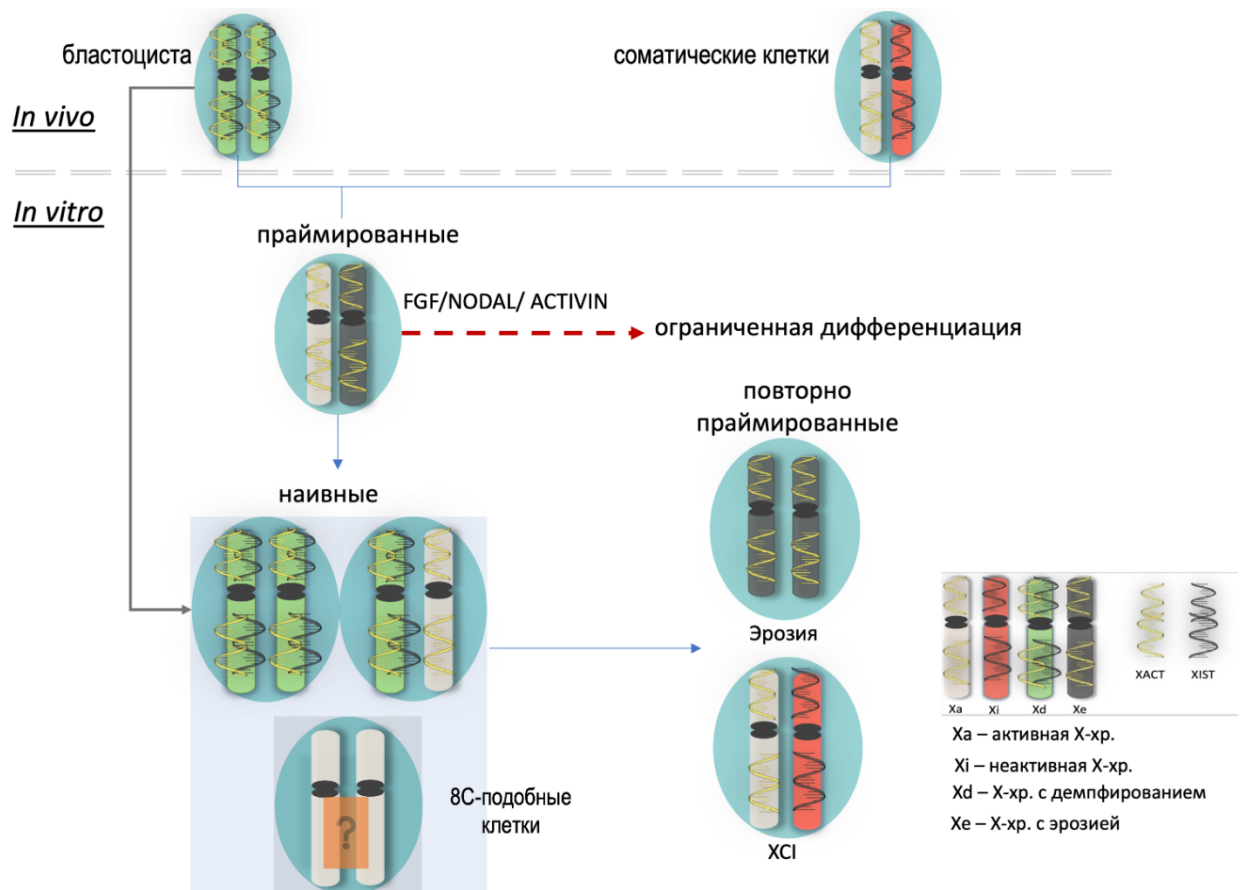


Рисунок 2. Состояние X-хромосомы в наивных и праймированных ПСКч. Существуют культуры ПСКч с различными состояниями плюрипотентности, которые могут преобразовываться друг в друга. Среды 5i/L/A и HENSM позволяют получать наивные ПСКч, соответствующие доимплантационному эпибласту, тогда как условия с FGF2 и ACTIVIN A поддерживают праймированные ПСКч, аналогичные постимплантационному эпибласту. Праймированные ПСКч характеризуются одной инактивированной X-хромосомой (Xi) с моноаллельной экспрессией *XIST*. При длительном культивировании праймированные клетки демонстрируют эрозию Xi (Xe) с утратой *XIST* и частичной реактивацией X-хромосомы. Наивные ПСКч содержат две активные X-хромосомы (XdXd). Экспрессия *XIST* в наивных культурах варьирует по степени и типу (моно- или биаллельная) в зависимости от условий культивирования и метода получения клеток. При повторном праймировании часть клеток восстанавливает неслучайную инактивацию X-хромосомы и экспрессию *XIST*.

Совместный анализ экспрессии *XIST* и транскриптомного профиля показывают, что ИПСКч на ранних пассажах преимущественно демонстрируют конфигурацию ХаХi^{XIST+}, тогда как многие линии ЭСКч находятся в состоянии ХаХе (Bar et al. 2019). Однако

исследованные в этой работе линии ЭСКч прошли значительно большее число пассажей по сравнению с недавно полученными ИПСКч, что могло исказить сопоставление, учитывая тесную связь длительного культивирования с потерей *XIST*. В поддержку этой интерпретации ряд исследований показали, что большинство ЭСКч на ранних пассажах первоначально сохраняют конфигурацию $XaXi^{XIST^+}$, но со временем постепенно утрачивают экспрессию *XIST* (Nazor et al. 2012; Silva et al. 2008). Таким образом, и ЭСКч, и ИПСКч демонстрируют прогрессирующую, но неполную реактивацию *Xi* в ходе эрозии. Эрозия сопровождается неравномерной реактивацией генов X-хромосомы. Многочисленные исследования показывают, что затрагиваются лишь отдельные подмножества X-сцепленных генов, формируя «мозаичный» паттерн транскрипционной реактивации (Raposo et al. 2025; Theunissen et al. 2016; Vallot et al. 2015). Реактивации чаще подвергаются районы *XIST*-зависимого хроматина X-хромосомы, инактивирующиеся за счет привлечения H3K27me3 (Geens et al. 2016; Vallot et al. 2015). Области, расположенные дальше от локуса транскрипции *XIST*, по-видимому, более склонны к реактивации, что согласуется с известной динамикой распространения РНК *XIST*, которая первоначально нацеливается на проксимальные участки, а затем охватывает всю хромосому. Вследствие этого отдельные гены значительно различаются по чувствительности к эрозии: например, *POLA1* часто реактивируется, тогда как *HDAC8*, *ATRX* и *HUWE1* обычно сохраняют сайленсинг (Patel et al. 2017; Raposo et al. 2025; Vallot et al. 2015). Геномные исследования подтверждают, что гены, реактивирующиеся в ходе эрозии, нередко локализуются в определённых хромосомных доменах, особенно на коротком плече (в частности, Xp22) и в центральной части длинного плеча (Xq22–Xq23) (Raposo et al. 2025). Несколько факторов, по-видимому, повышают восприимчивость к эрозии, например, статус генов, избегающих инактивации, близость к таким генам, локализация в районах X-хромосомы особо уязвимых для эрозии, снижение уровня H3K27me3 и гипометилирование промоторов.

Важно, что эрозия ХСІ носит устойчивый характер и сохраняется даже после дифференцировки, существенно снижая воспроизводимость, интерпретируемость и биологическую валидность данных, полученных с использованием праймированных ПСКч. Эрозия инактивации X-хромосомы представляет собой серьёзный и функционально значимый дефект женских ПСКч, глубоко нарушающий их свойства. Потеря дозовой компенсации приводит к повышенной экспрессии большого числа X-сцепленных генов, что, в свою очередь, вызывает широкомасштабную перестройку

клеточного протеома. Протеомные и полисомные анализы показали, что ПСКч с эрозией ХСІ характеризуются усиленным биогенезом рибосом, повышенной трансляционной активностью и увеличением приблизительно на 13% общего содержания белка, что отражает глобальное нарушение протеома клеток (Brenes et al. 2021). Этот эффект механистически усиливается сверхэкспрессией X-сцепленных регуляторов инициации трансляции и её контроля, включая EIF1AX, EIF2S3 и киназу RPS6KA3 (Brenes et al. 2021; Jackson et al. 2010), повышенное содержание которых напрямую способствует росту скорости белкового синтеза. Параллельно эрозия увеличивает экспрессию нескольких X-сцепленных киназ, вовлечённых в MEK/ERK-сигналинг, что дополнительно усиливает программы роста и метаболизма клеток. Изменённая активность сигнального пути MEK/ERK способна инициировать глобальные транскрипционные и эпигенетические сдвиги, включая гипометилирование ДНК (Song et al. 2019), что усугубляет нестабильность экспрессии как генов X-хромосомы, так и аутосом. Нарушения дозы генов могут затрагивать как продукты генов X-хромосомы, так и аутосом, приводя к воспроизводимому повышению уровней множества аутосомных белков, вовлечённых в пролиферацию, контроль клеточного цикла и онкогенные сигнальные каскады, включая ERK2, FYN и CDK6 (Brenes et al. 2021; Ly et al. 2014). В результате ПСКч с эрозией ХСІ начинают экспрессировать протоонкогены, демонстрируют ускоренную пролиферацию *in vitro*, а также утрату способности к дифференцировке или её нестабильность (Anguera et al. 2012; Mekhoubad et al. 2012; Nazor et al. 2012; Patel et al. 2017; Wutz 2012). Установлено девять протоонкогенов, уровень экспрессии которых повышается в ПСКч при эрозии ХСІ (таблица 2). Кроме того, ПСКч с эрозией ХСІ демонстрируют более незрелую дифференцировку в тератомных тестах (Anguera et al. 2012). Эрозия ХСІ нарушает зрелость нейральных и кардиальных производных ПСКч, а также формирование нейронных сетей в кортикальных мозговых органоидах (D'Antonio-Chronowska et al. 2019; Motosugi et al. 2022). Это серьёзно подрывает надёжность ПСКч как моделей развития, платформ для скрининга лекарств и источника клеток для регенеративной медицины. Принципиально важно, что эрозия не является транзиторной или обратимой адаптацией: клетки ПСКч после длительного культивирования сохраняют эти нарушения даже после дифференцировки, позволяя аномальной дозе генов X-хромосомы и искажённому протеомному состоянию передаваться в дифференцированные производные (Anguera et al. 2012; Mekhoubad et al. 2012; Nazor et al. 2012; Raposo et al. 2025).

Последствия для моделирования заболеваний особенно критичны в случае X-сцепленных патологий. При таких состояниях, как синдром Ретта, вызванный мутациями в *MECP2*, или синдром Леша–Найхана, обусловленный мутациями в *HPRT*, строгая моноаллельная экспрессия активной X-хромосомы необходима для сохранения корректных генотип-фенотипических соответствий (Marchetto et al. 2010). Эрозия XCI нарушает это требование за счёт реактивации ранее инактивированного аллеля, восстанавливая экспрессию гена до гетерозиготных или близких к норме уровней и тем самым маскируя патологический фенотип (Marchetto et al. 2010). В случае синдрома Леша–Найхана линии ПСКч, первоначально полностью лишённые активности *HPRT*, после эрозии вновь начинают экспрессировать *HPRT*, что делает их непригодными для исследований (Mekhoubad et al. 2012). Аналогичные искажения возникают и для *MECP2* и других X-сцепленных генов, где эрозия устраняет дозовую асимметрию, лежащую в основе заболевания (Mekhoubad et al. 2012).

Таблица 2. Онкогены, реактивирующиеся в клетках при эрозии неактивной X-хромосомы, и их вклад в онкологические заболевания (Anguera et al. 2012)

Гены	Онкологические заболевания	Локализация
<i>TCEAL3</i>	<i>Гепатоцеллюлярная карцинома</i>	Xq22.2
<i>MAGEA2</i>	<i>Меланома, рак молочной железы</i>	Xq28
<i>MAGEA6</i>	<i>Меланома</i>	Xq28
<i>RAB6B</i>	<i>Гепатоцеллюлярная карцинома, рак толстой кишки</i>	3q22.1
<i>AIF1</i>	<i>Кожная аденоидно-кистозная карцинома, рак желудка, немелкоклеточный рак легкого</i>	6p21.33
<i>LOC100131199</i>	<i>Рак молочной железы</i>	7q34
<i>LOC285965</i>	<i>Рак толстой кишки</i>	7q35
<i>CHP2</i>	<i>Гепатоцеллюлярная карцинома, рак молочной железы</i>	16p12.2
<i>ACP5</i>	<i>Лейкемия</i>	19p13.2

Помимо проблем моделирования заболеваний, эрозия подрывает безопасность и клиническую применимость женских ПСКч. Тесная связь между эрозией XCI,

повышением экспрессии X-сцепленных онкогенов, усилением MEK/ERK-сигналинга и ростом пролиферативной активности вызывает серьёзные опасения в отношении опухолевого риска и нестабильности дифференцированных производных ПСКч при клеточной терапии (Chaligné et al. 2015; Chaligné and Heard 2014; Motosugi et al. 2022; Patel et al. 2017). Поскольку эрозия ХС1 затрагивает значительную долю женских линий ПСКч и приводит к постоянным, наследуемым нарушениям дозовой компенсации, она представляет собой один из наиболее серьёзных и недооценённых источников биологической вариабельности в системах ПСКч. Следовательно, отсутствие контроля за эрозией ХС1 может приводить к невоспроизводимым результатам, ошибочной интерпретации механизмов заболеваний и снижению ценности исследований, что делает мониторинг и предотвращение нестабильности дозы генов X-хромосомы критически важным требованием как для фундаментальных, так и для прикладных работ с плюрипотентными стволовыми клетками человека.

Примечательно, что эрозия наблюдается практически во всех широко используемых системах культивирования ПСКч, включая mTeSR, StemFlex, E8 и классические среды для выращивания клеток на подложке из митотически инактивированных фибробластов (Mekhoubad et al. 2012; Motosugi et al. 2022; Vallot et al. 2015). Это стимулирует поиск и оптимизацию культуральных сред и других условий, способных сохранить или восстановить экспрессию *XIST*. Одним из направлений таких исследований стало изучение влияния факторов окружающей среды, прежде всего, концентрации кислорода. Поскольку пониженная концентрация кислорода является естественной средой наивных ПСКч *in vivo*, предполагали, что состояние ХаХа в ПСКч может быть получено в условиях гипоксии, после чего клетки будут способны инициировать ХС1 при их переводе в атмосферную концентрацию кислорода (Lengner et al. 2010). Однако последующие исследования поставили эту идею под сомнение, показав, что получение ПСКч в гипоксических условиях также приводят в основном к получению клеток ХаХi^{*XIST*+}, а впоследствии в ряде случаев даже ускоряет потерю *XIST* (O’Leary et al. 2012; Patel et al. 2017). Более того, стабильное поддержание состояния ХаХа наблюдается в ряде культур при атмосферной концентрации кислорода, что свидетельствует о том, что уровень кислорода сам по себе вряд ли является детерминирующим регулятором стабильности ХС1. В совокупности эти противоречивые данные подчеркивают контекст-зависимый характер влияния концентрации кислорода и сложность определения универсальных условий культивирования, надёжно предотвращающих эрозию.

Помимо этого, важную роль в стабильности ХСІ играет состав культуральной среды. Так, присутствие в среде ингибиторов гликогенсинтазы-киназы 3 (GSK3), являющихся активаторами канонического сигнального пути WNT, таких как, например, хлорид лития (LiCl), приводит к утрате РНК *XIST* на X_i в культурах ЭСКч (Cloutier et al. 2022; Freland and Beaulieu 2012). Фармакологическое ингибирование GSK3 более селективными соединениями, такими как Alsterpaullone, BIO и LY2090314, приводит к сходным результатам, что указывает на возможную дестабилизацию ХСІ при активации каскада WNT (Cloutier et al. 2022). Однако эта интерпретация остается неоднозначной, поскольку ряд сред для индукции наивного состояния, включая 5iLAF, также содержит ингибиторы GSK3 и при этом поддерживает конфигурацию $X_a^{XIST^+} X_a^{XIST^-}$ в условиях наивной плюрипотентности (Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2016).

Ключевая роль репрессии гена *XIST* в эрозии ХСІ была подтверждена с помощью технологии геномного редактирования. Таргетирование области промотора *XIST* с использованием CRISPR–Cas9 позволило реактивировать экспрессию гена *XIST* в праймированных ПСКч с эрозией ХСІ и восстановить обогащение H3K27me3, что сопровождалось снижением экспрессии X-сцепленных генов (Motosugi et al. 2022). Сходные эффекты были получены при эктопической интеграции полноразмерного локуса *XIST* посредством гомологичной рекомбинации (Motosugi et al. 2022). Несмотря на экспериментальную ценность, эти подходы нельзя использовать для предотвращения эрозии ХСІ при культивировании ПСКч, так как они ограничены низкой эффективностью получения корректно модифицированных клонов, неполным восстановлением доменов H3K27me3, а также сохраняющимися опасениями относительно специфичности, нежелательных мутаций и геномной нестабильности.

Перевод праймированных ПСКч в наивное состояние изначально рассматривался как перспективная стратегия преодоления эрозии ХСІ (Guo et al. 2017; Sahakyan et al. 2017). Эта стратегия предусматривает перевод праймированных ПСКч в наивное состояние, соответствующее стадии демпфирования транскрипции X-хромосом, с последующим возвратом клеток в праймированное состояние (повторным праймированием) для перезапуска инактивации X-хромосомы. Переход к наивной плюрипотентности сопровождается реактивацией как X_i так и X_e , что позволяет частично нивелировать эпигенетические последствия длительного культивирования ПСКч в праймированном состоянии (Guo et al. 2017; Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2014). Однако первые полученные наивные ПСКч характеризовались наличием двух активных X-хромосом без

экспрессии *XIST* ($Xa^{XIST-}Xa^{XIST-}$) (Gafni et al. 2013; Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2014; Vallot et al. 2015), что не соответствовало данным о состоянии X-хромосом *in vivo*, согласно которым бластомеры человека до имплантации содержат две X-хромосомы в состоянии $Xa^{XIST+}Xa^{XIST+}$ (Okamoto et al. 2011; Petropoulos et al. 2016). Это несоответствие стимулировало разработку усовершенствованных протоколов получения наивных ПСКч, направленных на более точное воспроизведение эпигенетического состояния X-хромосом в наивных ПСКч.

Некоторые условия для индукции и поддержания наивных ПСКч, такие как 5iLAF, 4iLA/F, 2iLGö, FINE, PXGL и HENSM способствуют реактивации X-хромосомы (Bredenkamp et al. 2019b; Sahakyan et al. 2017; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). По мере дальнейшего пассирования может формироваться небольшая субпопуляция клеток $Xa^{XIST+}Xa^{XIST+}$. Транскриптомные анализы также подтверждают наличие демпфирования экспрессии генов X-хромосомы в установленных наивных ПСКч, в значительной степени соответствующего $Xa^{XIST+}Xa^{XIST+}$ и отражающего эпигенетическую конфигурацию клеток, характерную для ранней бластоцисты человека (Okamoto et al. 2011; Sahakyan et al. 2017). Однако доля клеток $Xa^{XIST+}Xa^{XIST+}$ остаётся низкой и особенно ограниченной в средах типа 2iLGö, где состояние $XaXa$ в целом наблюдается реже (Sahakyan et al. 2017). Так же сохраняется эпигенетическая память исходной X_i , проявляясь при последующей дифференцировке, главным образом в том, что инактивация X-хромосомы происходит не случайным образом и ей подвергаются преимущественно бывшие X_e или X_i (Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2016). Способность к повторной неслучайной инактивации X-хромосомы регистрируют в производных наивных плюрипотентных клеток, полученных в средах 5iLA/F и HENSM (An et al. 2020; Bayerl et al. 2021). Большинство работ по исследованию инактивации X-хромосомы в наивных ПСКч ведётся на среде 5iLA/F (An et al. 2020; Bredenkamp et al. 2019b; Fischer et al. 2025; Johnson et al. 2021; Pastor et al. 2016; Sahakyan et al. 2017; Di Stefano et al. 2018; Tu et al. 2023; Vallot et al. 2017; Wojdyla et al. 2020; Yu et al. 2021b). Следует отметить, что к повторной инактивации способны как ПСКч полученные на среде 5iLA/F, так и на её упрощенной модификации 4iLA/F, которая не позволяет получать истинно наивные ПСКч (Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). Среда HENSM по сравнению с 5iLA/F видится более эффективной как в реактивации X-хромосомы, так и в повторной её инактивации, однако об этом имеется только одно сообщение в первой статье, посвященной среде HENSM (Bayerl et al. 2021). Относительно

наивных ПСКч, полученных с применением других сред, сведения о способности запускать процесс инактивации X-хромосомы отсутствуют, и их производные, вероятно, после дифференцировки сохраняют активное состояние на обеих X-хромосомах, сходное с эрозией ХС1. Таким образом, эпигенетический статус X-хромосом в ПСКч и их дифференцированных производных зависят от используемой среды для индукции и поддержания наивной плюрипотентности.

Переходы между плюрипотентными состояниями демонстрируют динамичную регуляцию *XIST*. Конверсия праймированных клеток, утративших *XIST* (ХаХi или ХаХе), в наивную конфигурацию $\text{Ха}^{\text{XIST}^-}\text{Ха}^{\text{XIST}^+}$, как правило, происходит через промежуточное состояние $\text{Ха}^{\text{XIST}^-}\text{Ха}^{\text{XIST}^-}$ (Sahakyan et al. 2017). Аналогичное транзитное состояние наблюдается при возврате в праймированное состояние и последующей дифференцировке: наивные клетки $\text{Ха}^{\text{XIST}^-}\text{Ха}^{\text{XIST}^+}$ проходят стадию $\text{Ха}^{\text{XIST}^-}\text{Ха}^{\text{XIST}^-}$ перед формированием ХаХi (Sahakyan et al. 2017). Эти наблюдения указывают на то, что подавление биаллельной экспрессии *XIST* предшествует его последующей активации, подчёркивая пластичность регуляции X-хромосомы в ходе переходов клеточных состояний. Примечательно, что ЭСКч, полученные непосредственно в условиях 5iLAF, преимущественно демонстрируют конфигурацию ХаХа с моноаллельной экспрессией *XIST*; однако при дальнейшем пассировании появляются клетки $\text{Ха}^{\text{XIST}^-}\text{Ха}^{\text{XIST}^+}$ без явного прохождения промежуточного *XIST*-негативного состояния (Sahakyan et al. 2017), что может указывать на различия между протоколами.

Накопленные данные также показывают, что данный подход не всегда обеспечивает полную реактивацию X-хромосомы. Панова с соавторами продемонстрировали, что перевод в наивное состояние часто приводит лишь к частичной реактивации (Panova et al. 2018). Линии ПСКч с выраженной степенью эрозии до перепрограммирования в значительной мере сохраняли этот статус и не демонстрировали дальнейшей реактивации (Panova et al. 2018). Обогащение 5-гидроксиметилцитозином (5-hmC) после наивной конверсии было переменным и соответствовало неполной реактивации (Panova et al. 2018). Учитывая связь 5-hmC с активным деметилированием ДНК и его частое присутствие в регуляторных областях, содержащих модификации H3K4me1 и H3K4me2 (Szulwach et al. 2011), его гетерогенное распределение подтверждает неравномерный характер эпигенетических изменений при реактивации Xi или Xe. Следует отметить, что эти эксперименты проводились с использованием среды NHSM, которая, как показано, формирует скорее «наивно-подобное», чем подлинно наивное состояние. NHSM вызывает

лишь умеренное снижение глобального метилирования ДНК, значительно менее выраженное, чем в истинно наивных ПСК, и не обеспечивает активацию дистального энхансера OCT4 в системе OCT4-DPE-GFP, которая считается строгим функциональным признаком наивной плюрипотентности (Theunissen et al. 2014). Вероятно, это может быть одной из причин неполной обратимости эрозии ХСІ в среде NHSM (Bayerl et al. 2021).

Хотя подход повторного праймирования полученных наивных ПСКч временно способен восстановить признаки корректно инактивированной Х-хромосомы, поддержание ХСІ обычно ограничено несколькими пассажами, после чего эрозия возникает вновь (Patel et al. 2017). Это указывает на то, что перевод в состояние наивной плюрипотентности может временно стирать эпигенетические нарушения, но не устраняет лежащую в их основе нестабильность. На сегодняшний день не существует метода, который надежно гарантирует долговременное сохранение или восстановление ХСІ, что подчеркивает фундаментальный характер проблемы эпигенетической нестабильности в женских линиях ПСКч. В целом существующие стратегии, оптимизация условий культивирования, геномное редактирование и наивное перепрограммирование обеспечивают лишь частичное и зачастую временное решение.

Последующие усилия были направлены на разработку сред для индукции наивного состояния, способных более эффективно снижать метилирование ДНК, в частности, за счет включения ингибитора FGFR (BRAF inhibitor) (Bayerl et al. 2021; Theunissen et al. 2014). Протоколы 5iLA, 2iLGö и HENSM позволяют получать наивные ЭСКч, более близкие по транскриптомным и эпигенетическим характеристикам к эпибласту доимплантационных эмбрионов человека и мыши (Collier and Rugg-Gunn 2018; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2016). Несмотря на реактивацию Х-хромосомы, такие культуры часто демонстрируют моноаллельную экспрессию *XIST*, выраженную гетерогенность и вариабельность между экспериментальными сериями (Sahakyan et al. 2017; Vallot et al. 2015). Кроме того, хотя наивные ПСКч способны инициировать ХСІ после репраймирования, инактивация нередко происходит преимущественно на ранее неактивной хромосоме (Sahakyan et al. 2017). Одной из причин гетерогенности считается неполное подавление FGF-сигналинга вследствие аутокринной активности FGF2 (An et al. 2020). Удаление из среды ростового фактора FGF2 способствует формированию более однородных культур с транскриптомом и статусом Х-хромосомы, близкими к доимплантационному эпибласту (An et al. 2020). Такие клетки демонстрируют повышенную экспрессию *TFCP2L1*, активацию *STAT3* и *NANOG* и способны

инициировать случайную ХСІ при дифференцировке, связанных с усилением сигнального каскада LIF/JAK/STAT3 (An et al. 2020; Vi et al. 2020). Тем не менее, практическое применение подобных протоколов остается затруднительным: переход в наивное состояние часто сопровождается массивной гибелью клеток, а эффективность перепрограммирования и выживаемость существенно варьируют между линиями (An et al. 2020; Theunissen et al. 2014). Предложенная оптимизация, включая культивирование при пониженном уровне кислорода (5% O₂), частично улучшает жизнеспособность, но усложняет стандартизацию (An et al. 2020). Дополнительным ограничением является выраженная гетерогенность способности к ХСІ после повторного праймирования. Кроме того, в условиях t5iLAF не все наивные ПСКч успешно инициируют инактивацию: часть клеток не завершала ХСІ, а около 50% сохраняли конфигурацию ХаХа, что свидетельствует о неполном восстановлении механизмов дозовой компенсации (Shang et al. 2024).

Среда HENSM (Human Enhanced Naïve Stem Cell Medium) представляет собой одно из заметных достижений в разработке платформ для индукции наивного состояния, направленных на более точное воспроизведение плюрипотентности доимплантационного периода (Bayerl et al. 2021). В отличие от ранних протоколов, HENSM обеспечивает выраженное снижение глобального метилирования ДНК при одновременном сохранении геномного импринтинга, устраняя серьезное ограничение, характерное для 5iLAF и t2iLGö (Bayerl et al. 2021; Pastor et al. 2016; Theunissen et al. 2016). Наивные ПСКч, полученные в этих условиях, способны инициировать ХСІ после повторного праймирования, однако инактивация преимущественно является неслучайной. Дополнительная оптимизация среды за счет ингибирования сигнального пути рецепторов FGF или усиление подавления сигнального каскада MEK/ERK способствует формированию случайной ХСІ после повторного праймирования наивных ПСКч (Bayerl et al. 2021). Эти результаты согласуются с данными о ключевой роли FGF-сигналинга в регуляции динамики X-хромосомы и подчеркивают важность точной настройки сигнальных путей для достижения подлинной наивной плюрипотентности (An et al. 2020; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014). В целом HENSM можно рассматривать как значительный шаг вперед в дизайне наивных культур, хотя остается необходимость в её дальнейшем совершенствовании для обеспечения полного соответствия наивного состояния плюрипотентности *in vitro* и *in vivo*, а также эпигенетической и геномной стабильности получаемых линий наивных ПСКч.

Заключение по обзору литературы

Стабилизация состояния ПСКч является ключевым условием их воспроизводимого использования как в фундаментальных исследованиях раннего эмбрионального развития, так и в прикладных задачах регенеративной медицины. Особое значение в этом контексте имеет корректная регуляция X-хромосомы. Эрозия инактивации X-хромосомы в праймированных ПСКч представляет собой одно из наиболее серьезных препятствий: она формируется в условиях *in vitro* и сохраняется после дифференцировки, тем самым снижая биологическую валидность клеточных моделей и потенциальную безопасность производных клеток. Перевод праймированных ПСКч в наивное состояние рассматривается как одна из возможных стратегий преодоления этой проблемы. Переход в состояние наивной плюрипотентности сопровождается реактивацией X-хромосомы, что потенциально позволяет стереть последствия эрозии и перезапустить ХСІ при дифференцировке. Однако далеко не все протоколы получения наивных плюрипотентных клеток обеспечивают клеткам возможность при повторном праймировании и дифференцировке запускать ХСІ. В тех случаях, когда наивные ПСКч демонстрируют способность воспроизводить ХСІ, инактивация X-хромосомы происходит неслучайным образом, отражая сохранение эпигенетической памяти о её предшествующем состоянии. Такая преимущественная инактивация указывает на то, что ключевые элементы регуляции X-хромосомы не полностью перезаписываются в ходе перехода в наивное состояние. Следовательно, наивное состояние не устраняет фундаментальную проблему нестабильности ХСІ и требуются дальнейшие исследования для понимания регуляции эпигенетического статуса X-хромосом в ПСКч. В данной работе была поставлена задача выявить ключевые компоненты наивных сред, влияющие на статус X-хромосом, и использовать их для восстановления нормального неактивного состояния X-хромосомы с эрозией. Кроме того, была предпринята попытка выяснить причины неслучайной инактивации X-хромосомы и предложить способ, позволяющий вернуть плюрипотентным клеткам человека способность воспроизводить случайную инактивацию.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Культивирование клеточных линий

2.1.1 Клеточные линии, использованные в исследовании

В работе использовали эмбриональные стволовые клетки человека линий HuES9 (номер hPSCreg: HVRDe009-A) (Cowan et al. 2004) и ESM04 (Lagarkova et al. 2006; Prokhorovich et al. 2007). Обе клеточные линии, HuES9 и ESM04, имеют кариотип 46,XX. В настоящем исследовании также использовали две линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: ICGi021-A (K6-4Lf) и ICGi022-A (K7-4Lf) (Malakhova et al. 2020). Линии были получены путём репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови двух здоровых женщин-доноров в возрасте 30 и 42 лет.

2.1.2 Культивирование праймированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Плюрипотентные стволовые клетки человека (ПСКч) поддерживали на подложке из эмбриональных фибробластов мыши, обработанных митомицином, в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco). Культуральная среда дополнялась 10% заменителя сыворотки KnockOut Serum Replacement (KoSR, Thermo Fisher Scientific), 1% заменимых аминокислот (NEAA, Thermo Fisher Scientific), 1 мМ GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл FGF2 (Sci-store), 0.1 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma–Aldrich), а также либо 200 мкг/мл примодина (InvivoGen), либо 50 ед/мл пенициллина and 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific) для предотвращения микробной контаминации.

При культивировании праймированных ПСКч в условиях ингибирования SRC киназы (SRCi) использовали стандартную среду для праймированных ПСКч, дополняя её факторами роста: 10 нг/мл рекомбинантного LIF (Sci-store) или 10 нг/мл рекомбинантного CCL2 (BioLegend), а также малыми молекулами: 1 мкМ ингибитора киназы MEK PD0325901, 2 мкМ ингибитора WNT XAV939 и 1.2 мкМ ингибитора SRC CGP77675 (все — R&D Systems).

Клеточные культуры содержали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, смена среды осуществлялась ежедневно. Клетки пересаживали после достижения ~80% конфлюэнтности (каждые 3–4 дня), используя для дезагрегации рекомбинантный фермент TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific). Для повышения жизнеспособности при пересеве клеткок использовали ингибитор Rho-киназы тиазовивин (Merck) в концентрации 10 мкМ.

2.1.3 Культивирование ПСКч на матрикеле

Линии ИПСК культивировали на поверхностях, покрытых матриксом Matrigel (Corning) по инструкции производителя с использованием холодной среды DMEM/F-12 для разведения. При дезагрегации клеток использовали раствор 0,5 мМ ЭДТА в фосфатно-солевом буфере PBS. После начала дезагрегации клеток убрали раствор ЭДТА, клетки ресуспендировали в среде Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10 мкМ тиазозивина, переносили на новые культуральные поверхности и культивировали при 37 °С и 5% CO₂. Смену среды проводили ежедневно, параллельно оценивая морфологию колоний.

2.1.4 Замораживание ПСКч

ПСКч дезагрегировали с использованием фермента TrypLE Express, затем центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в криопротекторной среде, содержащей 10% диметилсульфоксида (DMSO) и 90% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Life Technologies). Суспензию распределяли по криовиалам объемом 1 мл, помещали в замораживающий контейнер и выдерживали при –80 °С ночь для контролируемого снижения температуры. На следующий день криовиалы переносили в жидкий азот для длительного хранения.

2.1.5 Размораживание ПСКч

ПСКч размораживали при 37 °С. Размороженную суспензию переносили в 15 мл пробирку с 5 мл среды и центрифугировали при 200 g в течение 3 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в ростовой среде и высевали на культуральные планшеты.

2.1.6 Индукция наивного состояния

Состав среды HENSM (Bayerl et al., 2021), используемой для индукции и поддержания наивного состояния в праймированных ПСКч, включал смесь 1:1 сред Neurobasal и DMEM-F12, дополненную 1% N2, 1 мМ GlutaMAX, 1% NEAA (все — Thermo Fisher Scientific), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific), 2% B27 (Thermo Fisher Scientific), 0,2% Geltrex (Thermo Fisher Scientific), 50 мкг/мл 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich), 20 нг/мл рекомбинантного LIF (Sci-store), а

также ингибиторы киназ: 1 мкМ MEK_i PD0325901, 2 мкМ WNT_i XAV939, 2 мкМ PKC_i Gö6983, 1.2 мкМ SRC_i CGP77675 (все — R&D) и 5 мкМ тиазовивин (Stemolecule).

2.2 Окрашивание на щелочную фосфатазу

Клетки фиксировали в 4% растворе формальдегида (v/v) в течение 15 минут, после чего дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) по 10 минут. Окрашивание проводили с использованием набора для выявления щелочной фосфатазы Alkaline Phosphatase Staining Kit (Merck). Одну таблетку реактива растворяли в 5 мл PBS и инкубировали в темноте 10 минут. Полученный раствор добавляли к фиксированным клеткам и инкубировали при 25°C в течение 20 минут. После этого клетки промывали PBS и анализировали колонии с использованием фазово-контрастного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E в пяти независимых полях зрения.

2.3 Протокол фиксации метафазных хромосом

Клетки культивировали в лунке площадью 4 см² до достижения ~80% конfluence. В день фиксации культуральную среду полностью заменяли на 1 мл свежей, после чего добавляли колцемид и этидиум бромид до конечной концентрации 0,1 мкг/мл и 1,5 мкг/мл соответственно. Инкубацию проводили 2,5 часа при 37 °C. Затем клетки обрабатывали TrypLE при 37°C, добавляли 3 мл предварительно подогретого до 37 °C гипотонического раствора KCl (0,56%) и инкубировали 20 минут при 37°C. Для префиксации к клеткам добавляли две капли свежеприготовленного холодного фиксатора Карнуа (метанол: ледяная уксусная кислота, 3:1). Клетки аккуратно собирали в коническую пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 1300 об/мин в течение 7 минут. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл свежеприготовленного холодного фиксатора Карнуа и инкубировали на льду 20 минут, после чего вновь центрифугировали 5 минут при 1300 об/мин. Далее проводили дополнительную промывку в 1 мл свежего фиксатора с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости. Осадок ресуспендировали в 400–500 мкл фиксатора. Клеточную суспензию раскапывали по 40 мкл на предметные стекла. Образцы высушивали на воздухе. Для последующего анализа на стекла наносили 1–2 капли раствора DAPI, накрывали покровным стеклом, и заклеивали края прозрачным лаком для ногтей. Метафазные хромосомы визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E при увеличении 600× с иммерсионным маслом и источником УФ-излучения. Карiotипирование проводилось в

соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры хромосом человека (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN). Анализировали не менее 50 метафазных пластинок.

2.4 Идентификация клеточной линии с помощью STR-анализа

Идентификация клеточной линии методом анализа коротких tandemных повторов (STR) была проведена для подтверждения идентичности генома наивных клеток и их исходной линии. Геномная ДНК была выделена из двух лунок 12-луночного планшета, содержащих клетки с 70–80% конfluence, на седьмом пассаже, культивированных в среде для индукции наивного состояния. Экстракция ДНК осуществлялась с использованием системы очистки геномной ДНК Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Генотипирование и STR-анализ были выполнены в лаборатории Геноаналитика (<https://www.genoanalytica.ru>). STR-профилирование проводилось с использованием наборов AmpFI STR Identifiler (Applied Biosystems) и Investigator HDplex (QIAGEN).

2.5 Тестирование культур на контаминацию микоплазмой и наличие эписом

Отсутствие контаминации ИПСК микоплазмой было подтверждено методом ПЦР. Тестирование проводилось с использованием набора BioMaster HS-Taq PCR-Color 2× (Biolabmix) на амплификаторе S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Условия ПЦР: предварительная денатурация при 95°C в течение 2 минут; 35 циклов: 95°C — 15 секунд, 67°C — 20 секунд, 72°C — 30 секунд; финальная стадия элонгации — 72°C в течение 3 минут.

Для выявления остаточных эписом проводилась амплификация гена *EBNA-1* методом ПЦР. Условия амплификации: 95°C в течение 5 минут; 35 циклов: 95°C — 15 секунд, 58°C — 15 секунд, 72°C — 20 секунд; финальная стадия элонгации — 72°C в течение 5 минут.

Олигонуклеотиды для праймирования ПЦР приведены в таблице 3.

2.6 Белковый иммуоблот

Белковый экстракт получали из 10⁵ клеток, используя буфер RIPA (Sigma-Aldrich, R0278). Для каждого образца загружали 8 мкг белка на 10 % SDS-PAGE и разделяли с помощью системы BIORAD Mini-Protein Electrophoresis Tetra System (Bio-Rad). После

электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad) с использованием влажного метода переноса Biogen™ (Bio-Rad). Мембрану разрезали на две части по линии предокрашенного маркера молекулярной массы: одну использовали для выявления целевого белка, вторую – для детекции референсного белка *ACTB* или *SMC1*. Для визуализации применяли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, направленные против IgG кролика или мыши. Полный список первичных и вторичных антител с указанием разведения приведён в таблице 4. Сигнал хемилюминесценции регистрировали с помощью набора Bio-Rad Clarity Max Western ECL Substrate (30 мкл рабочего раствора на 1 см² мембраны) на приборе Bio-Rad ChemiDoc MP. Денситометрический анализ для количественной оценки различий в экспрессии белков проводили в программе ImageJ, рассчитывая отношение интенсивности сигнала целевого белка к референсному. Эксперименты проводили в двух биологических и трёх технических повторностях. Статистическую обработку результатов выполняли методом однофакторного дисперсионного анализа.

2.7 ПЦР в режиме реального времени

РНК выделяли из клеток с помощью реактива TRIzol (Thermo Fisher Scientific, 15596026) по инструкции производителя. Очистку РНК от контаминации геномной ДНК проводили с помощью набора DNA Free (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию РНК в образце измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop. Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (Biolabmix) и случайных гексамерных праймеров (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителей. Инактивацию ревертазы проводили при 95°C в течение 10 мин. Полученную кДНК хранили при -20°C. Для каждой реакции обратной транскрипции делали отрицательный контроль на контаминацию геномной ДНК, который представлял собой ту же реакцию, но без добавления обратной транскриптазы. Реакцию полуколичественного ПЦР проводили с ПЦР-смесью БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛаб-Микс, МНС030) по инструкции производителя на приборе QuantStudio 5. Программа реакции: 95°C — 1 минутка; 40 циклов: 95°C — 10 секунд, 60°C — 1 минута); нагрев до 97°C для построения кривой плавления. Продукты генов *ACTB*, *B2M* и *TFRC* были выбраны в качестве референсных. Эксперименты проводили в трёх биологических и трёх технических повторностях. Сравнение групп, соответствующих разным условиям культивирования, проводили,

используя непарный Т-критерий Стьюдента в программе Qbase, RStudio 4.4.2 and Prism 10. Праймеры, использованные в исследовании, перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Праймеры, использованные в работе

Тест	Локус	Размер, п.н.	Прямой/обратный праймер (5'-3')
Обнаружение эписомальных векторов	<i>EBNA-1</i>	196	TCCCGCAGATCTTCCTGCTCCTGTTCCA CCG / CTCAAAGGATCCGGGGTGATAACCATG GACGA
Обнаружение микоплазмы	Ген рибосомной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT / TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
Референсные гены для количественной ОТ-ПЦР	<i>TFRC</i>	80	GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT / AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC
	<i>B2M</i>	167	CACCCCCACTGAAAAAGATG / ATATTAAAAAGCAAGCAAGCAGAA
	<i>ACTB</i>	308	AGGCACCAGGGCGTGAT / GATAGCACAGCCTGGATAGCA
Целевые гены для количественной ОТ-ПЦР	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGGCCTGAAGAAACT / AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
	<i>TFCP2L1</i>	129	TTTGTGGGACCCTGCGAAG / TGCTTAAACGTGTCAATCTGGA
	<i>KLF17</i>	200	AACATTGTTGGGCCCGACT / CGGGCTGCTCTGGTAGAAAT
	<i>TFE3</i>	135	AGCCATCACTGTCAAGCAACT / TCTCTTTCTTCTGCCGTTCT
	<i>DAZL</i>	118	ATGTTGTACCTCCGGCTTATTCA / CCATTTCCAGAGGGTGGAGTA
	<i>LEUTX</i>	105	TGGCTTCAAAGCTACAACCTTGAT / ATGGCCGTGTCTGCATTT
	<i>LTR7Y</i>	190	GCCATTTTATAGGATTTGGGAAG / TAACTGATGACATTCACCATTG
	<i>HIF1A</i>	118	TGCAACATGGAAGGTATTGC / TTCACAAATCAGCACCAGC
	<i>HIF2A</i>	110	TGCTACGCCACCAGTACCA / CAGTTCGGGCAGCAGGTAGG
	<i>GLUT1</i>	308	GATTGGCTCCTTCTCTGTGG / TCAAAGGACTTGCCAGTTT
	<i>GLUT3</i>	172	CAATGCTCCTGAGAAGATCATAA / AAAGCGGTTGACGAAGAGT
	<i>XIST</i> (экзон)	100	GCAAAATTCCAATGTTTCATGGTCTCT / TCCAAGAGAAGGACTCTGGGT
	<i>XIST</i> (Инtron)	124	GCCAAGATAGGATTAATATTGCAGCCA / ACACAATGGCTATGCTCTATCCCT

Праймеры для анализа SNP	<i>IGSF1</i>	230	CTCACTGCGATGTGACCAGA / GCTTGAACACAGTGCTTGGCCAAGCTG
	<i>INTS6L</i>	212	TCCTGTCAAAATCTGCTCCATCA / AGCTCCCAAAGTAGATGCTACTG
	<i>CD99</i>	144	GCACTGATGATCGCCAACTC / CAACATAGAGACCACCCCGT
	<i>OCRL</i>	515	ACGATCTCGGGCTCCAAGTA / ACTGCACGCAGACAGTGAAT
	<i>FHL1</i>	301	TATGGGTTTGGAAACTTGCATGA / CTGCATTTTCAGGTAAGCGGT
	<i>MMGT1</i>	401	CCATTTTGGTCTCATCAGGGA / TATAAAACACTCCTCCCTGCCC
	<i>ALG13</i>	132	CCGACTTATCCTGCAAATTGGT / СТААТААСААГАТСТГСТТТСТГААТГ
	<i>CDKL5</i>	322	AGCTCCGGTTCAAACCTCTGT / TGGGGCAATGATTTTGTGTTGGT

2.8 Тест на способность формировать бластоиды

Формирование бластоидов проводили из наивных ПСКч, которые при конфлюэнтности 60–70% подвергали диссоциации до одиночных клеток с использованием TrypLE Express (37 °С, 3 мин). Затем клетки собирали центрифугированием при 200 g в течение 5 минут и ресуспендировали в свежей среде HENSM. Полученную клеточную суспензию инкубировали на желатинизированной культуральной поверхности 30 минут при 37 °С и 5% CO₂ для удаления фидерных клеток. Среду, содержащую наивные ПСКч, собирали и пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм. Лунки планшета AggreWell 400 (STEMCELL Technologies) в соответствии с инструкциями производителя промывали антиадгезионным раствором (STEMCELL Technologies), центрифугировали 5 минут при 2 000 g и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. После инкубации лунки один раз промывали средой HENSM, затем добавляли 0,5 мл свежей среды HENSM, содержащей 5 мкМ тиазовивина (Stemolecule). Около 30000 клеток (примерно 25 клеток на микролунку) ресуспендировали в 1 мл HENSM с 5 мкМ тиазовивина (Stemolecule) и высевали на одну лунку подготовленного 24-луночного планшета AggreWell 400. Планшет центрифугировали при 200 g в течение 1 минуты и оставляли при 37 °С. Агрегаты формировались в течение 12–16 часов. Затем среду HENSM заменяли на TDM и обновляли каждые два дня на протяжении шести дней. Состав TDM, ранее описанный для 5iLA-наивных ПСКч, был модифицирован для адаптации к протоколам HENSM и включал смесь 1:1 (v/v) DMEM/F12 и Neurobasal, 0,5× добавку N2, 0,5× GlutaMAX, 0,5× раствор заменимых

аминокислот (все Thermo Fisher Scientific), 0,5× добавку B27 (Thermo Fisher Scientific), 0,1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), ITS-X (Gibco), 0,5% Knockout Serum Replacement (Gibco), 0,1% FBS (Cell Technologies), 50 мг/мл BSA (Sigma-Aldrich), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (InvivoGen), 1 мкМ Gö6983, 1 мкМ PD0325901, 0,5 мкМ CGP77675, 0,5 мкМ A83-01, 1,25 мкМ CHIR99021, 0,5 мкМ SB431542 (все R&D), 25 нг/мл рекомбинантного LIF человека (Sci-Store), 10 нг/мл EGF (Peprotech), 0,75 мкг/мл L-аскорбиновой кислоты и 0,4 мМ вальпроевой кислоты (обе Sigma-Aldrich). Через шесть дней бластоиды изолировали и фиксировали 4% раствором формальдегида в PBS для иммуноокрашивания с антителами к OCT4.

2.9 Спонтанная дифференцировка ПСКч

Спонтанная дифференцировка ПСКч в производные трёх зародышевых листков проводилась в монослойной культуре. Клетки культивировали до конфлюэнтности 30% на матриксе Matrigel (Corning), затем среду заменяли на дифференцировочную, содержащую смесь DMEM/F12 (Gibco) в соотношении 1:1, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Cell Technologies), 1 мМ GlutaMax (Thermo Fisher Scientific), 1% раствора заменимых аминокислот (NEAA; Thermo Fisher Scientific), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (InvivoGen). Смена среды проводилась ежедневно. Результаты спонтанной дифференцировки анализировали на 23-й день методом иммунофлуоресценции.

2.10 Дифференцировка наивных ПСКч в производные трофобласта

Для направленной дифференцировки в трофобластные производные наивные ПСКч диссоциировали с использованием TrypLE и высевали с плотностью 2×10^6 на поверхность площадью 10 см², обработанную коллагеном IV (Sigma-Aldrich). Через два дня к клеткам добавляли среду TSC (Okae et al. 2018), содержащую смесь DMEM/F12 (1:1, Gibco), 0,2% FBS (Cell Technologies), 0,3% BSA (Sigma-Aldrich), 0,1 мМ β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 1% ITS-X (Gibco), 1,5 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich), 50 нг/мл EGF (Peprotech), 2 мМ CHIR99021, 0,5 мМ A83-01, 1 мМ SB431542 (все R&D), 0,8 мМ вальпроевой кислоты (Sigma-Aldrich), 5 мМ тиазовивина (Stemolecule), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (InvivoGen). Среду меняли ежедневно. На 5-й день при достижении колониями 50–70% конфлюэнтности, их пересаживали с помощью ферментативной диссоциации TrypLE в соотношении 1:4. Гомогенные культуры трофобластных клеток формировались к пятому пассажу. Далее клетки пересевали

каждые 3–4 дня в соотношении 1:4–1:6. На десятом пассаже клетки высевали на покровные стекла и окрашивали антителами к специфическим маркерам (таблица 4).

2.11 Дифференцировка ПСКч в эндотелиальные производные

Эндотелиальные производные ПСКч получали через стадию мезодермальных клеток-предшественников с последующей эндотелиальной дифференцировкой по модифицированному протоколу Gu (Gu 2018). В первый день плюрипотентные клетки высевали на покрытую Matrigel (Corning) поверхность при конфлюэнтности 60–70% в стандартной среде для культивирования ПСКч. На следующий день начинали мезодермальную дифференцировку в среде RPMI 1640, содержащей добавку B27 без инсулина (Thermo Fisher Scientific), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (InvivoGen) и 6 мкМ ингибитора GSK3 CHIR99021 (R&D). Через два дня концентрацию CHIR99021 в среде снижали до 3 мкМ ещё на два дня. Затем клетки переносили в среду EGM-2 (Lonza) с добавлением 50 нг/мл VEGF, 25 нг/мл FGF2 (Sci-Store) и 10 мкМ SB431542 (R&D) для стимуляции эндотелиального роста. В течение следующих восьми дней ежедневно заменяли половину объема эндотелиальной среды.

2.12 Проточная цитометрия (FACS)

Для анализа клеток методом проточной цитометрии колонии ПСКч дезагрегировали до одноклеточной суспензии с помощью TrypLE (Thermo Fisher Scientific). Полученную суспензию распределяли по 3–4 пробиркам, центрифугировали (300 g) и осторожно удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания (2,5% BSA в PBS) с добавлением антител к маркерам эндотелиальной дифференцировки: CD31-APC (17-0319-42, eBioscience), VEGFR2-PE (560494, BD Biosciences) и VE-кадгерина (17-0909-42, eBioscience) и соответствующих изотипических контролей.

Для анализа маркера тотипотентных клеток ПСК после дезагрегации фиксировали 15 минут смесью 2% формальдегида и 0,2% тритона X-100, дважды промывали PBS, осаждая клетки центрифугированием для смены раствора, осадок растворяли в буфере для окрашивания, разделяли на аликвоты, к одной из которых добавляли 1 мкл антител к LEUTX (PA5-59595, Thermo Fisher Scientific). Параллельно готовили контроли образцов с соответствующими изотипическими антителами (IgG). Пробирки инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин. В пробирки с антителами к эндотелиальным

маркерам и их изотипическим контролям добавляли 300 мкл буфера и анализировали на клеточном сортере FACSAria III (Becton Dickinson), регистрируя не менее 10^4 событий на образец. Клетки в пробирке с антителами к LEUTX трижды промывали PBS, меняя PBS после осаждения клеток. После последней промывки клетки суспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания и инкубировали с 1 мкл флуоресцентно меченых вторичных антител Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (H + L) (Cat #A21043, Thermo Fisher Scientific) еще час при комнатной температуре, после чего к клеткам добавляли 300 мкл буфера и переходили к анализу клеток на цитометре FACSAria III (Becton Dickinson).

Анализ жизнеспособности ПСКч проводили с помощью окрашивания йодидом пропидия и аннексином V-FITC (BioLegend). Общая процедура и последующий анализ с помощью проточной цитометрии основан на ранее описанных протоколах (Vaskova et al., 2015; Zakharova et al., 2017).

Все эксперименты проводили в трёх биологических и двух технических повторностях. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью теста Вилкксона с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

2.13 Функциональная характеристика эндотелиальных клеток

Ангиогенный потенциал эндотелиальных клеток оценивали в тесте на образование капилляроподобных структур в матригеле. В лунку площадью 1 см^2 , содержащую 200 мкл полимеризованного матригеля (BD Bioscience), разведенного 1:1 в среде EGM-2 (Lonza), вносили суспензию из 3×10^5 клеток в той же среде. После равномерного распределения клеток по поверхности препараты инкубировали при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Через 4 часа регистрировали формирование капилляроподобных структур, количественный анализ которых выполняли с помощью программы AngioTool (Zudaire et al., 2011).

2.14 Иммунофлуоресцентное окрашивание и РНК FISH

Для общего иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали 10 минут в 4% растворе формальдегида при комнатной температуре, после чего пермеабелизовали 20 минут в 0,4% растворе Triton X-100 в PBS. Для блокирования неспецифического связывания клетки инкубировали 30 минут в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Далее клетки инкубировали с первичными антителами при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение ночи, а затем с соответствующими вторичными антителами 1 час при комнатной температуре. После каждой инкубации с антителами клетки промывали дважды PBS. ДНК

ядер окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich). Получение изображений осуществляли с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E, последующий анализ проводили с использованием программного обеспечения NIS Elements AR. Используемые антитела перечислены в таблице 4.

Метафазные хромосомы готовили методом цитоцентрифугирования, затем препараты пермеабелизовали в 0,1% Triton X-100 5-7 минут, фиксировали в 4% формальдегиде 10 минут и дважды промывали в PBS 15 минут. Метилирование гистонов детектировали методом иммунофлуоресценции в клетках, выращенных на покровных стёклах. Клетки пермеабелизовали 0,2% Triton X-100 (300 мкл, 3 мин) и фиксировали 4% формальдегидом (400 мкл, 7 мин). Далее клетки дважды промывали PBS по 10 минут. Блокирование неспецифического связывания осуществляли инкубацией в 1% BSA в PBS в течение 30 минут при 4 °С. Затем покровные стекла инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение ночи. На следующий день клетки дважды промывали PBS по 10 минут и инкубировали с вторичными антителами в течение 4 часов при 4 °С. После дополнительного двукратного промывания PBS (по 10 минут) производили окрашивание ядер DAPI. Покровные стекла осторожно удаляли и высушивали на воздухе. Затем добавляли 10 мкл раствора DAPI и устанавливали покровные стекла на предметные. Стекла аккуратно фиксировали, постукивая по краям, чтобы обеспечить плотное прилегание. Флуоресцентные сигналы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа. Используемые антитела указаны в таблице 4.

Зонды для РНК FISH готовили из ВАС-клонов RP11M13 (*XIST*) и RP11-975N19 (*HUWE*), с помощью наборов для ник-трансляции (Roche) с Biotin-dUTP и Dig-dUTP для каждого ВАС. Клетки, выращенные на желатинизированных покровных стеклах, промытые PBS, зафиксированные 4% формальдегидом в течение 10 минут, пермеабелизовали при 4 °С буфером CSK-T (100 мМ NaCl, 200 мМ сахароза, 10 мМ PIPES, 3 мМ MgCl₂ и 0,5% Тритона X-100, рН 6,8) в течение 10 мин и обезвоживали холодным (4°С) 70% этанолом. В случае иммунофлуоресцентного окрашивания, совмещённого с РНК-FISH, после пермеабелизации препаратов в CSK-T буфере проводили иммуноокрашивание и фиксировали препараты 4% формальдегидом, после этого обезвоживали холодным (4°С) 70% этанолом. Смесь для гибридизации включала 50 нг зонда, 50% формамид (Merck), 2xSSC, 2 мМ ванадил рибонуклеозид (NEB) и 20% декстран сульфат (Merck). После гибридизации предметные стекла дважды промывали в 2xSSC / 50% формамиде и дважды – в 2xSSC при 37 °С. Зонды детектировали с помощью антител

к DIG, конъюгированных с родамином (Vector Lab) или конъюгатом Avidin-FITC (Vector Lab). Для получения и обработки изображений использовали флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ti-E с программным обеспечением NIS Elements AR.

При иммунофлуоресцентном окрашивании на маркеры плюрипотентности анализировали колонии ПСКч в пяти независимых полях зрения. На препаратах с иммунофлуоресцентным окрашиванием и РНК FISH анализировали не менее 300 ядер и не менее 30 метафаз. Статистическую обработку результатов иммунофлуоресцентного окрашивания и РНК FISH проводили в программах R и Excel. Достоверность отличий оценивали с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

2.15 Детекция однонуклеотидных замен в последовательностях генов X-хромосомы линии NuES9

Потенциальные однонуклеотидные замены (single nucleotide polymorphisms, SNP) в генах X-хромосомы линии NuES9 были первоначально идентифицированы *in silico* на основе анализа доступных последовательностей генома, депонированных в общедоступных базах данных. Анализ последовательностей и выявление предполагаемых SNP проводились с использованием программного обеспечения Geneious. Аннотация геномных координат и сопоставление вариантов осуществлялись относительно референсной сборки генома человека. Для экспериментального подтверждения выявленных *in silico* SNP были спроектированы олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие участки генов X-хромосомы, содержащие соответствующие позиции однонуклеотидных замен, и обеспечивающие специфичную амплификацию целевых регионов. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием геномной ДНК линии NuES9 и коммерческого набора Biolabmix. Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле для оценки специфичности и корректности амплификации. Соответствующие полосы вырезали из геля, после чего ДНК экстрагировали и очищали с использованием коммерческого набора (Биолабмикс). Концентрацию и чистоту очищенной ДНК определяли с помощью EzDrop 1000. Очищенные ампликоны использовали для проведения реакций секвенирования по Сэнгеру, что позволило подтвердить наличие однонуклеотидных замен в целевых позициях генов X-хромосомы. Секвенирующие реакции подготавливали в объёме 10 мкл, содержащем приблизительно 20 нг очищенной ДНК, 1,1 мкл праймера, разведённого до

концентрации 1 нмоль (использовали либо прямой, либо обратный праймер), 0,5 мкл BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) и 1,76 мкл буфера. Буфер для секвенирования готовили самостоятельно (5× раствор: 250 мМ Tris-HCl, pH 9,0 при 25 °С, и 10 мМ MgCl₂). Реакции секвенирования проводили в течение 5 часов, после чего продукты секвенирования очищали и концентрировали методом солевой-изопропанольной преципитации. Полученные последовательности анализировали путём выравнивания с референсными последовательностями.

2.16 Пиросеквенирование

Для анализа аллельного соотношения транскриптов восьми генов X-хромосомы *IGSF1*, *INTS6L*, *CD99*, *OCRL*, *FHL1*, *MMGT1*, *ALG13*, *CDKL5* использовали метод пиросеквенирования. Ампликоны, включающие районы генов с однонуклеотидными межаллельными отличиями, синтезировали на матрице кДНК, полученной из клеток линии NuES9, с помощью праймеров, последовательности которых приведены в таблице 3. Пиросеквенирование ампликонов проводили на приборе «PyroMarkQ24» (QIAGEN, Германия) с использованием наборов фирмы Интерлабсервис (Россия). Полученные данные позволили количественно определить долю каждого аллеля в экспрессии исследуемых генов, что использовалось для оценки степени случайности инактивации X-хромосомы. Интегральную характеристику, определяющую отклонения от случайной инактивации, рассчитывали как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии восьми X-сцепленных генов. Статистическую обработку результатов проводили в программах R и Excel. Достоверность отличий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

Таблица 4. Антитела, использованные при иммунофлуоресцентном окрашивании и иммуноблоттинге.

Антитела	Разведение	Производитель, каталожный номер	RRID
Маркеры плюрипотентности			
Mouse IgM anti-TRA-1-60	1/200	Abcam, Cat # ab16288	RRID: AB_778563
Mouse IgG2b anti-OCT3/4	1/100	Santa Cruz Cat # sc-5279	RRID: AB_628051
Rabbit IgG anti-NANOG	1/200	ReproCELL Cat # RCAB003P	RRID: AB_2714012
Маркеры наивной плюрипотентности			
Mouse IgM anti-CD75	1/40	eBioscience Cat # 50-0759-42	RRID: AB_2574175
Rabbit IgG anti-KLF17	1/300	Sigma-Aldrich Cat # HPA024629	RRID: AB_1668927
Rabbit IgG anti-TEF3	1/600	Sigma-Aldrich Cat # HPA023881	RRID: AB_1857931
Маркеры производных трех зародышевых листков			
Mouse IgG2a anti- TUBB3	1/1000	BioLegend Cat # 801201	RRID: AB_2313773
Mouse IgG1 anti-human CD90	1/100	eBioscience Cat # 14-0909-82	RRID: AB_763535
Mouse IgG2a anti-AFP	1/200	Sigma-Aldrich Cat #A8452	RRID: AB_258392
Трофобластные маркеры ранней плацентации			
Mouse IgG2a anti-TROP2 (TACSTD2)	1/100	R&D Cat# MAB650	RRID: AB_2205665
Mouse IgG1 anti-CD249 (ENPEP)	1/100	BD Biosciences Cat# 564532	RRID: AB_2738837
Маркер зрелых эндотелиальных клеток и контроль изотипов FACS			
Mouse IgG1 anti-human CD31	1/100	CellMarque Cat # 131M-96	RRID: AB_1516761
CD31 Mouse IgG1 CD31-APC	1/20 5 µl /test	eBioscience Cat #17-0319-42	RRID: AB_10852842
IgG1(kappa) Isotype control	1/20 5 µl /test	Invitrogen Cat # 17-4714-42	N/A
Маркеры плюрипотентности (вестерн-блот)			
Mouse IgG1 anti-KLF4	1/1000	Abcam Cat # ab104846	RRID: AB_10710557
Rabbit IgG anti-TFCP2L1	1/1000	sigmaaldrich Cat # HPA029708	RRID: AB_10602479
Rabbit IgG anti-NANOG	1/500	Reprocell Cat # RCAB004P-F	RRID: AB_2714012
Rabbit IgG1 anti-SOX2	1/1000	Cell Signaling Cat # 3579S	RRID: AB_2864411
Rabbit IgG1 anti-OCT4	1/1000	Santa-Cruz Cat # SC-5279	RRID: AB_628051
Rabbit IgG1	1/2500	Sigma-Aldrich	N/A

anti-HIF1A		Cat # SAB2703132	
Rabbit IgG1 anti-HIF2A	1/2500	Sigmaaldrich Cat # SAB2701992	N/A
Белки, кодируемые генами домашнего хозяйства (вестерн-блот)			
Rabbit IgG anti-SMC1	1/5000	Bethyl Cat # A300-055A	RRID: AB_2192467
Rabbit IgG anti- β -Actin	1/5000	Abcam Cat # ab228001	N/A
Модификации хроматина			
Rabbit IgG anti-H3K4me2	1/200	Millipore Cat # 05-851	RRID: AB_2614976
Rabbit IgG3 (kappa) anti-H3K27me3	1/1000	Abcam Cat # ab6002	RRID: AB_305237
Вторичные антитела			
Goat anti-Mouse IgM Heavy Chain Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1/400	Thermo Fisher Scientific Cat #A21043	RRID: AB_2535712
Goat anti-Mouse IgG2a Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1/400	Thermo Fisher Scientific Cat # A21134	RRID: AB_2535773
Goat anti-Mouse IgG2b Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat # A21144	RRID: AB_2535780
Goat anti-Mouse IgG1 Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A21124	RRID: AB_2535766
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat #A11008	RRID: AB_143165
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific Cat # A11011	RRID: AB_143157
Donkey IgG (H+L) anti mouse IgG	1/5000	Jackson ImmunoResearch Cat # 715-035-150	RRID: AB_2340770
Donkey IgG (H+L) anti-rabbit IgG	1/5000	Jackson ImmunoResearch Cat # 711-035-152	RRID: AB_10015282

Глава 3. Результаты

3.1 Получение наивных плюрипотентных стволовых клеток

Для исследования возможностей наивной плюрипотентности регулировать эпигенетический статус X-хромосом на первом этапе было необходимо получить и охарактеризовать культуры наивных ПСКч. На сегодняшний день предложено несколько составов сред, позволяющих переводить праймированные ПСКч в наивное состояние (Bayerl et al. 2021; Buckberry et al. 2023; Chan et al. 2013; Duggal et al. 2015; Gafni et al. 2013; Guo et al. 2017; Khan et al. 2021; Lee et al. 2017; Szczerbinska et al. 2019; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014; Ware et al. 2014; Zimmerlin et al. 2016). Среди них среда HENSM продемонстрировала способность получать наивные ПСКч, сопоставимые с ранним преимплантационным эпибластом (Bayerl et al. 2021). Среда HENSM разрабатывалась для долгосрочного поддержания стабильных линий наивных ПСКч. При разработке среды было установлено, что активность сигнального пути WNT является основной причиной гетерогенности клеток, потери импринтинга и хромосомных перестроек в культурах наивных ПСКч. Таким образом, эта среда не содержит активаторов WNT, таких как ингибиторы киназы GSK3, и дополнительно содержит ингибитор сигнального пути WNT. В составе среды также присутствуют фактор роста LIF и ингибитор киназы MEK – два компонента, которые являются общими для всех наивных условий. LIF активирует сигнальный путь JAK/STAT3, который необходим для наивной плюрипотентности. Ингибитор MEK вместе с ингибиторами киназ PKC и SRC в среде HENSM подавляет каскад MEK/ERK, который отвечает за праймированную плюрипотентность и дифференцировку. Опционально среда HENSM может включать ростовой фактор ACTIVIN A. Заявлено, что среда HENSM поддерживает геномный импринтинг, хромосомную и геномную стабильность в течение длительного времени. Однако следует отметить, что до сих пор отсутствуют сообщения о длительно культивируемых наивных ПСКч, полученных в среде HENSM. В данной работе мы использовали базовую среду HENSM (без фактора ACTIVIN A) для перевода эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток человека 46,XX (ЭСКч) (HuES9, ESM04) и индуцированных ПСКч 46,XX (K7-4Lf) в состояние наивной плюрипотентности (рис 3).

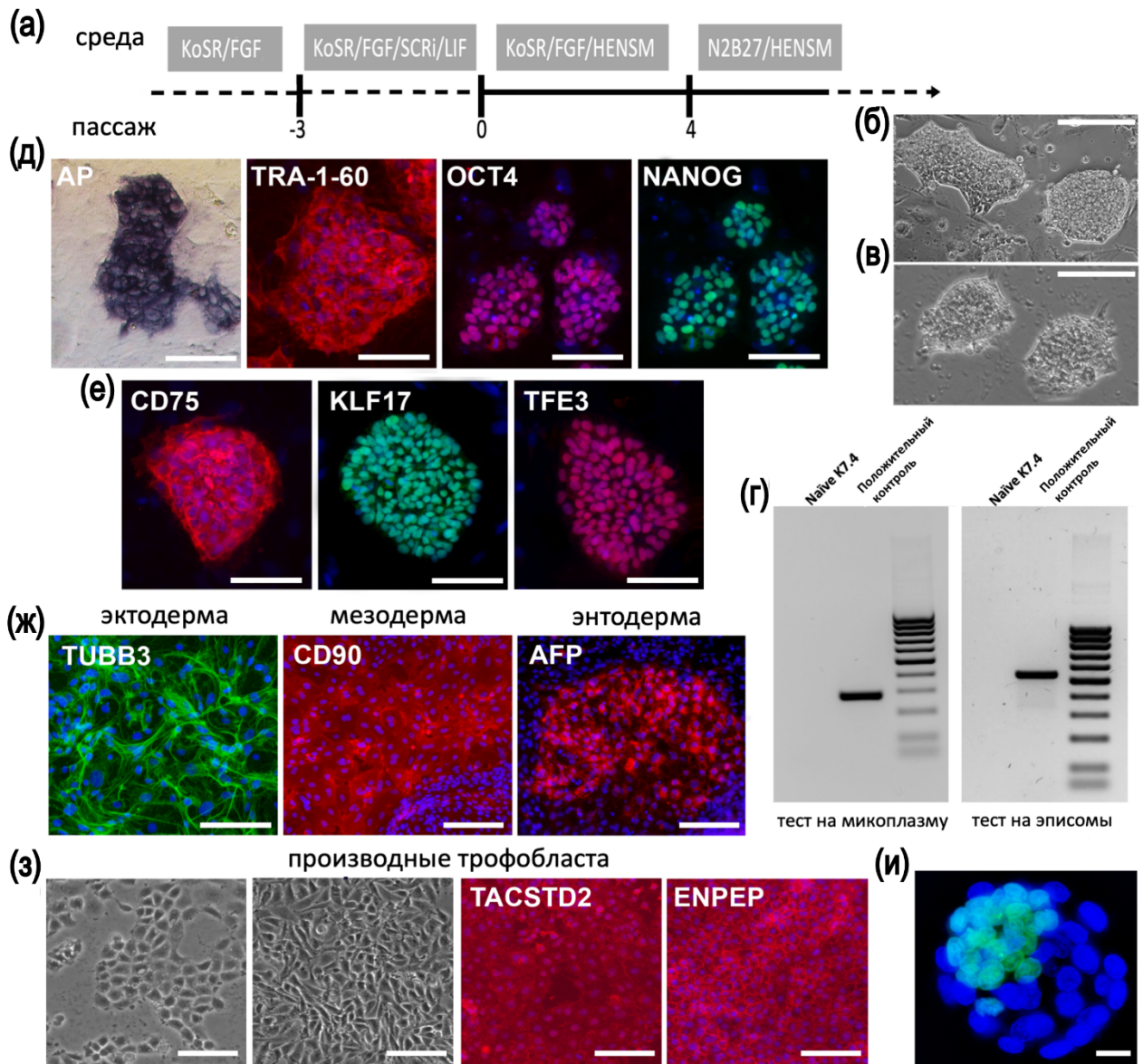


Рисунок 3. Свойства наивных плюрипотентных стволовых клеток, полученных в среде HENSM. Репрезентативные изображения приведены для линии ИПСК К7-4Lf.

(а) Схематическое представление этапов перехода из праймированного в наивное состояние. (б) Морфология колоний наивных ИПСКч на слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши. Линейка — 100 мкм. (в) Морфология колоний наивных ПСКч на поверхности, обработанной матригелем. Линейка — 100 мкм. (г) Отсутствие эписомных векторов и контаминации микоплазмой в линии наивных К7-4Lf. (д) Общие маркеры плюрипотентности: щелочная фосфатаза (AP), TRA 1-60 (красный), OCT4 (красный), NANOG (зелёный), выявленные в линии наивных ПСКч. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 100 мкм. (е) Специфические маркеры наивной плюрипотентности: поверхностный антиген CD75 (красный), транскрипционные факторы KLF17 (зелёный) и TFE3 (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 100 мкм. (ж) Способность клеток наивных ПСКч дифференцироваться в производные трёх зародышевых листков. (з) Морфология ранних клеток трофэктодермы, полученных из наивных ИПСКч, и их иммуноокрашивание антителами к ранним маркерам плацентации TACSTD2 (красный) и ENPEP (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 100 мкм. (и) Репрезентативное изображение бластоида, полученного в результате самоагрегации наивных ПСКч в условиях низкой адгезии. Плюрипотентные клетки окрашены зелёным с использованием антител к OCT4. Ядра окрашены DAPI. Линейка — 10 мкм.

Прямой перенос клеток из стандартной среды (DMEM/F12 с KoSR и FGF2) непосредственно в среду HENSM приводил к значительной гибели клеток, что препятствовало успешному процессу перезагрузки клеток в наивное состояние. Для преодоления этого барьера был разработан и применён пошаговый подход (рис. 3 а). На первом этапе клетки в течение трёх пассажей культивировали в среде для праймированных ПСКч, дополнительно обогащённой ингибитором SRC (CGP77675) и LIF. После этой фазы предварительной адаптации клетки переводили в среду для индукции наивного состояния на основе DMEM/F12 (без N2B27), которая содержала KoSR, FGF2, полный набор малых молекул HENSM и ростовой фактор LIF. К четвёртому пассажу в среде, индуцирующей наивность, колонии начинали приобретать характерную для наивных ПСКч компактную куполообразную морфологию (рис. 3 б). На этом этапе культуры были переведены в полную среду HENSM на основе N2B27 с добавлением Geltrex. В данных условиях клетки демонстрировали стабильный рост и успешно пассировались с помощью ферментативного гидролиза колоний с использованием TrypLE в присутствии ингибитора ROCK.

После успешного получения наивных культур в среде HENSM на основе N2B27 мы исключили FGF2. Данный фактор роста поддерживает выживание клеток на начальных этапах индукции наивной плюрипотентности; однако его длительное присутствие может препятствовать полному переходу клеток в наивное состояние. После отмены FGF2 на шестом пассаже колонии в культурах сохранили характерные признаки наивной плюрипотентности, что указывает на достижение клетками FGF2-независимого состояния. Примечательно, что эти клетки также формировали компактные сферические колонии в бесфидерных условиях на планшетах с матригелем (рис. 3 в), хотя на ранних этапах перепрограммирования они не могли расти без фидера и/или FGF2. Это свидетельствует о временной зависимости от ростовых факторов в процессе трансформации праймированных ПСКч в наивные.

Наивные клетки HuES9, ESM04 и K7-4Lf демонстрировали высокую стабильность при пересеве и успешно переносили криоконсервацию. Культуры демонстрировали отсутствие микоплазмы и эписомных векторов (рис. 3 г). Характеристика полученных клеток подтвердила их плюрипотентный статус. Гистохимический анализ выявил активность щелочной фосфатазы (рис. 3 д), а иммуноцитохимическое окрашивание подтвердило экспрессию транскрипционных факторов OCT4 и NANOG, а также поверхностного маркера TRA-1-60 (рис. 3 д). Кроме того, клетки экспрессировали

специфические наивные маркеры CD75, KLF17 и TFE3 (рис. 3 е), причём транслокация TFE3 в ядро является ключевым событием и характерным признаком наивной плюрипотентности (Gafni et al. 2013; Mathieu et al. 2019). Функциональный анализ показал, что эти клетки могут дифференцироваться в производные трех зародышевых листков (рис. 3 ж), а также в трофобластные клетки, экспрессирующие маркеры ранней плацентации (рис. 3 з). Более того, культуры наивных HuES9, ESM04 и K7-4Lf в условиях низкой адгезии демонстрировали спонтанную самоорганизацию в бластоиды (рис. 3 и), что подтверждает их высокий потенциал развития, характерный для наивного плюрипотентного состояния.

3.2 Анализ экспрессии генов в культурах HENSM методом ПЦР в режиме реального времени

Проведён полуколичественный ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии генов, ассоциированных с наивной плюрипотентностью, в полученных линиях наивных ПСК. Во всех культурах, поддерживаемых в среде HENSM, отмечалась выраженная активация транскрипционных факторов, характерных для наивного состояния (рис. 4). Примечательно, что в праймированных клетках линии HuES9 уровень мРНК *NANOG* был сравним с таковым в наивных линиях ПСК, поэтому между праймированными и наивными клетками HuES9 не зарегистрировано статистически достоверного увеличения экспрессии *NANOG*.

Исследования раннего эпибласта *in vivo* продемонстрировали выраженную активность транспозонов, в частности, *HERVH* и *LTR7Y* (Szczerbinska et al. 2019). Накопленные данные указывают на то, что эти эндогенные ретровирусные элементы выполняют функциональную роль в регуляции раннего развития человека. В соответствии с этим, в полученных наивных культурах регистрировалась статистически значимое повышение экспрессии *LTR7Y* (рис. 4).

Ген *DAZL*, являясь маркером наивных ПСК, также координирует начальные этапы дифференцировки в первичные половые клетки и участвует в повышении экспрессии белка TET1, регулирующего уровень 5-гидроксиметилцитозина (Welling et al. 2015). В полученных наивных культурах по сравнению с исходными праймированными наблюдалось значимое повышение уровня мРНК *DAZL* (рис. 4). Эти данные могут указывать на то, что клетки наряду с наивной плюрипотентностью приобрели

молекулярный профиль, позволяющий им дифференцироваться в герминальном направлении.

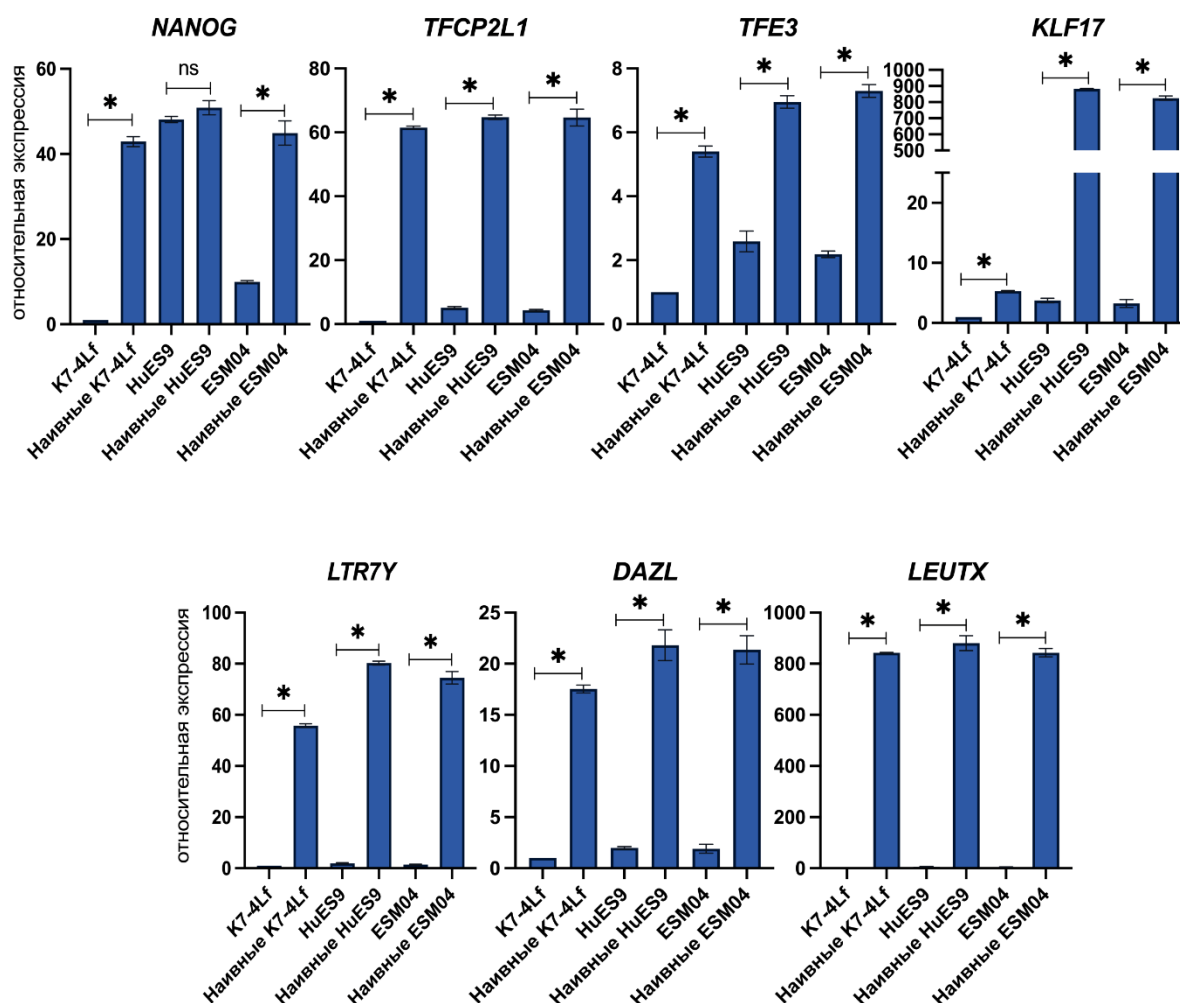


Рисунок 4. Анализ относительной экспрессии мРНК генов *NANOG*, *TFCE2L1*, *KLF17*, *TFE3*, *LTR7Y*, *DAZL* и *LEUTX* в праймированных и наивных линиях K7-4Lf, HuES9 и ESM04. В качестве референсных генов для нормировки экспрессии использовали *ACTB*, *B2M* и *TFRC*. Сравнение наивных и праймированных ПСКЧ проводили, используя непарный Т-критерий Стьюдента. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) отмечены звёздочкой.

Обнаружено, что в наивных клетках также активируются гены, ассоциированные с тотипотентным состоянием. В частности, наблюдалось повышение экспрессии гена *LEUTX*, кодирующего белок хроматина, участвующий в зиготической геномной активации на стадии восьмиклеточного эмбриона (Mazid et al. 2022).

3.3 Анализ хромосомной стабильности наивных ПСКЧ

Праймированная линия K7-4Lf широко используется для моделирования заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и исследований стволовых клеток благодаря своему хорошо изученному генетическому фону и устойчивой

плюрипотентности (Malakhova et al. 2020). Перевод К7-4Lf в наивное состояние дает новые возможности её применения в исследованиях, используя потенциал развития и дифференцировки наивной плюрипотентности. Представляет интерес иметь стабильную длительно культивируемую зарегистрированную линию наивных ИПСКч К7-4Lf, но для этого клетки линии в наивном состоянии быть кариотипически стабильны. Для исследования хромосомной стабильности наивных ИПСКч К7-4Lf, полученных с использованием среды HENSM, был выполнен анализ метафазных хромосом на протяжении ряда пассажей.

Цитогенетический анализ наивных клеток линии К7-4Lf, выполненный на 12-м пассаже, показал, что клетки в культуре имеют нормальный кариотип 46,XX (рис. 5). Это подтверждает, что кратковременное и среднесрочное культивирование в среде HENSM не приводит к выраженным хромосомным aberrациям, что согласуется с ранее опубликованными данными (Bayerl et al. 2021). Однако к 15-му пассажу были обнаружены признаки анеуплоидии и полиплоидии, что указывает на развитие хромосомной нестабильности при длительном культивировании. Последующий кариотипический анализ на 18-м пассаже выявил делецию короткого плеча хромосомы 15 более чем в 70% клеток (рис. 5).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что наивные ПСКч поддерживаемые в среде HENSM, несмотря на оптимизацию состава среды для поддержания кариотипической стабильности, при длительном культивировании предрасположены к хромосомным нарушениям. Это указывает на сохраняющуюся необходимость постоянного геномного мониторинга при долгосрочном поддержании культур наивных плюрипотентных клеток.

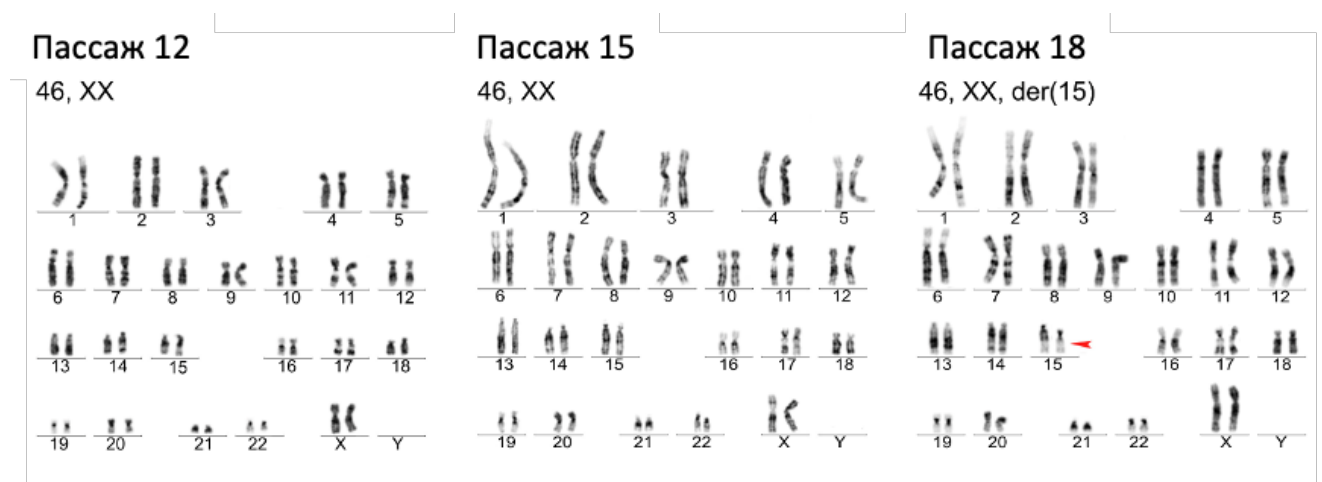


Рисунок 5. Кариотипирование наивных ИПСКч линии К7-4Lf на 12-м, 15-м и 18-м пассажах.

3.4 Характеристика эпигенетического статуса X-хромосом в праймированных, наивных и повторно праймированных ПСК

В праймированных линиях ПСКч с двумя X-хромосомами, как правило, одна X-хромосома активна (X_a), а другая — неактивна (X_i) благодаря процессу инактивации, который завершается к этой стадии развития (Disteche 2016; Patel et al. 2017; Sahakyan et al. 2017; Vallot et al. 2015). Однако в большинстве праймированных линий ПСКч инактивированное состояние X_i часто нарушается и подвергается эрозии (X_e). Эрозия ХСІ характеризуется потерей меток неактивного хроматина и частичной реактивацией генов, что препятствует повторной инактивации X_e во время дифференцировки. Некоторые среды для наивных ПСКч, включая HENSM, позволяют плюрипотентным клеткам восстановить инактивированное состояние на X_e , когда клетки возвращаются в праймированное состояние и дифференцируются в клетки зародышевой и соматической линий (An et al. 2020; Bayerl et al. 2021; Raposo et al. 2025; Sahakyan et al. 2017; Vallot et al. 2017).

В данном исследовании мы оценивали эпигенетическое состояние X-хромосомы в исходных праймированных линиях K7-4Lf, HuES9 и ESM04, уделяя внимание изменениям, которые происходят при переходе клеток в наивное состояние и при возврате из наивного в праймированное состояние (рис. 6).

Используя методы РНК-FISH и иммунофлуоресценции, показано, что в исходных праймированных линиях ПСКч K7-4Lf и HuES9 практически все ядра не содержат областей аккумуляции РНК *XIST* и гистоновых модификаций H3K27me3, характерных для хромосомной территории X_i и являющихся основными участниками ХСІ (рис. 6). Таким образом, в исходных линиях K7-4Lf и HuES9 наблюдается эрозия неактивной X-хромосомы (X_e). Линия ESM04, напротив, демонстрирует стабильную инактивацию X-хромосомы. В ней практически во всех клетках детектируются сигналы РНК *XIST*, маркирующие X_i . Все исследуемые линии праймированных ПСКч обнаруживают моноаллельную экспрессию X-сцепленного гена *HUWE1* (один сигнал на ядро), что указывает на его транскрипцию на X_a и сохранение инактивированного состояния на X_i и X_e . Известно, что *HUWE1* практически не подвергается реактивации на X_e при эрозии, однако этот ген реактивируется в наивных ПСКч (Patel et al. 2017; Raposo et al. 2025; Vallot et al. 2015).

После перехода в наивное состояние практически все клетки в линиях K7-4Lf, HuES9 и ESM04, культивируемые в среде HENSM, демонстрируют биаллельную

экспрессию X-сцепленного гена *HUWE1*. Часть клеток (от 21 до 37%) обнаруживают биаллельную экспрессию РНК *XIST* (рис. 6) и полное отсутствие аккумуляции на X-хромосомах метки неактивного хроматина H3K27me3. Такое эпигенетическое состояние типично для наивных ПСКч и отражает промежуточные стадии реактивации X-хромосомы, характерные для раннего наивного плюрипотентного состояния у человека (Bayerl et al. 2021; Khan et al. 2021; Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2016; Vallot et al. 2015).

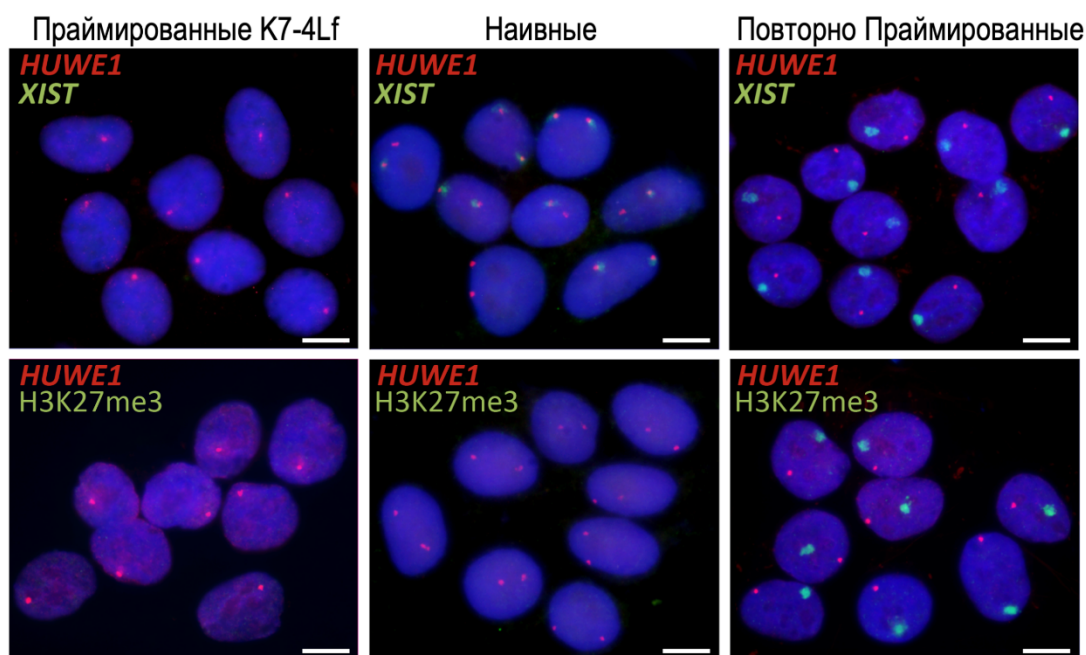


Рисунок 6. Эпигенетическое состояние X-хромосом в исходных праймированных, наивных и повторно праймированных ПСКч (на примере линии K7-4Lf), выявленное методом РНК-FISH с зондами к РНК *XIST* (зелёный) и гену *HUWE1* (красный), а также иммунофлуоресцентным окрашиванием к гистоновой метке H3K27me3 (зелёный). Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 10 мкм.

В повторно праймированных клетках K7-4Lf, NuES9 и ESM04, полученных из наивных ИПСКч, мы наблюдали картину завершённой XCI. Она проявляется в виде одного отчетливого облака РНК *XIST* или гистоновой модификации H3K27me3, соответствующего Xi, а также одного сигнала X-сцепленного гена *HUWE1*, расположенного отдельно и соответствующего Xa (рис. 6).

Таким образом, получение клеток в наивном состоянии из праймированных линий ПСКч в среде HENSM с последующим возвратом клеток в праймированное состояние или их дифференцировка позволяет устранить эрозию и получать культуры с нормальной XCI.

3.5 ПСК с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами способны воспроизводить случайную инактивацию

Предшествующие исследования показали, что инактивация X-хромосомы при повторном праймировании происходит неслучайным образом, что указывает на неполное эпигенетическое репрограммирование в предшествующем наивном состоянии. Для более глубокого понимания этого явления мы провели анализ распределения на хромосомах гистоновой метки H3K4me₂, являющейся маркером активного хроматина, в линиях ПСКч — K7-4Lf, HuES9 и ESM04.

Одна из X-хромосом во всех исследуемых праймированных линиях демонстрировала паттерн распределения H3K4me₂, характерный для активной хромосомы (X_a) (рис. 7). Другая X-хромосома в праймированных клетках K7-4Lf и ESM04 полностью лишена метки H3K4me₂, что свидетельствует о неактивном статусе хроматина X-хромосомы. Напомним, что только линия ESM04 имеет все маркеры, характерные X_i (РНК *XIST*, H3K27me₃), тогда как в линии K7-4Lf эти маркеры утрачены, что в совокупности свидетельствует о начальных стадиях эрозии XCI. Вторая X-хромосома в праймированных клетках HuES9 имела картину частичной реактивации неактивной X-хромосомы, характерную для эрозии XCI, которая проявлялась в виде частичного обогащения X-хромосомы модификацией активного хроматина H3K4me₂ (рис. 7).

При переводе клеток в наивное состояние наблюдались следующие изменения в эпигенетическом профиле X-хромосом. Клетки HuES9 сохранили паттерн распределения H3K4me₂ (рис. 7), аналогичный исходной праймированной культуре, что свидетельствует о стабильности эпигенетического паттерна, характерного для эрозии, и отсутствия динамики в восстановлении активных модификаций хроматина. В то же время, в наивных клетках K7-4Lf и ESM04, где исходно X_e и X_i были полностью лишены метки H3K4me₂, произошла частичная реактивация обширных доменов хроматина, выраженная в появлении на X-хромосоме отдельных районов, обогащенных меткой H3K4me₂. Таким образом, эпигенетические изменения неактивной X-хромосомы при переходе культур из праймированного в наивное состояние происходят избирательно в отдельных районах, по сути тех же, что демонстрируют реактивацию при эрозии.

Полученные результаты показывают, что в наивных культурах ни одна из клеточных линий не достигала состояния двух эпигенетически эквивалентных X-хромосом. Это позволяет предположить, что переход от праймированного к наивному состоянию приводит к реактивации генов на X_i, однако это неспособно полностью

восстановить паттерн модификаций активного хроматина, характерный для Xa. Неполное эпигенетическое репрограммирование, вероятно, может являться ключевым механизмом, лежащим в основе неслучайной инактивации X-хромосомы при последующем праймировании и дифференцировке.

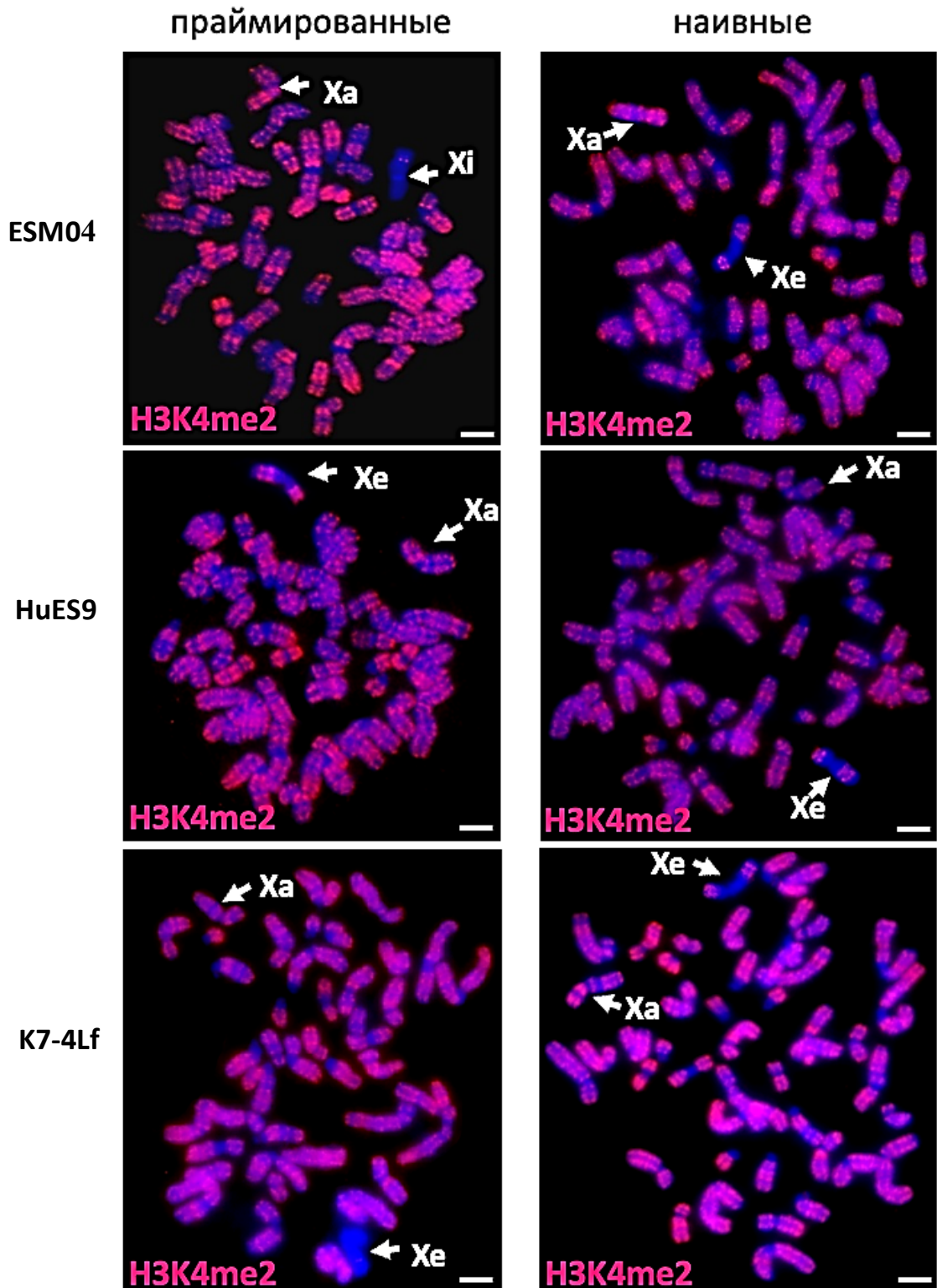


Рисунок 7. Рисунок 7. Метафазные хромосомы ПСКч линий ESM04, HuES9, K7-4Lf, окрашенные иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к H3K4me2. Линии имеют нормальное число хромосом. (46,XX). Линейка — 10 мкм.

3.6 ПСК с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами способны воспроизводить случайную инактивацию

В результате работ по клонированию линии HuES9, проводимых в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН (магистерская работа Идемешевой Е.В.), был выделен клеточный клон, поименованный HuES#21, который в праймированном состоянии демонстрировал наличие двух эпигенетически эквивалентных X-хромосом по распределению модификации активного хроматина H4K4me2 (рис. 8). Обе хромосомы не накапливали H3K27me3 и обладали признаками полностью активных X-хромосом. Используя этот клон, мы решили выяснить, действительно ли эпигенетическая память, проявляющаяся в виде неэквивалентности X-хромосом по распределению маркеров активного хроматина, определяет неслучайный паттерн инактивации X-хромосомы. Для этого из культуры HuES9 был также получен клон (HuES#35) с эпигенетически неэквивалентными X-хромосомами (ХаХе), который содержал одну активную X-хромосому (Ха) и одну X-хромосому с эрозией (Хе) (рис. 8). Оба клона были переведены в наивное состояние с использованием среды HENSM, их колонии приобрели сферическую морфологию и продемонстрировали биаллельную экспрессию гена *HUWE1*, а также отсутствие аккумуляции H3K27me3, что соответствует наличию в клетках двух активных X-хромосом (ХаХа). Последующее повторное праймирование обеих культур клеток привело к инактивации X-хромосомы, которая проявлялась в формировании одного ядерного сигнала H3K27me3 (Xi) и локализованного отдельно (на Ха) сигнала транскрипта гена *HUWE1*.

Чтобы выяснить, является ли восстановленная при повторном праймировании ХСИ случайной или неслучайной, мы проанализировали аллельную экспрессию X-сцепленных генов по однонуклеотидным заменам (SNP). Кандидатные SNP были отобраны на основе опубликованных данных секвенирования HuES9 и подтверждены в исследованных линиях. Случайная ХСИ характеризуется мозаичной экспрессией аллелей, когда примерно 50% клеток экспрессируют один аллель, а 50% — альтернативный. Неслучайная ХСИ проявляется экспрессией аллелей только одной из X-хромосом во всех клетках. Процентное содержание аллелей определяли по соотношению однонуклеотидных отличий, которое устанавливали методом пиросеквенирования ампликонов генов, полученных с кДНК. Клетки клона HuES#35 с неэквивалентными X-хромосомами (ХаХе) после перевода в наивное состояние и повторного праймирования показали типичную неслучайную ХСИ в пользу аллелей одной из X-хромосом (рис. 8). Однако клон с

изначально эквивалентными X-хромосомами (ХаХа) после перевода в наивное состояние и повторного праймирования продемонстрировал мозаичный паттерн аллельной экспрессии среди исследованных X-сцепленных генов, соответствующий случайной ХСИ. Таким образом, наивные плюрипотентные клетки с двумя эпигенетически эквивалентными X-хромосомами (ХаХа) имеют способность к случайной ХСИ при повторном праймировании. Вероятно, случайный или неслучайный паттерн ХСИ при дифференцировке наивных ПСКч зависит от исходного эпигенетического состояния X-хромосом. Можно заключить, что перезагрузка ПСКч в наивное состояние не способна полностью перестроить эпигенетическую память предыдущего состояния X-хромосомы (Хi или Хe).

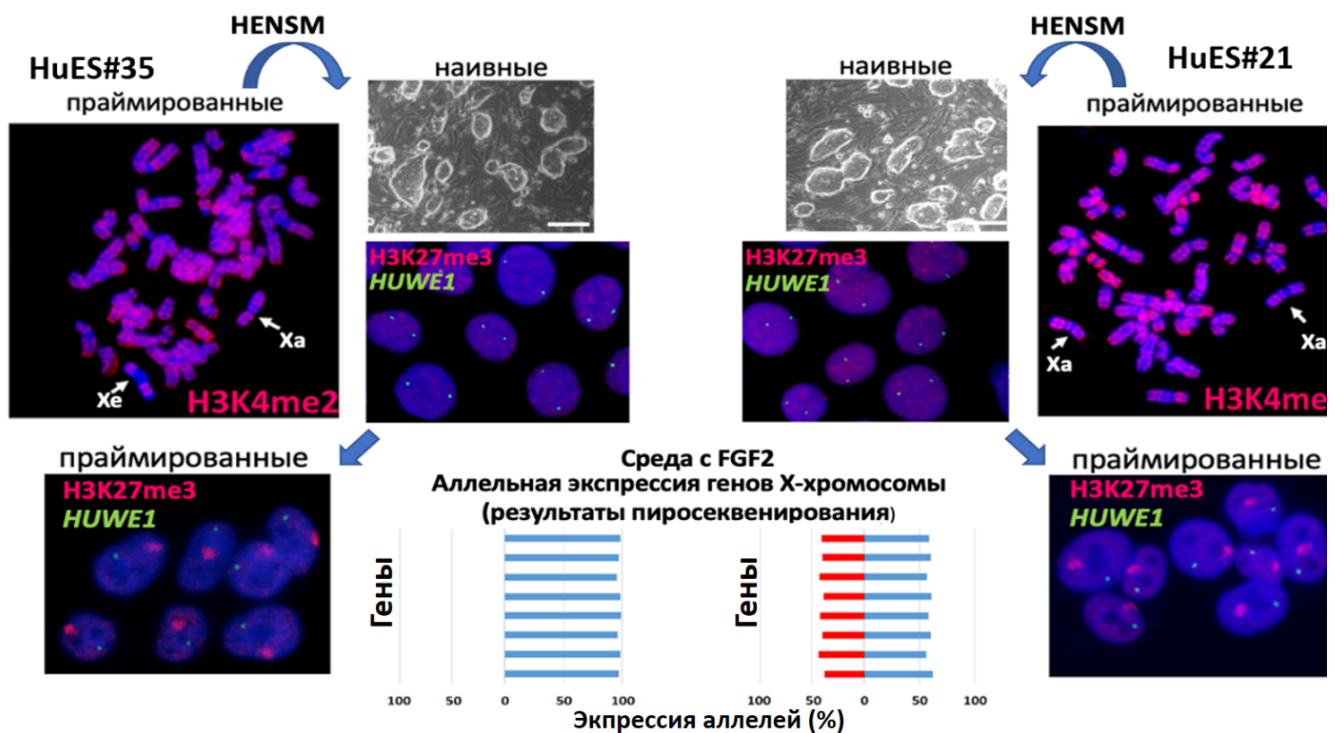


Рисунок 8. Клон ЭСК с эпигенетически эквивалентными активными X-хромосомами после перевода в наивное состояние в среде HENSM и повторного праймирования демонстрирует случайную инактивацию X-хромосомы. HuES#21 – клон ЭСКч с двумя активными X-хромосомами (Ха), эквивалентными по распределению модификации H3K4me2, маркирующей активный хроматин. HuES#35 – клон ЭСКч с двумя X-хромосомами, неэквивалентными по распределению модификации H3K4me2 (ХаХе). На рисунке представлена морфология колоний клонов после их перевода в наивное состояние в среде HENSM. На изображениях ядер показано наличие или отсутствие метки H3K27me3 (красный сигнал), маркирующей неактивную X-хромосому, а также моно- или биаллельная транскрипция гена X-хромосомы *HUWE1* (зеленый сигнал), детектируемого с помощью РНК FISH в клонах в наивном состоянии и после повторного праймирования. На графике аллельной экспрессии отложены частоты аллелей (синие и красные столбцы), которые детектировались по SNP с помощью пиросеквенирования.

3.7 Ингибитор киназы SRC и статус X-хромосом в ПСКч

3.7.1 Влияние ингибирования сигнального пути SRC-киназы на статус X-хромосом и способность к инактивации наивных ПСКч

Анализируя данные литературы, мы отметили, что наивные ПСКч, способные запускать инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании и дифференцировке, получают и поддерживают в средах, которые содержат ингибитор киназы SRC (SRCi). Для экспериментальной проверки этого наблюдения мы получили наивные ПСКч линии HuES9 в средах HENSM, содержащих и не содержащих SRCi. Наивные плюрипотентные клетки, полученные в обычной среде HENSM с SRCi, были способны эффективно реактивировать ген X-хромосомы *HUWE1* и запускать инактивацию X-хромосомы при их переводе в праймированное состояние (рис. 9). Наивные клетки HuES9, полученные без SRCi, хотя и демонстрировали реактивацию *HUWE1*, полностью утратили способность запускать инактивацию X-хромосомы.

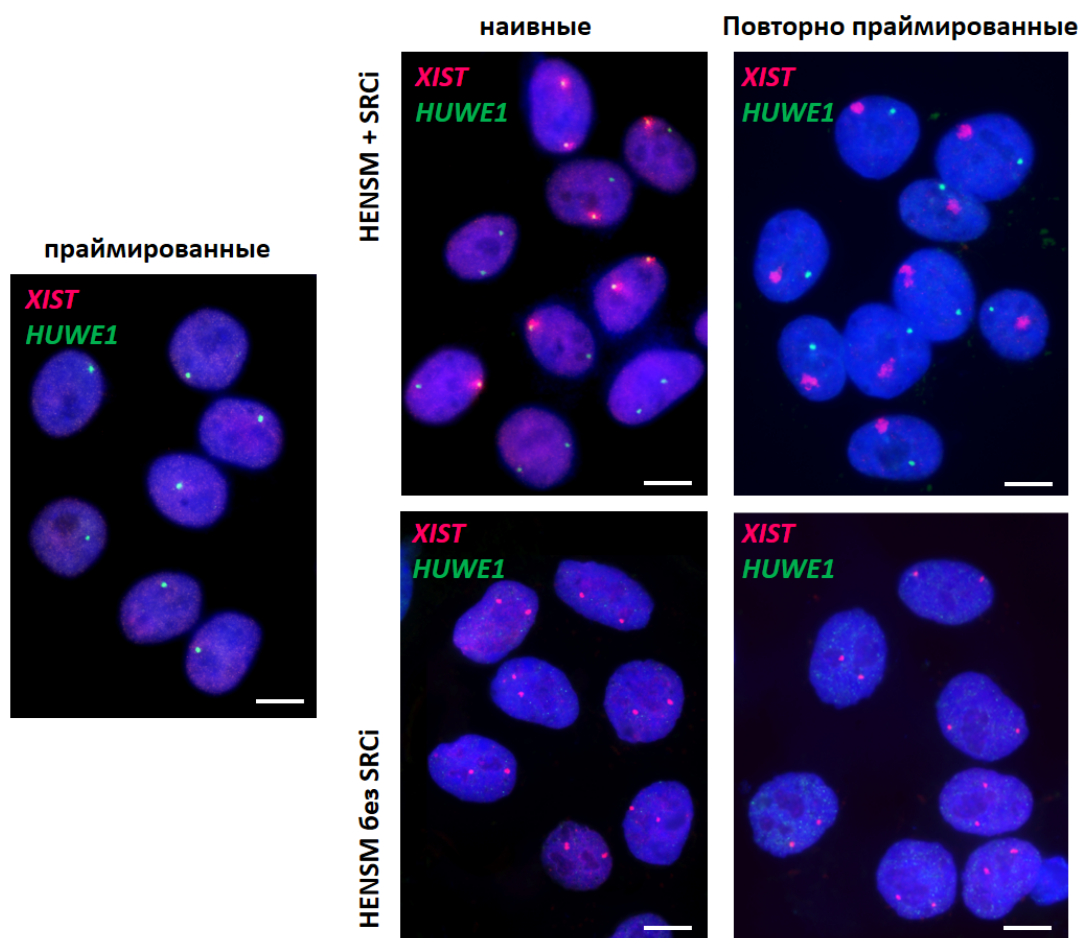


Рисунок 9. Ингибитор киназы SRC отвечает за способность наивных ПСКч воспроизводить инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании. Экспрессия транскриптов *XIST* (красный) и *HUWE1* (зелёный) в исходных праймированных клетках линии HuES9, в наивных HuES9, полученных в среде HENSM в присутствии SRCi и без него, а также после повторного праймирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 10 мкм.

Среда для получения наивных ПСКч t2iLGö близка по составу к HENSM, но в ней отсутствуют ингибиторы SRC и WNT. В наивных ПСК, полученных в этой среде, согласно литературным данным, слабо восстанавливается биаллельная экспрессия генов, включая *XIST* (Vallot et al. 2017). Кроме того, эти культуры не способны запускать инактивацию X-хромосомы при праймировании и дифференцировке (Sahakyan et al. 2017; Vallot et al. 2015). Мы добавили в состав среды t2iLGö ингибитор SRC и получили в ней наивные плюрипотентные клетки линии HuES9. В полученной наивной культуре в 95% клеток регистрировалось восстановление биаллельной экспрессии гена *HUWE1*, а при переводе клеток в праймированное состояние эффективно происходила инактивация X-хромосомы (рис. 10). Таким образом, ингибитор киназы SRC является ключевым компонентом культуральной среды, который отвечает за способность наивных ПСКч запускать инактивацию X-хромосомы при праймировании наивных культур.

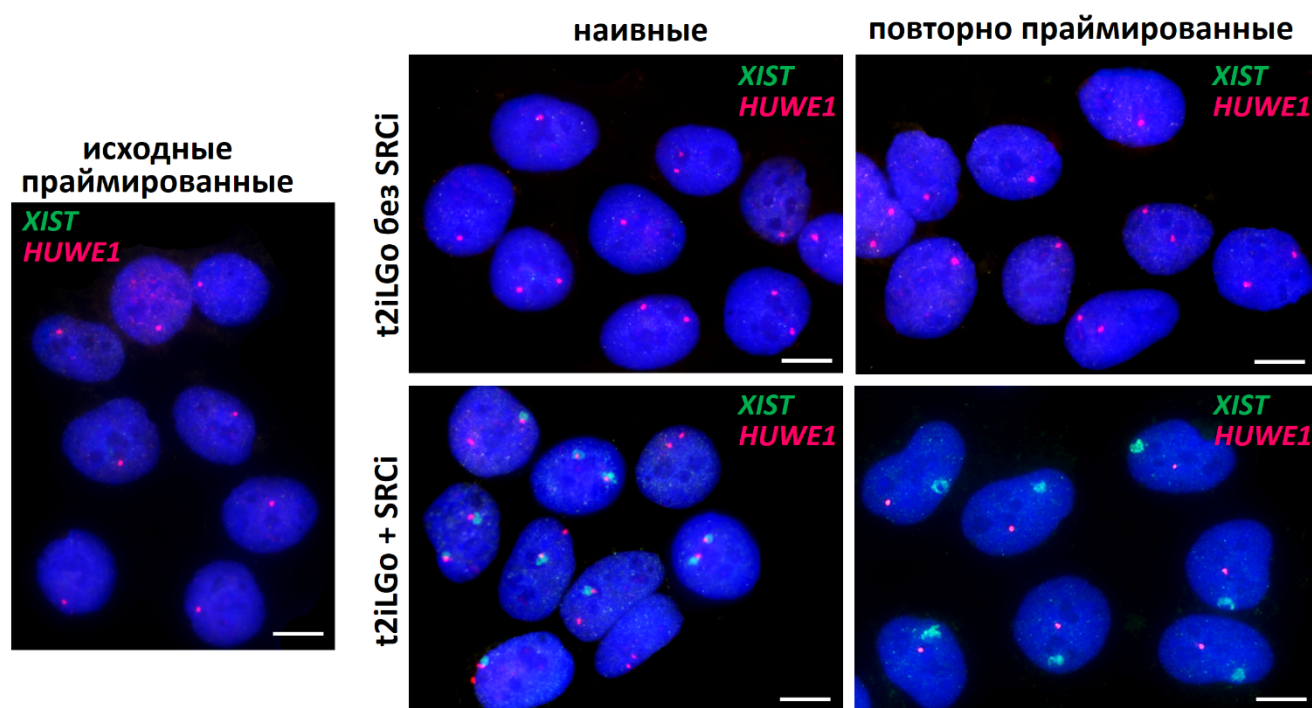


Рисунок 10. Присутствие ингибитора SRC в среде t2iLGo позволяет наивным ПСКч воспроизводить инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании. Экспрессия транскриптов *XIST* (зелёный) и *HUWE1* (красный) в исходных праймированных клетках линии HuES9, в наивных плюрипотентных клетках HuES9, полученных в среде t2iLGo в присутствии SRCi и без него, а также после их повторного праймирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка — 10 мкм.

3.7.2 Влияние ингибирования сигнального пути SRC-киназы на статус X-хромосом в праймированных ПСКч

Поскольку присутствие ингибитора киназы SRC в среде для культивирования наивных ПСКч является основным фактором, позволяющим запускать инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании и дифференцировке, мы предположили, что этот ингибитор также может оказаться полезным для коррекции состояния эрозии неактивной X-хромосомы в клетках с праймированной плюрипотентностью.

С целью изучения возможностей использования ингибитора SRC для коррекции эрозии XCI и восстановления нормального неактивного состояния X-хромосомы было проведено культивирование праймированных линий с кариотипом 46,XX K6-4Lf и K7-4Lf в среде, типичной для праймированных клеток с заменителем сыворотки KoSR и основным фактором роста фибробластов FGF2, в которую дополнительно был добавлен ингибитор SRC CGP77675 в концентрации 1,2 мкМ. Анализ модификации хроматина H3K27me3 методом иммунофлуоресцентного окрашивания подтвердил, что в исходных культурах наблюдается массовая утрата сигнала H3K27me3, ассоциированного с Xi, характерная для состояния эрозии (рис. 11 а, б). Однако после обработки ингибитором SRC в обеих линиях K6-4Lf и K7-4Lf доля клеток, содержащих ядерные сигналы H3K27me3, статистически значимо возросла ($p < 0,05$), при этом часть клеток демонстрировала наличие одновременно двух сигналов H3K27me3, характерных для состояния демпфирования транскрипции X-хромосом в преимплантационных эмбрионах (рис. 11 а, б). В то же время более чем в половине клеток видимых изменений в эпигенетическом состоянии X-хромосом не регистрировалось.

В средах для культивирования наивных ПСКч наряду с ингибитором SRC в качестве незаменимых сопутствующих компонентов присутствуют ростовой фактор LIF и ингибитор киназы MEK. Они также могут повлиять на эпигенетическое состояние X-хромосом с эрозией в праймированных клетках. Поэтому представлялось необходимым выяснить их вклад в возможности коррекции состояния эрозии XCI в сочетании с ингибитором SRC.

Культивирование праймированных ИПСКч линий K6-4Lf и K7-4Lf в присутствии FGF2 совместно с ингибиторами SRC и MEK (PD0325901) в течение 9 пассажей не приводило к статистически значимому изменению доли клеток с сигналом H3K27me3 (11 б). Отмечалось изменение морфологии сигналов H3K27me3, они уменьшались и становились более диффузными. Ядра с двумя дискретными сигналами H3K27me3

отсутствовали. Эти данные указывают, что ингибирование киназы MEK в присутствии ингибитора SRC не способствует коррекции состояния эрозии ХС1 и нарушает распределение H3K27me3, типичное для Xi, содействуя эрозии.

Кроме того, была предложена среда iLF, содержащая xis2 (10 нг/мл), LIF (10 нг/мл) и ингибитор SRC (1.2 мкМ). Мы наблюдали за динамикой доли клеток с сигналами H3K27me3 на 4, 6 и 9 пассажах, и обнаружили, что среда iLF более эффективно противодействует эрозии, чем сочетание FGF2/SRCi, возвращая к девятому пассажу обогащение H3K27me3 в ядра от 75 до 93% клеток (рис. 11 а, б). Следует отметить, что на начальных пассажах доля клеток, имеющих в ядре два сигнала H3K27me3, была сравнимой с долей клеток, имеющих только один сигнал H3K27me3. Однако к 9 пассажу в большинстве встречались клетки с одним сигналом H3K27me3, что свидетельствовало о восстановлении нормального состояния неактивной X-хромосомы после эрозии. Таким образом, для праймированных культур ИПСК среда iLF была более эффективной для возврата состояния эрозии X-хромосомы до нормальной инактивации. Тем не менее, важно отметить, что всегда оставалась доля клеток с нарушениями инактивации, которые не поддавались коррекции в праймированном состоянии.

На основании полученных данных можно предположить, что клетки с двумя ядерными сигналами H3K27me3 соответствуют промежуточному состоянию, предшествующему полному восстановлению инактивации X-хромосомы. В совокупности представленные результаты показывают, что среда iLF индуцирует динамическую реорганизацию эпигенетического статуса X-хромосомы. В этой среде в клетках формируется сперва два сигнала H3K27me3, предшествующие восстановлению ХС1. При дальнейшем культивировании эта субпопуляция постепенно переходит к конфигурации с одним сигналом H3K27me3, что свидетельствует о поэтапном установлении стабильной инактивации X-хромосомы. Таким образом, среда iLF способствует прогрессивному восстановлению эпигенетической целостности плюрипотентных клеток, возвращая и стабилизируя ХС1.

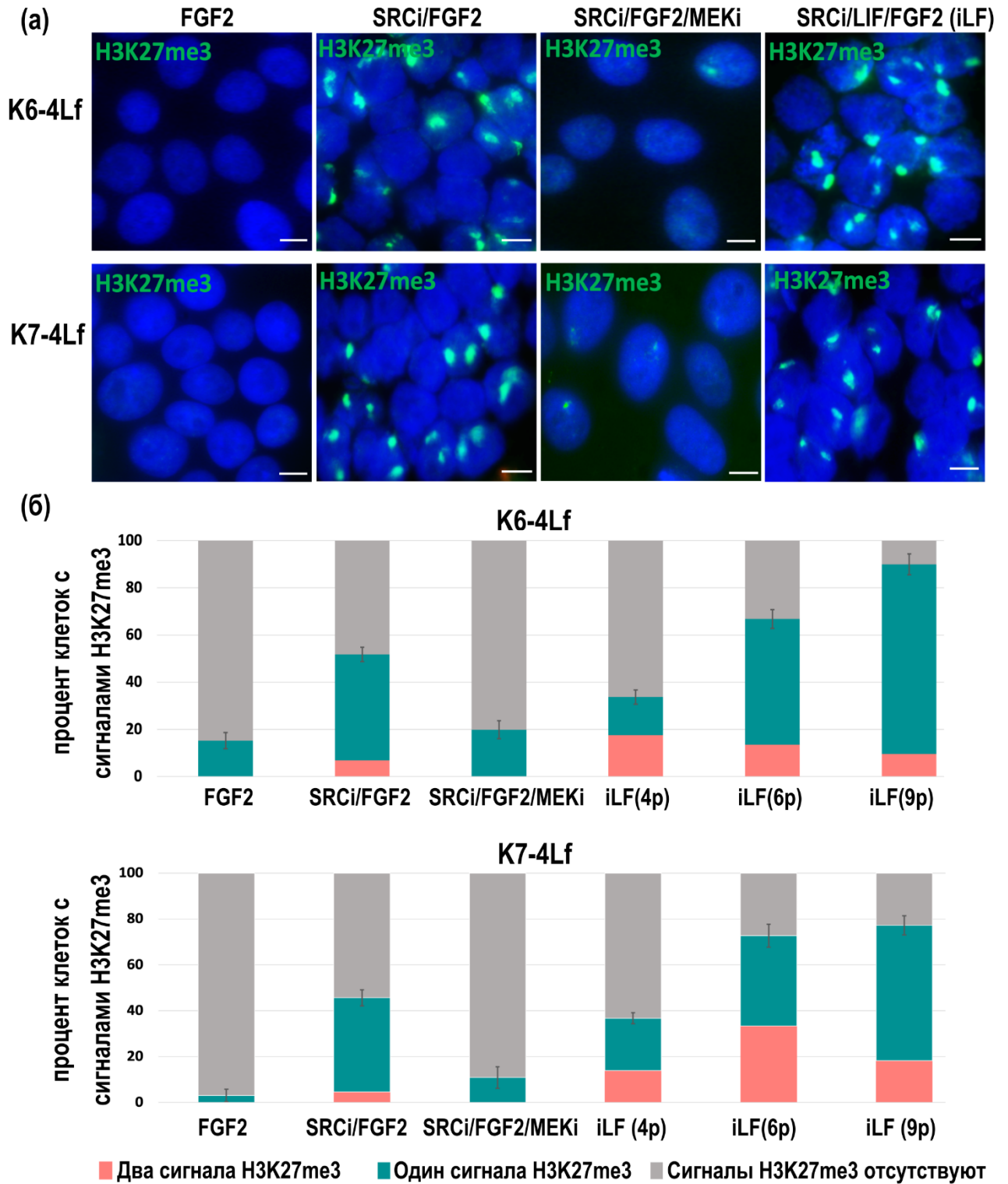


Рисунок 11. Влияние ингибитора киназы SRC CGP77675 на состояние X-хромосом в культурах праймированных ИПСКч линий K6-4Lf и K7-4Lf. (а) Иммуноокрашивание ядер на модификацию хроматина H3K27me3 в исходных ИПСКч, а также в культурах с FGF2 и ингибитором SRC, в культурах с FGF2, LIF и ингибитором SRC (среда iLF). Линейка — 10 мкм. (б) Процент клеток, обнаруживающих сигнал H3K27me3 (синий цвет) в исходных культурах (FGF2), культурах с ингибитором SRC (SRCi/FGF2), с LIF и SRCi (iLF), а также в культуре, растущей в среде FGF2, SRCi и MEKi (SRCi/MEKi). Культуры iLF анализировались последовательно на пассажах 4, 6 и 9, для всех остальных комбинаций факторов детекция результатов проводилась на пассаже 9.

В недавних исследованиях было показано, что ингибирование сигнального пути WNT способствует стабилизации культур наивных и праймированных ПСКч (Xu et al. 2016), однако в то же время является причиной эрозии в клетках с праймированной плюрипотентностью (Blauwkamp et al. 2012; Boroviak et al. 2015; Cloutier et al. 2022; Davidson et al. 2012; Kurek et al. 2015). В рамках данной работы мы исследовали влияние ингибитора WNT-пути XAV939 в комбинации со средой iLF (iLF/WNTi) на эпигенетический статус X-хромосом в праймированных ИПСКч линий K6-4Lf и K7-4Lf. По данным иммуноокрашивания, культуры iLF/WNTi продемонстрировали увеличение доли клеток, содержащих сигналы H3K27me3 (рис. 12 а). Полученные данные показали, что добавление XAV939 поддерживает долю клеток с наличием сигналов H3K27me3 на уровне около 70 % как в линии K6-4Lf, так и в K7-4Lf (рис. 12 б). Доля клеток с двумя сигналами H3K27me3 на 9 пассаже составляла около 12% в K6-4Lf и ~24% в K7-4Lf (рис. 12 б) и была сравнима (статистически значимо не отличалась) с таковой на девятом пассаже в среде iLF. В целом же восстановление неактивного состояния X-хромосомы из состояния эрозии в среде iLF/WNTi идёт статистически значимо менее эффективно, чем в среде iLF самой по себе.

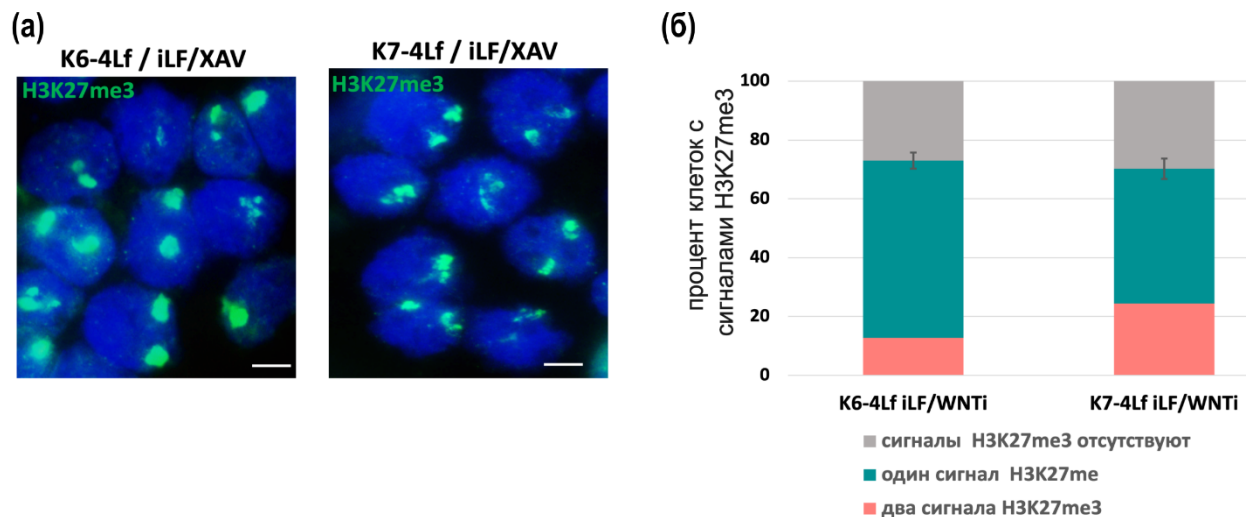


Рисунок 12. Влияние ингибитора WNT XAV939 в составе среды iLF (iLF/WNTi) на эпигенетическое состояние X-хромосом в культурах ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf. (а) Иммунофлуоресцентное окрашивание на модификацию хроматина H3K27me3 в ИПСКч, культивируемых в среде iLF/WNTi. Линейка — 10 мкм. (б) Процентное содержание сигналов H3K27me3 в ИПСКч, выращенных в среде iLF/WNTi.

Попытки вернуть в неактивное состояние X-хромосому с эрозией в праймированных ЭСК линии NuES9 не увенчались успехом (данные не представлены). Никакие комбинации факторов в сочетании с ингибитором SRC не приводили к появлению в ядрах линии NuES9 сигналов H3K27me3. По-видимому, успешный возврат

X-хромосомы с эрозией в неактивное состояние в праймированных ПСКч возможен только на начальных стадиях нарушения ХС1 и неосуществим на более поздних этапах. Вероятно, исправление эрозии ХС1 в данном случае возможно только через возврат клеток в наивное плюрипотентное состояние и повторное праймирование.

Полученные результаты показывают возможности ингибитора киназы SRC в регуляции эпигенетического статуса X-хромосомы. Эти данные открывают новое направление оптимизации условий культивирования, нацеленное на улучшение моделирования ХС1 и выявление сигнальных путей, контролирующих эпигенетический статус X-хромосомы в ПСКч с двумя X-хромосомами.

3.8 Характеристика линий праймированных ИПСКч в среде iLF

Так как среда iLF проявила максимальную эффективность в восстановлении неактивного состояния X-хромосомы в праймированных ПСК, мы оценили, как она влияла на свойства клеточных линий K6-4Lf и K7-4Lf. В целом инкубирование линий ПСК K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF не вызывало изменений морфологии колоний праймированных плюрипотентных клеток (рис. 13 а). Культуры демонстрировали нормальную морфологию, стабильно пассировались каждые 3–4 дня. Иммуноокрашивание подтвердило сохранение экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности, включая NANOG и OCT4, демонстрируя, что ингибирование SRC в сочетании с LIF не нарушает плюрипотентную идентичность праймированных линий (рис. 13 б).

Анализ профиля экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени показал, что уровень экспрессии *NANOG* демонстрировал транзиторное повышение до 6-го пассажа, после чего снижался к 9-му пассажу (рис. 14). В то время как уровень *TFCP2L1*, маркера наивного состояния, не претерпевал существенных изменений (рис. 14). Таким образом, данные результаты свидетельствуют о том, что среда iLF способствует поддержанию праймированной плюрипотентности. Кроме того, обнаружена значимая активация эпигенетических регуляторов *DNMT3B* и *DPPA5*. Экспрессия ДНК-метилтрансферазы *DNMT3B* достигала пика к 6-му пассажу, а затем снижалась, но при этом оставалась выше уровня, наблюдаемого в стандартных условиях (рис. 14). Экспрессия *DPPA5* демонстрировала стабильное и устойчивое повышение (рис. 14). Усиление экспрессии *DNMT3B* и *DPPA5* указывает на консолидацию плюрипотентного состояния клеток и поддержание эпигенетической стабильности. *DPPA5*, как известно, способствует поддержанию плюрипотентного состояния и экспрессии *NANOG*, участвует в ранних

этапах спецификации примордиальных половых клеток и играет ключевую роль в сохранении импринтинга (Kim et al. 2005; Nakamura et al. 2007; Qian et al. 2016). DNMT3B, являясь главным ферментом *de novo* метилирования, формирует и поддерживает паттерны метилирования, участвует в поддержании эпигенетического гомеостаза, включая гетерохроматиновые области, и взаимодействует с белками типа цинковых пальцев для сохранения импринтинга (Arez and da Rocha 2025; Chen et al. 2003; Huang et al. 2024). Таким образом, восстановление экспрессии этих ключевых эпигенетических регуляторов — *DPPA5* и *DNMT3B* — свидетельствует о перестройке эпигенетического паттерна и реставрации механизма контроля метилирования, что может способствовать укреплению плюрипотентности и эпигенетической стабильности клеток.

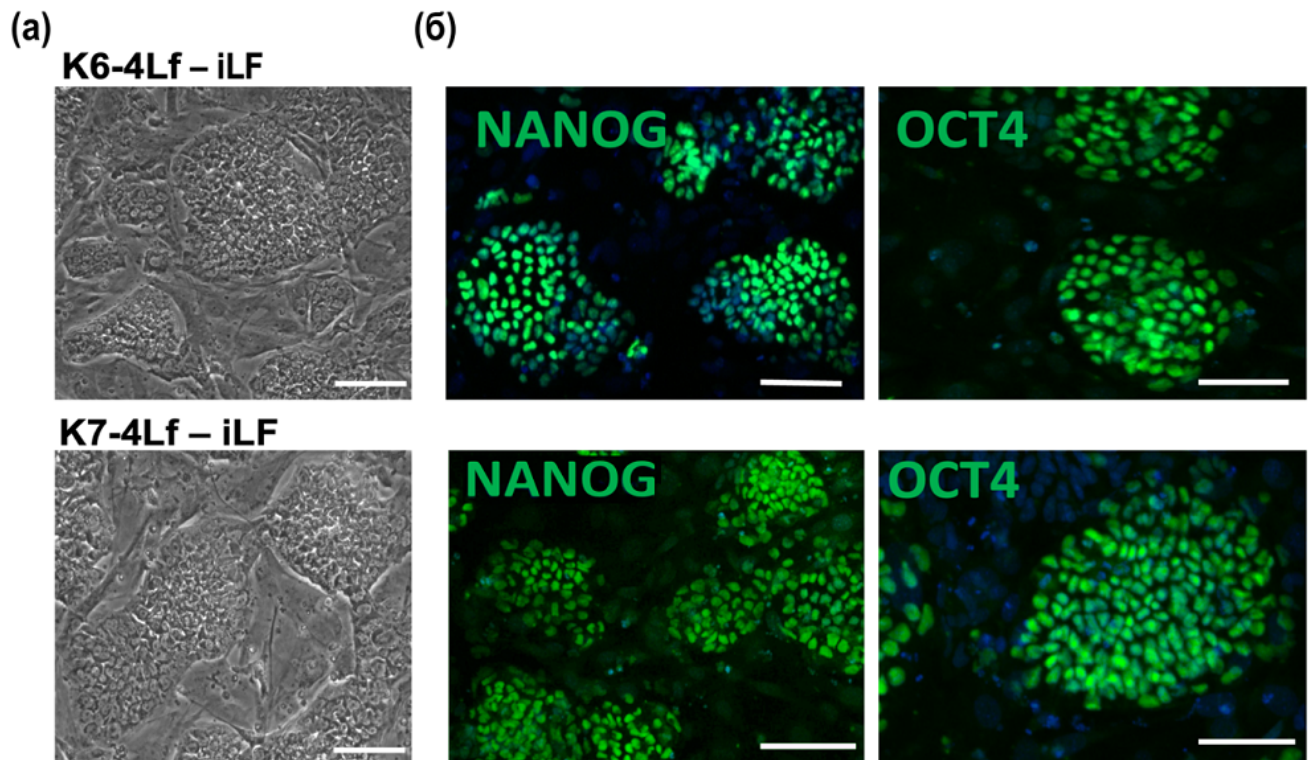


Рисунок 13. Культивирование ИПСКч в среде iLF. (а) Морфология колоний ИПСКч К6-4Lf и К7-4Lf, культивируемых в среде iLF. (б) Экспрессия транскрипционных факторов плюрипотентности OCT4 (зеленый) и NANOG (зеленый) в культуре ИПСКч. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка – 100 мкм.

3.8.1 Динамика экспрессии *XIST* при культивировании праймированных линий ИПСК с эрозией инактивации в среде iLF

Длинная некодирующая РНК *XIST* функционирует как структурная РНК, которая связывается с белками, обеспечивающими её контакт с хроматином X-хромосомы, ингибиторами транскрипции и белками-модификаторами хроматина (Cerase et al. 2015; Dossin et al. 2020; Penny et al. 1996; Pintacuda et al. 2017). Она вовлечена в стадию демпфирования транскрипции, инициацию инактивации X-хромосомы и поддержание её

неактивного состояния (Okamoto et al. 2011; Vallot et al. 2017). В состоянии эрозии наблюдается репрессия *XIST*. При демпфировании транскрипции X-хромосомы происходит экспрессия незрелого, несплайсированного транскрипта *XIST* (Stork et al. 2019). В инактивации X-хромосомы преимущественно участвует сплайсированный транскрипт гена *XIST* (Yue and Ogawa 2018). Учитывая это, мы оценили исходное состояние транскрипции в праймированных линиях с эрозией, а затем в динамике оценили экспрессию сплайсированных и несплайсированных форм транскрипта *XIST* в процессе восстановления неактивного состояния X-хромосомы в праймированных ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf, культивируемых в среде iLF.

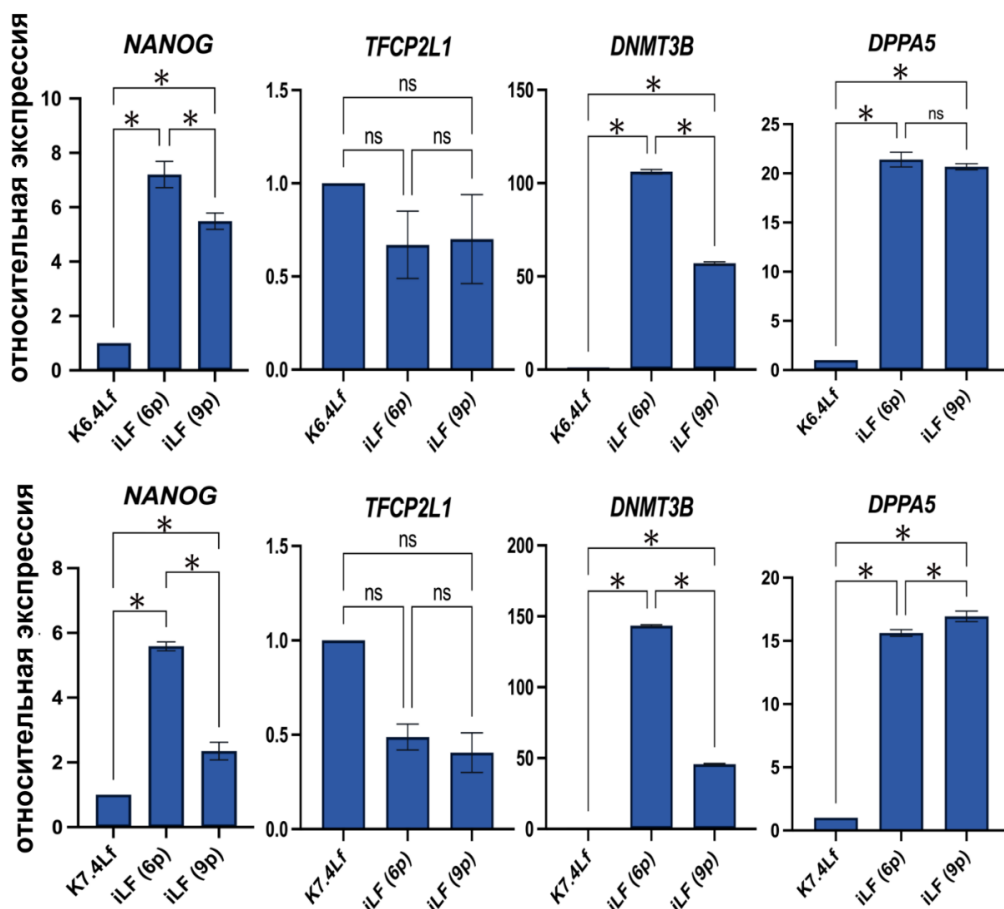


Рисунок 14. Относительная экспрессия мРНК генов *NANOG*, *TFCP2L1*, *DNMT3B* и *DPPA5* в ИПСКч, культивируемых в среде iLF, на последовательных пассажах 6 и 9. В качестве референсных генов для нормировки экспрессии использовали *ACTB*, *B2M* и *TFRC*. Для сравнения групп использовали непарный Т-критерий Стьюдента. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) отмечены звёздочкой.

В обеих линиях наблюдалась выраженная индукция *XIST*, которая следовала синхронно с постепенным увеличением доли клеток с сигналами H3K27me3 с 6 по 9 пассаж (рис. 15). Такая скоординированная динамика индукции *XIST* и аккумуляции H3K27me3 указывает на прямую и функционально значимую связь между экспрессией

XIST и формированием репрессированного хроматина на X-хромосоме. Наблюдаемая координация между индукцией *XIST* и обогащением H3K27me3 отражает динамическое взаимодействие, лежащее в основе установления инактивации X-хромосомы. Временное присутствие двух сигналов H3K27me3 на фоне экспрессии *XIST* соответствует промежуточному состоянию демпфирования транскрипции, фиксируя последовательный переход к стабильной инактивации X-хромосомы и консолидации эпигенетических меток.

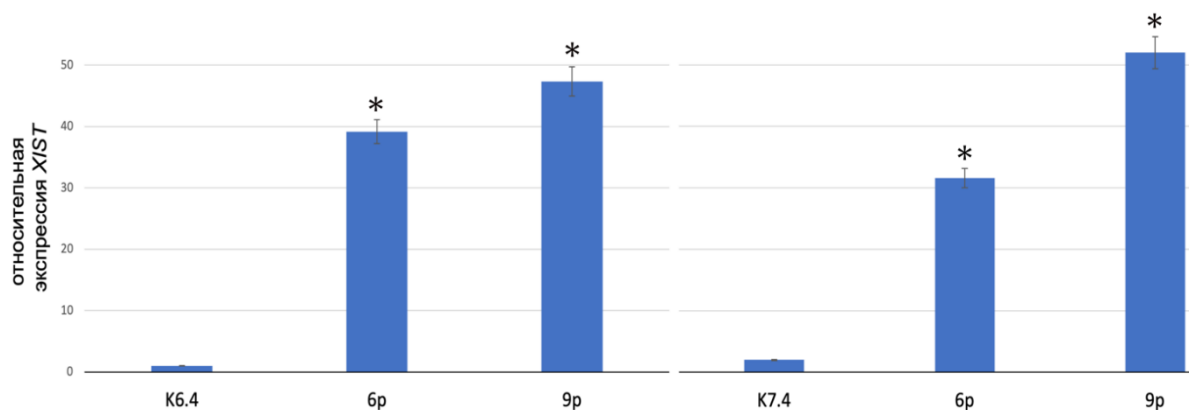


Рисунок 15. Относительная экспрессия *XIST* в ИПСКч линиях K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF на шестом и девятом пассажах. Для сранения групп использовали непарный Т-критерий Стьюдента. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении исходных культур с культурами на пассажах 6 и 9 отмечены звёздочкой.

Для анализа динамики экспрессии сплайсированного и несплайсированного *XIST* в культурах K6-4Lf и K7-4Lf, поддерживаемых в iLF, были использованы праймеры к экзону 1 для оценки зрелых транскриптов и к интрону 1 для выявления несплайсированных форм. Экспрессия экзона 1 демонстрировала нарастающую с пассажами индукцию в обеих клеточных линиях, что коррелировало с прогрессивным накоплением ядерных сигналов H3K27me3. Экспрессия интрона 1 также была существенно повышена, однако достигала максимума на 6-м пассаже и снижалась к 9-му в обеих линиях. Анализ относительной доли зрелых и незрелых транскриптов *XIST* показал, что на 6-м пассаже несплайсированные формы составляли около 80 % от общего пула *XIST* в линии K6-4 и до 90 % в K7-4Lf, тогда как к 9-му пассажу их доля снижалась примерно до 40% и 60% соответственно (рис. 16). Эти результаты указывают, что на ранних этапах активации *XIST* преобладают несплайсированные транскрипты, тогда как на более поздних пассажах накапливаются зрелые формы. Такая последовательность отражает динамическую трансформацию *XIST* от незрелых к зрелым транскриптам, которая совпадает с переходом от наличия двух сигналов H3K27me3, соответствующих стадии демпфирования транскрипции, к одиночным, характерным для неактивной X-

хромосомы. Мы предполагаем, что подобная динамика может представлять собой ключевой механизм установления стабильного статуса инактивации X-хромосомы.

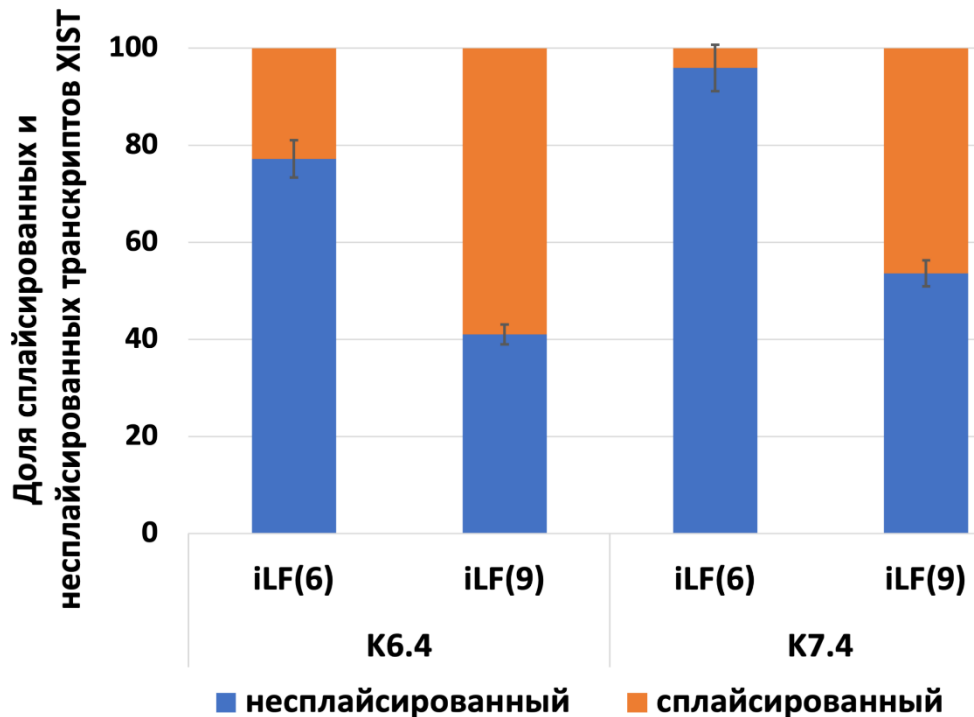


Рисунок 16. Процент сплайсированных и несплайсированных транскриптов *XIST* в линиях ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF на на шестом и девятом пассажах.

3.8.2 Влияние хемокина CCL2 на свойства линий праймированных ПСКч и эпигенетический статус X-хромосом

Цитокин LIF, использованный нами при получении наивных клеток и коррекции нарушений инактивации в праймированном состоянии, является не единственным возможным индуктором сигнального каскада JAK/STAT3. Считается, что альтернативой LIF может выступать хемокин CCL2, который редко используется при культивировании ПСКч, но способен активировать сигнальный путь JAK/STAT3, при этом дополнительно вызывая в клетках состояние псевдогипоксии. В данной работе мы изучили влияние CCL2 на праймированные плюрипотентные клетки и испытали его способность восстанавливать состояние эрозии, заменив им LIF в среде iLF.

Сперва мы изучили влияние CCL2 на праймированные ПСКч. Линии ЭСК HuES9 и ИПСК K7-4Lf культивировали в среде KoSR, дополненной 10 нг/мл FGF2 и 10 нг/мл CCL2 в течение трёх пассажей.

Результаты вестерн-блоттинга продемонстрировали, что добавление CCL2 в культуры HuES9 и K7-4Lf приводит к значительному увеличению уровней транскрипционных факторов плюрипотентности: OCT4, NANOG, SOX2 и TFCP2L1, а

также повышению уровня фосфорилированного STAT3 (рис. 17). Этот эффект наблюдался после трёх пассажей культивирования с CCL2. TFPC2L1, известный маркер наивных ПСК, непосредственно регулируется фосфорилированной формой транскрипционного фактора STAT3 после активации киназы JAK в сигнальном каскаде JAK/STAT3 (Martello et al. 2013; Sala and Sacco 2016). Эти данные указывают на выраженное влияние CCL2 на поддержание и усиление плюрипотентного состояния ПСКч.

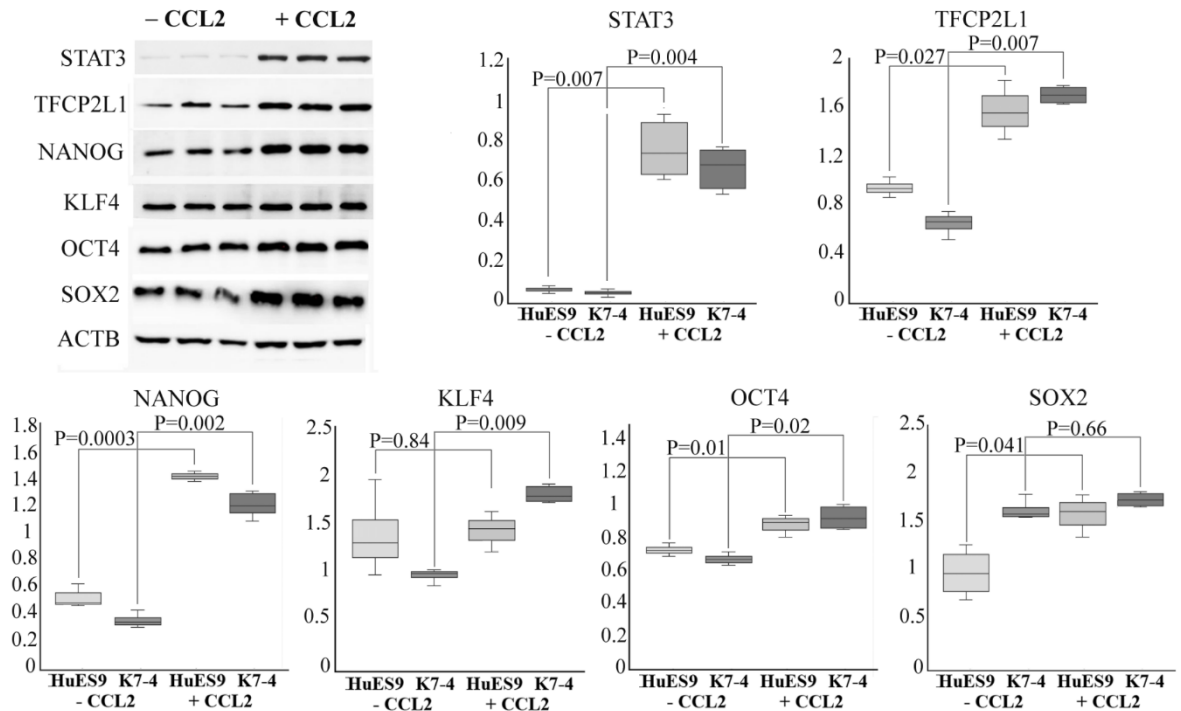


Рисунок 17. Относительный уровень белков транскрипционных факторов плюрипотентности при культивировании праймированных ПСКч с хемокином CCL2 (+CCL2) и без него (-CCL2). На диаграммах размаха представлены относительные уровни фосфорилированной формы транскрипционного фактора STAT3, а также факторов OCT4, TFPC2L1, KLF4, NANOG, SOX2, нормированные на ACTB и SMC1, на основании данных денситометрии по результатам белкового иммуноблота с лизатами эмбриональных стволовых клеток HuES9 и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток K7-4Lf. Примеры иммуноблотиннга белковых лизатов представлены для линии HuES9.

Известно, что культивирование ПСКч в условиях гипоксии, имитирующей окружение ранней бластоцисты *in vivo*, повышает их пролиферативную активность и генетическую стабильность. Факторы гипоксии, в свою очередь, поддерживают плюрипотентность и активируют сигнальный путь JAK/STAT3. Кроме того, они контролируют метаболизм в ПСКч и влияют на эпигенетику плюрипотентных клеток. Однако культивирование ПСКч в условиях гипоксии связано с рядом технических

сложностей. Наличие веществ-миметиков гипоксии, совместимых с поддержанием культур плюрипотентных клеток, могло бы существенно упростить ситуацию.

В наших экспериментах мы наблюдали выраженное повышение уровня белков факторов гипоксии HIF1A и HIF2A в культурах NuES9 и K7-4Lf после четырёх пассажей с добавлением CCL2 при атмосферной концентрации кислорода (20% O₂) (рис. 18 а). В норме субъединицы HIF1A и HIF2A стабилизируются и накапливаются преимущественно в гипоксических условиях. Чтобы определить, является ли это увеличение результатом усиления транскрипции, мы оценили уровни мРНК с помощью полуколичественного RT-PCR и обнаружили значимое повышение экспрессии мРНК *HIF2A*, но не *HIF1A* (рис. 18 б). Мы также наблюдали увеличение экспрессии транспортёров глюкозы *GLUT1* и *GLUT3*, которые являются мишенями транскрипционного фактора HIF (рис. 18 б). Эти результаты демонстрируют, что добавление CCL2 в культуру NuES9 и K7-4Lf стимулирует ответ, сходный с состоянием гипоксии, способствуя как поддержанию плюрипотентности, так и переориентации метаболизма клеток в сторону гликолиза. Таким образом, CCL2 влияет на свойства ПСКч, имитируя эффекты гипоксии в условиях культивирования клеток при атмосферной концентрации кислорода.

Согласно данным литературы (Podkalicka et al. 2020), гипоксические условия повышают эффективность дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в эндотелиальном направлении и ангиогенный потенциал эндотелиальных производных (ЭК). В настоящем исследовании проведена направленная дифференцировка ПСКч в ЭК, чтобы определить влияние псевдогипоксии, индуцированной CCL2, на этот процесс. Протокол дифференцировки включал начальную индукцию мезодермы с последующей специализацией в эндотелиальную линию (рис. 19 а).

Экспрессия мезодермального маркера *BRACHYURY* была проанализирована методом ПЦР в реальном времени (рис. 20 а). Мы не обнаружили значимых различий в потенциале формирования мезодермы между клетками NuES9 и K7-4Lf, культивируемыми с добавлением CCL2 и без него. На втором этапе дифференцировки, который проводился в среде EGM-2, мы оценивали образование предшественников и зрелых ЭК по экспрессии маркеров VEGFR2, VE-cadherin и CD31. На 2-й день в культурах с добавлением CCL2 процент клеток, положительных по CD31 и VE-cadherin, был статистически значимо выше в среднем приблизительно на 20% по сравнению с контрольными культурами (рис. 20 б). Это указывает на ускорение начальных этапов эндотелиальной спецификации. Однако на позднем этапе (8-й день), все культуры,

независимо от наличия CCL2, имели сопоставимый процент зрелых ЭК, экспрессирующих CD31 и VE-cadherin (рис. 20 б). Полученные зрелые ЭК также экспрессировали маркер CD31 и фактор фон Виллебранда (рис. 19 б), что подтверждает их эндотелиальную идентичность. Таким образом, добавление CCL2 ускоряет инициацию дифференцировки ПСК в эндотелиальный тип, но не влияет на общую эффективность протокола направленной дифференцировки.

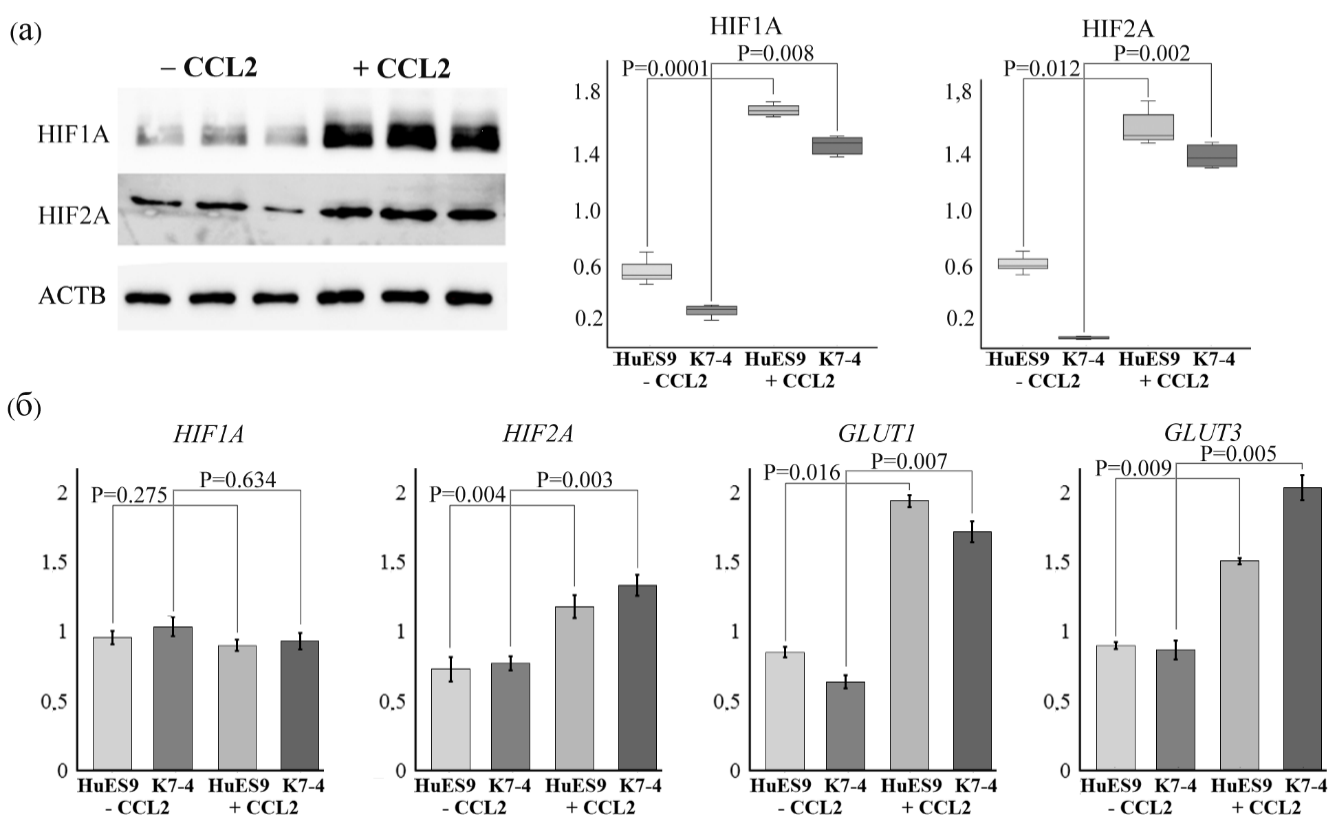


Рисунок 18. Добавление CCL2 к культурам плюрипотентных стволовых клеток человека вызывает гипоксический ответ при атмосферной концентрации кислорода. (а) Повышение уровней белков кислородзависимых субъединиц HIF1A и HIF2A при культивировании с хемокином CCL2 ЭСК линии HuES9 и ИПСК линии K7-4Lf. Примеры иммуноблотинга белковых лизатов линии HuES9. На диаграммах размаха представлены относительные уровни белков HIF1A и HIF2A, нормированные на ACTB и SMC1, на основании данных денситометрии по результатам белкового иммуноблота с лизатами эмбриональных стволовых клеток HuES9 и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток K7-4Lf, культивируемых с CCL2 (+CCL2) и без CCL2 (-CCL2). Примеры иммуноблотинга белковых лизатов представлены для линии HuES9. (б) Сравнение относительного уровня экспрессии генов, связанных с гипоксией: *HIF1A* и *HIF2A* (а), *GLUT1* и *GLUT3*, в культурах ЭСК линии HuES9 и ИПСК линии K7-4Lf, выращенных с добавлением (+CCL2) и без добавления (-CCL2) хемокина CCL2. Достигнутый уровень значимости (*p*) указан над столбчатыми диаграммами для соответствующих пар сравнений.

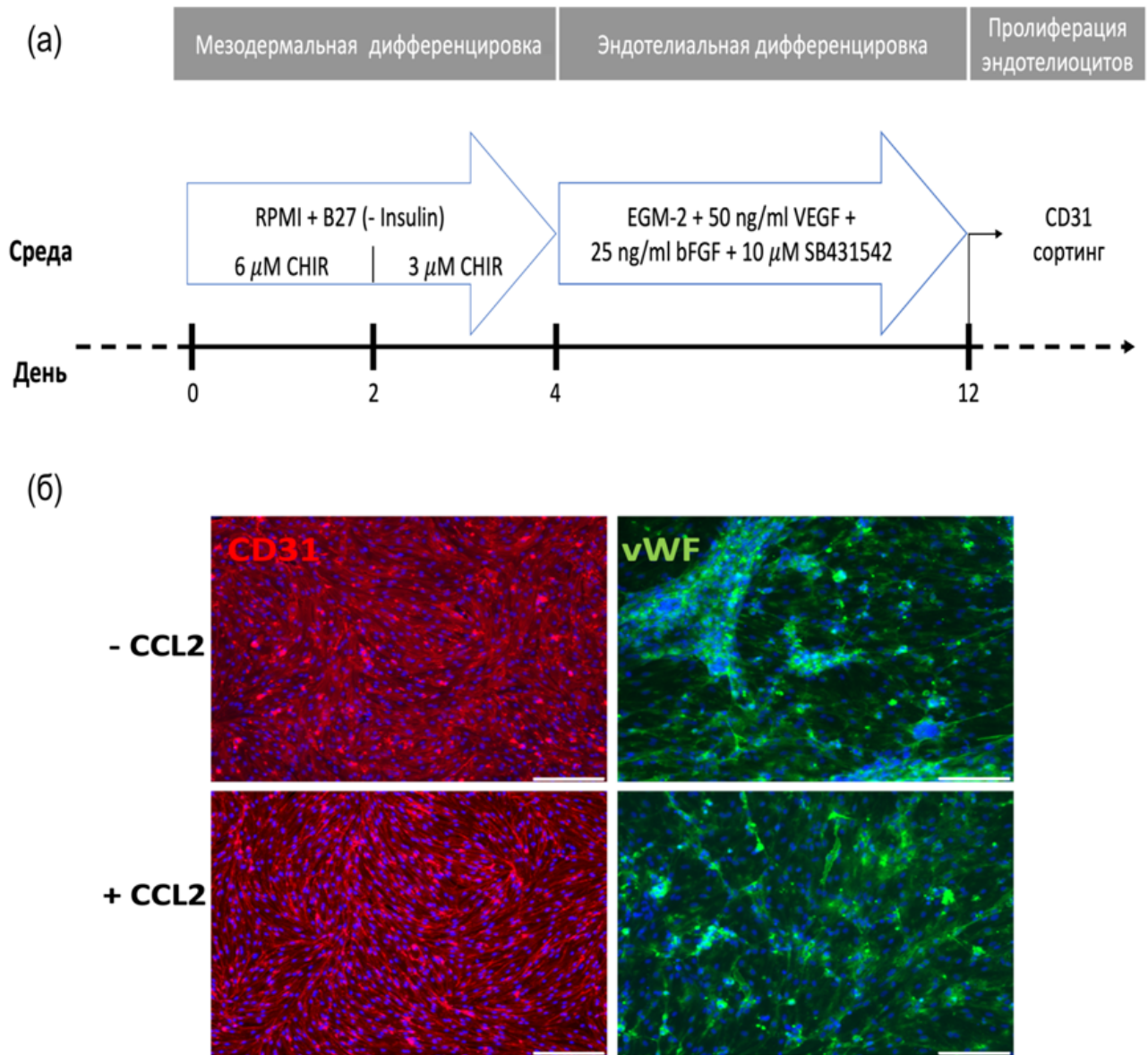


Рисунок 19. Влияние хемокина CCL2 на направленную дифференцировку ПСКч в эндотелиальном направлении. (а) Схема направленной эндотелиальной дифференцировки ПСК человека. (б) Эндотелиальные производные ПСК, полученные в результате дифференцировки линии NuES9 без добавления (-CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2), демонстрируют свойства, характерные эндотелиоцитам: имеют поверхностный антиген CD31 и синтезируют фактор фон Виллебранда (vWF). Ядра окрашены DAPI. Линейка – 100 мкм.

В то же время ЭК, полученные из ПСК, культивируемых с CCL2, демонстрировали повышенную способность формировать капилляроподобные структуры (рис. 21 а), образуя больше ветвлений по сравнению с ЭК, полученными из ПСК без CCL2 (рис. 21). Следовательно, добавление CCL2 в культуру ПСК увеличивает ангиогенный потенциал производных эндотелиальных клеток.

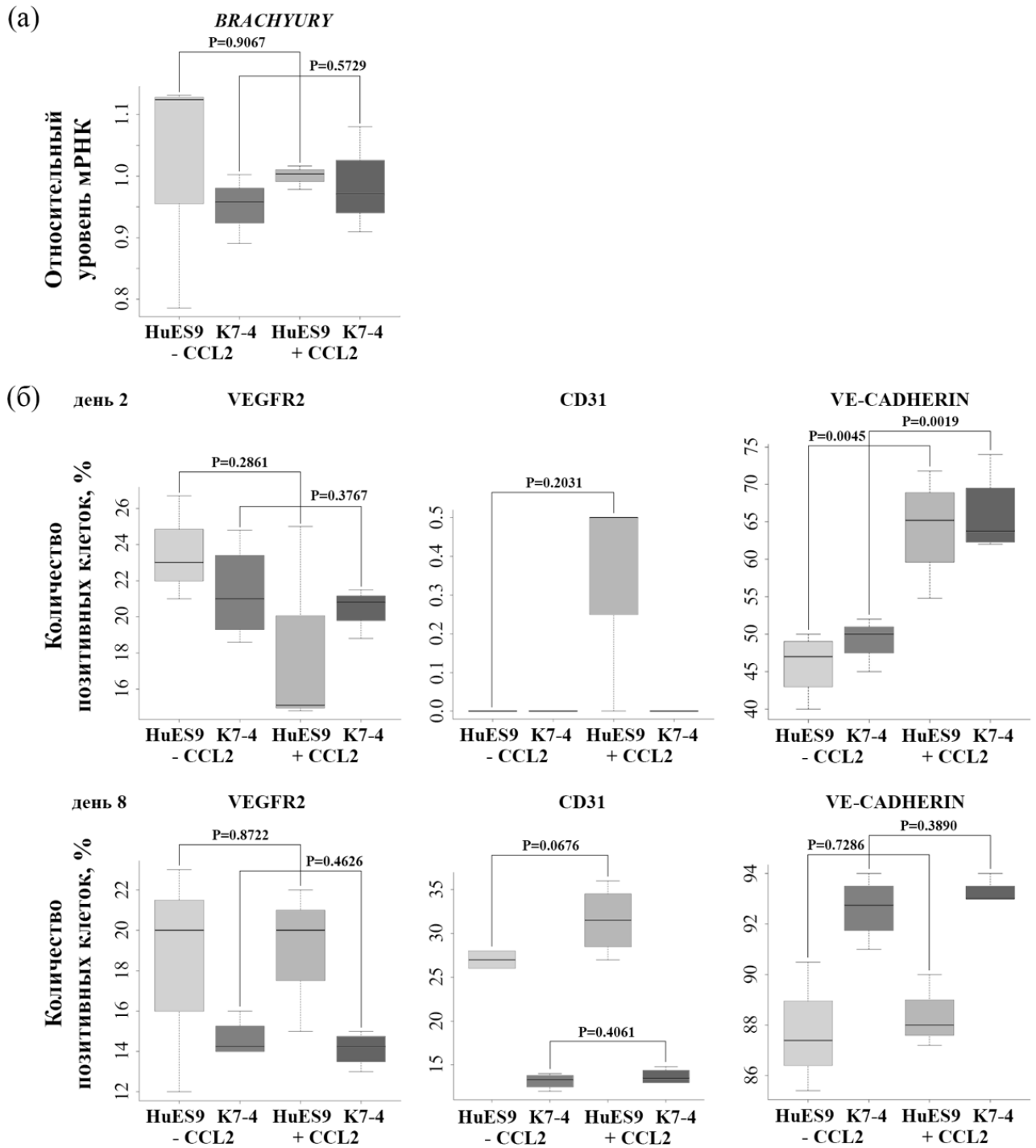


Рисунок 20. Эффективность направленной мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток линий HuES9 и K7-4, культивируемых без добавления (-CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2). (а) Относительный уровень экспрессии мРНК гена *BRACHYURY* – раннего маркера мезодермальной дифференцировки. (б) Количественная оценка маркеров эндотелиальной дифференцировки методом проточной цитометрии. Достигнутый уровень значимости (p) указан над диаграммами размаха для соответствующих пар сравнений.

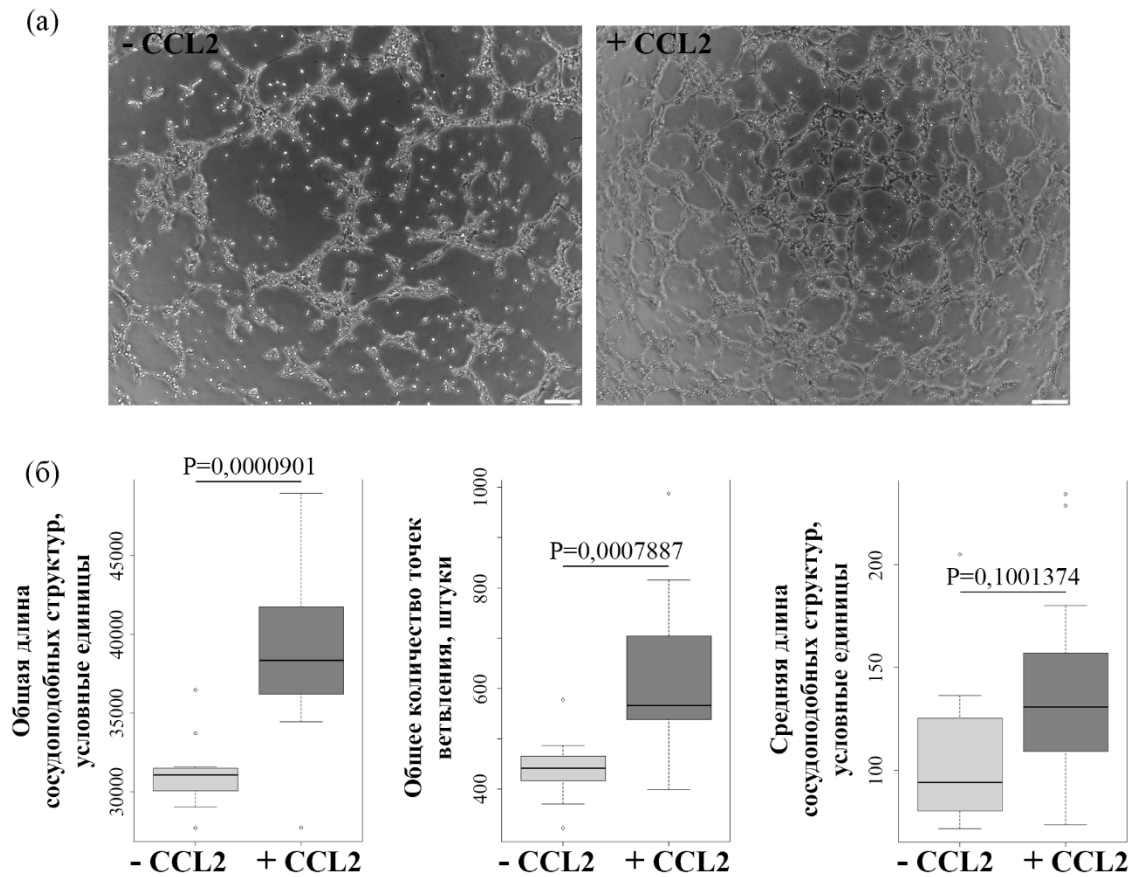


Рисунок 21. Ангиогенный потенциал *in vitro* дифференцированных эндотелиальных производных ПСКч линий NuES9 и K7-4Lf, полученных без добавления (-CCL2) и с добавлением хемокина CCL2 (+CCL2). (а) Репрезентативное изображение сети сосудоподобных структур эндотелиальных производных NuES9 на слое матригеля. Линейка – 100 мкм. (б) Количественная оценка общей и средней длины сосудоподобных структур, общего количества точек ветвления. Достигнутый уровень значимости (p) указан над диаграммами размаха для соответствующих пар сравнений.

Наше исследование демонстрирует, что добавление хемокина CCL2 в культуры ПСКч при атмосферной концентрации кислорода вызывает состояние псевдогипоксии, выражающейся в повышении уровней факторов гипоксии HIF1A и HIF2A, а также ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности, NANOG и TFCP2L1. Помимо этого, CCL2 увеличивает жизнеспособность и дифференцировочный потенциал ПСКч в культуре. Полученные результаты послужили основой для дальнейших экспериментов по оценке эффекта CCL2 на статус X-хромосом в ПСКч.

Для исследования возможностей использования хемокина CCL2 при коррекции эрозии ХСГ в праймированных ПСКч мы заменили LIF в среде iLF на CCL2. В условиях SRCi/CCL2/FGF2 культуры K6-4Lf и K7-4Lf сохраняли стабильность, демонстрируя морфологию, типичную для плюрипотентных клеток, и проходили регулярные пассажи (рис. 22 а). Полученная культуральная среда в дальнейшем обозначалась как iCF. Анализ

распределения сигналов H3K27me3 на 4-м, 6-м и 9-м пассажах показал, что при добавлении CCL2 в обеих культурах также происходит появление клеток с двумя сигналами H3K27me3, соответствующих стадии демпфирования транскрипции X-хромосомы, число которых уменьшается с пассажами в пользу клеток с одним сигналом H3K27me3, соответствующим состоянию инактивации X-хромосомы. Однако доля клеток без сигнала H3K27me3 остаётся высокодинамичной и значимо возрастает с пассажами, что может свидетельствовать о повторной эрозии неактивной X-хромосомы после восстановления XCI (рис. 22 б). Эти результаты убедительно демонстрируют, что путь JAK–STAT3 участвует наряду с ингибитором SRC в эпигенетической организации X-хромосомы в ПСКч с праймированной плюрипотентностью, что проявляется в последовательном восстановлении H3K27me3. Однако использование среды iLF с цитокином LIF более эффективно восстанавливает эрозию и более стабильно поддерживает неактивное состояние X-хромосомы после восстановления нарушений XCI, чем аналогичная среда с CCL2.

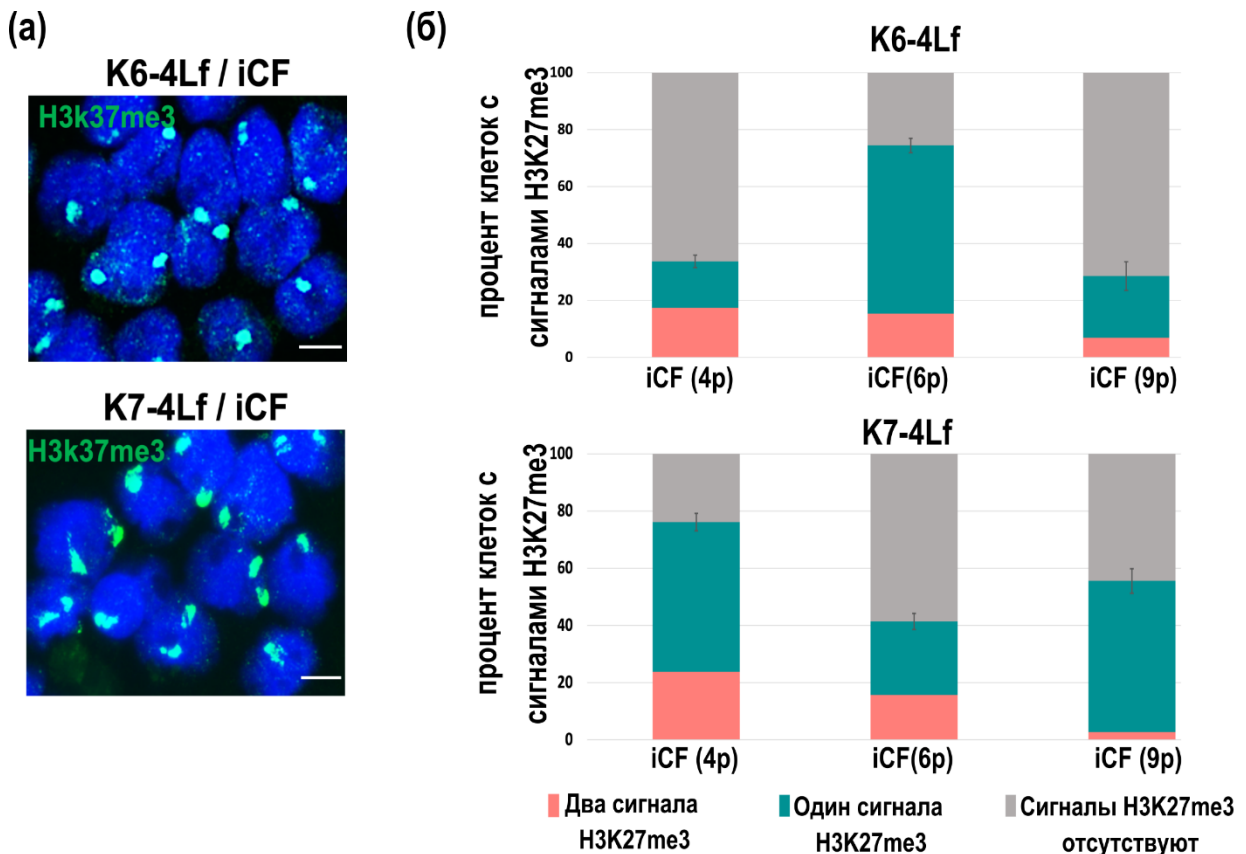


Рисунок 22. Культивирование ИПСКч линий K6-4Lf и K7-4Lf в среде iCF. (а) Иммунофлуоресцентное окрашивание на H3K27me3 ИПСКч, культивируемых в среде iCF. Линейка — 10 мкм. (б) Процент клеток с сигналами H3K27me3 в ИПСКч, культивируемых в среде iCF на 4-ом, 6-ом и 9-ом пассажах.

3.9 Исключение факторов роста из среды HENSM обогащает культуру ПСКч клетками, подобными тотипотентным, и возвращает способность к случайной инактивации

Считается, что поддержание наивной плюрипотентности в большей степени зависит от присутствия в среде малых молекул ингибиторов киназ, чем от наличия ростовых факторов (Theunissen et al. 2014). Обнаружено, что для поддержания наивных ПСКч из ростовых сред могут быть исключены ростовые факторы FGF2 и ACTIVIN A, а концентрация LIF, единственного фактора, общего для всех наивных ПСКч, может быть снижена в 10 раз (с 10 нг/мл до 1 нг/мл), например, в среде t2iLGo (Bayerl et al. 2021; Takashima et al. 2014). Основываясь на этих наблюдениях, в данной работе была предпринята попытка выяснить, как повлияет исключение ростовых факторов (LIF и ACTIVIN A) из культуральной среды HENSM на способность наивных клеток воспроизводить случайную инактивацию. Для этого клетки линии NuES9, полученные исходно в среде HENSM с LIF, культивировали в трёх вариантах среды: HENSM-LA (с LIF и ACTIVIN A), HENSM-L (только с LIF) и HENSM-0 (без ростовых факторов).

Во всех условиях полученные наивные культуры NuES9 демонстрировали характерные признаки наивного состояния: куполообразную морфологию колоний (рис. 23 а), экспрессию маркеров CD75, TFE3 и KLF17 (рис. 23 а), а также способность дифференцироваться в производные всех трёх зародышевых листков и внезародышевые трофобластные линии (рис. 22 б). Полученные трофобластные клетки экспрессировали поверхностные маркеры TACSTD2 и ENPEP, характерные для трофобласта на стадии плацентации (рис. 22 в). Более того, культивирование наивных NuES9 в низкоадгезивных условиях приводило к образованию бластоидов, подтверждая функциональность наивного состояния (рис. 22 г). Мы провели полуколичественный ОТ-ПЦР анализ в режиме реального времени культур NuES9, поддерживаемых в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 и показали, что устойчивое поддержание наивной плюрипотентности во всех трёх вариантах среды подтверждалось повышенной экспрессией генов транскрипционных факторов *TFCP2L1*, *DNMT3L* и *KLF17* (рис. 22 д).

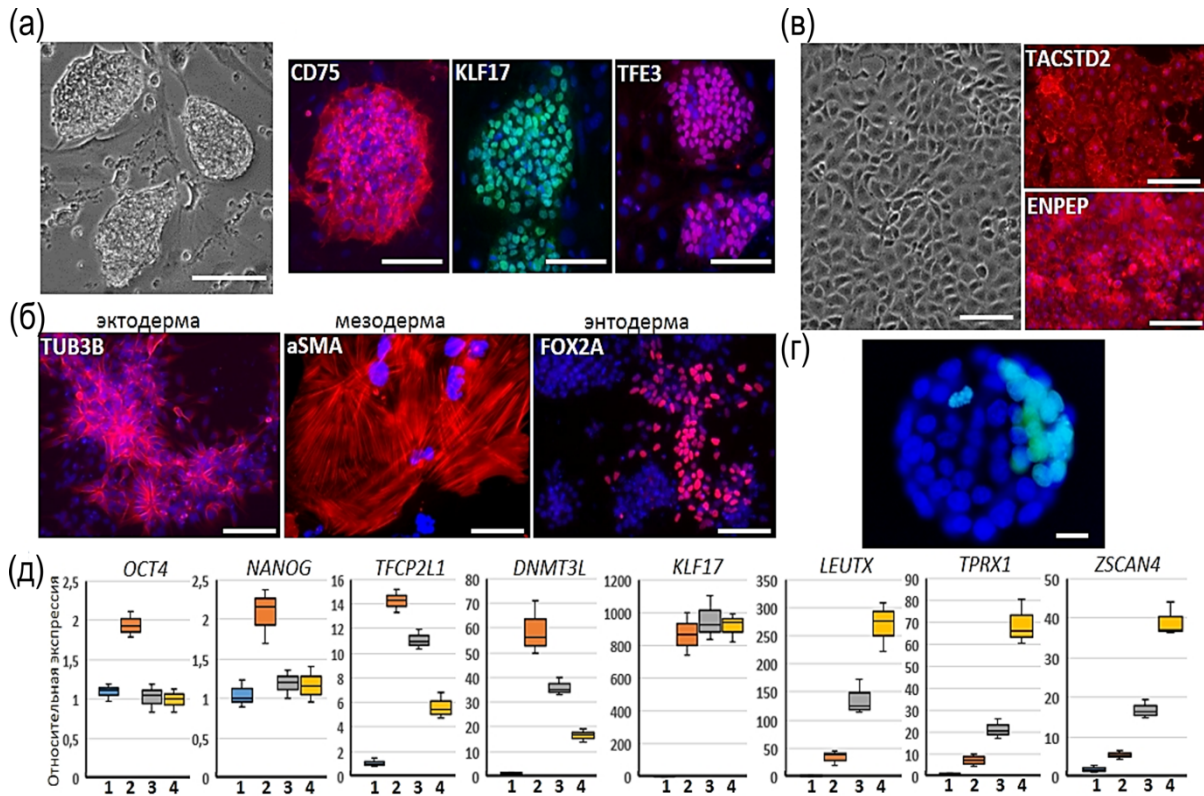


Рисунок 23. Наивные ЭСК человека линии NuES9, культивируемые в средах HENSM (на примере наивных клеток, культивируемых в среде HENSM-0): (а) морфология колоний наивных ЭСК и иммунофлуоресцентная детекция специфических для наивного состояния ЭСК поверхностного антигена CD75 (красный), а также транскрипционных факторов TFE3 (красный) и KLF17 (зеленый), (б) иммунофлуоресцентная детекция маркеров эктодермы (TUB3B, красный), мезодермы (α SMA, красный), энтодермы (FOX2A, красный) после спонтанной дифференцировки наивных ЭСК в производные трёх зародышевых листков, ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, (в) морфология клеток ранней трофэктодермы, производных наивных ЭСК, и их иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к поверхностным маркерам TACSTD2 (красный) и ENPEP (красный), ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 100 мкм, (г) репрезентативное изображение бластоида, полученного путем самоагрегации наивных ЭСК (окрашены зелёным, с помощью антител к OCT4) и их трофэктодермальных производных (синий, ядра окрашены DAPI), линейка 10 мкм, (д) относительный уровень экспрессии мРНК генов (ось X) общей плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG*), наивной плюрипотентности (*TFPC2L1*, *DNMT3L*, *KLF17*) и тотипотентности (*LEUTX*, *TPRX1*, *ZSCAN4*) в культурах праймированных ЭСК (1) и наивных ЭСК, поддерживаемых в средах HENSM-LA (2), HENSM-L (3) и HENSM-0 (4).

Можно также отметить, что общие гены плюрипотентного состояния *OCT4* и *NANOG*, а также гены, характерные для состояния наивной плюрипотентности *TFPC2L1*, *DNMT3L*, имеют статистически более высокую экспрессию ($p < 0,05$), когда в среде HENSM присутствуют оба ростовых фактора LIF и ACTIVIN A. В то же время по мере удаления ростовых факторов в наивных культурах значимо возрастала ($p < 0,05$) экспрессия генов тотипотентности (*ZSCAN4*, *LEUTX*, *TPRX1*). Наивысшая экспрессия этих генов была зафиксирована в культуре HENSM-0, что может свидетельствовать о роли ростовых факторов в подавлении программы тотипотентности в наивных клетках.

Известно, что в культурах наивных ПСКч имеется небольшая субпопуляция клеток (~1–2%) с транскрипционными характеристиками, сходными с тотипотентными клетками восьмиклеточного эмбриона. *LEUTX* служит ранним маркером основной волны зиготической активации генома и выступает индикатором идентичности тотипотентных клеток (Mazid et al. 2022; Taubenschmid-Stowers and Reik 2023). Мы предположили, что рост экспрессии *LEUTX* в среде HENSM-L и HENSM-0, может быть связан с повышением в культурах доли *LEUTX*-позитивных клеток, демонстрирующих переход в состояние, подобное тотипотентному. Для проверки этого предположения проведен анализ культур методом проточной цитометрии и показано, что действительно с поэтапным удалением ростовых факторов из среды HENSM доля *LEUTX*-позитивных клеток увеличивается (рис. 24 а). Наибольшее обогащение (61 %) наблюдалось в культуре HENSM-0, что статистически подтверждает ключевую роль устранения сигналов ростовых факторов в индукции субпопуляции клеток, подобных тотипотентным, в культурах наивных ПСКч.

Наивные клетки NuES9, полученные во всех исследованных условиях, демонстрировали состояние ХаХа (две активные X-хромосомы) у 95–97% клеток. Это подтверждалось биаллельной экспрессией *HUWE1* и отсутствием в ядрах цитогенетически детектируемых областей обогащения модификацией H3K27me3 (рис. 24 б). При последующем праймировании XCI восстанавливалась в 94–97% клеток, о чём свидетельствовали моноаллельная экспрессия *HUWE1* и наличие сигналов H3K27me3, маркирующих Xi.

Для определения характера XCI (случайный или неслучайный) мы использовали пиросеквенирование кДНК, полученной из культур после повторного праймирования, анализируя SNP восьми генов X-хромосомы *IGSF1*, *INTS6L*, *CD99*, *OCRL*, *FHL1*, *MMGT1*, *ALG13*, *CDKL5*. В результате производные HENSM-LA преимущественно экспрессировали один аллель, что указывает на направленную, неслучайную XCI. Однако производные HENSM-L и HENSM-0 демонстрировали увеличение вклада альтернативного аллеля, что соответствует частичному восстановлению случайной XCI. Наибольшая доля клеток, демонстрирующих способность к случайной инактивации, наблюдалась при дифференцировке наивных клеток NuES9, культивируемых в среде HENSM-0 без ростовых факторов. Таким образом, восстановление случайной XCI коррелировало с долей *LEUTX*-положительных 8С-подобных клеток. (рис. 24 в). Таким образом, можно заключить, что переход наивных ПСК в состояние, близкое к тотипотентному, может стирать эпигенетическую память бывшей неактивной X-

хромосомы (как X_i , так и X_e) и восстанавливать способность клеток к случайной ХСИ в процессе их повторного праймирования или дифференцировки.

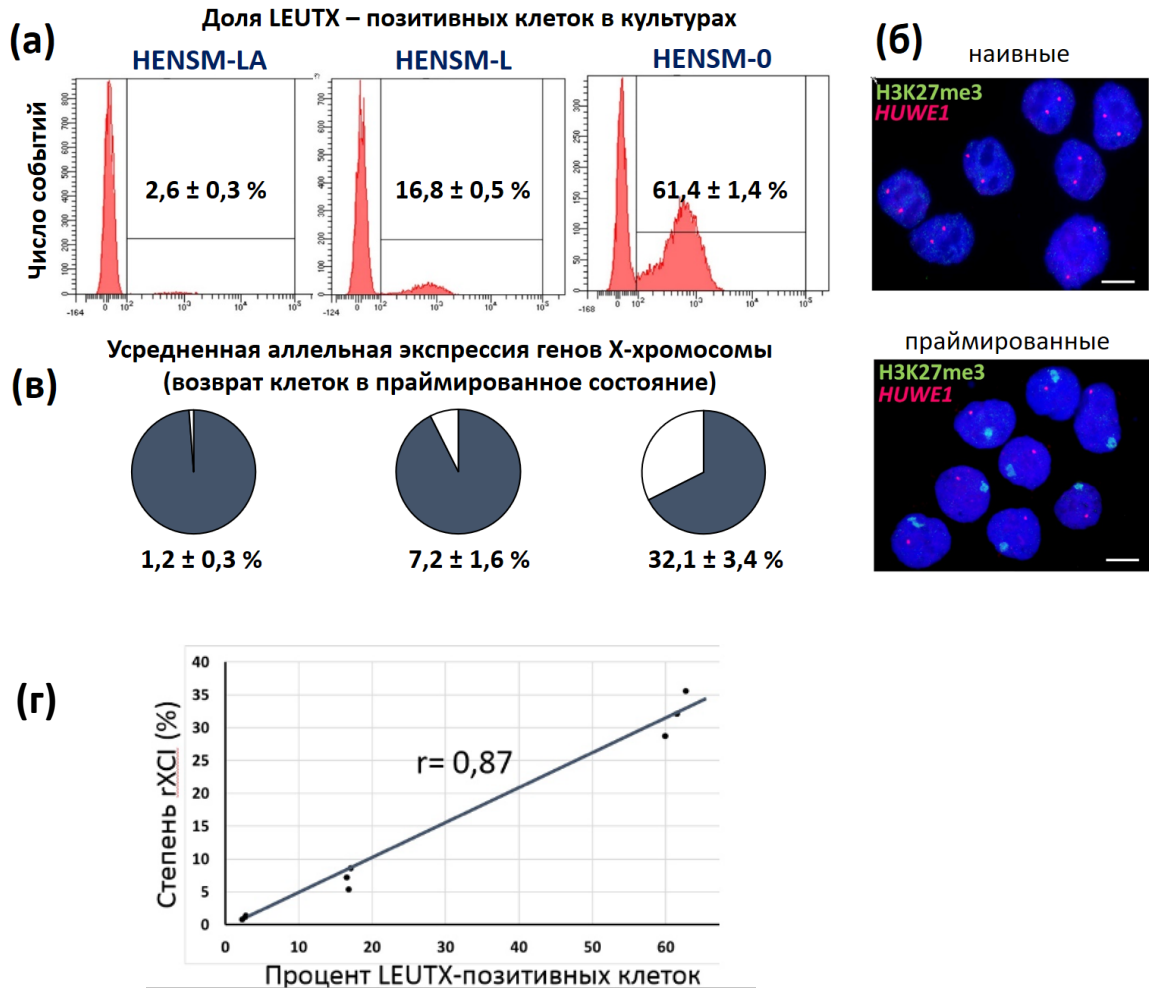


Рисунок 24. Корреляция между долей клеток с маркером тотипотентности LEUTX в культуре наивных ЭСК и их способностью воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы. (а) количественная оценка доли клеток с маркером LEUTX, культивируемых в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0 (на графиках проточной цитометрии приведена средняя величина со стандартным отклонением), (б) эпигенетический статус X-хромосом в культурах наивных и повторно праймированных ЭСК, репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания ядер ЭСК с антителами к модификации H3K27me3 (зеленый) и РНК FISH с зондом X-сцепленного гена *HUWE1* (красный); ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 10 мкм; (в) круговые диаграммы показывают соотношение экспрессии аллелей генов X-хромосом после запуска инактивации; (г) график зависимости степени случайной инактивации (ось Y) от доли клеток с маркером тотипотентности LEUTX (ось X), величина, определяющая степень случайной инактивации (гХСИ), рассчитана как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии восьми X-сцепленных генов.

Глава 4. Обсуждение

Плюрипотентные стволовые клетки человека (ПСКч) представляют собой мощный инструмент для моделирования раннего эмбриогенеза и обладают значительным потенциалом для применения в регенеративной медицине. Однако их прикладная ценность сильно зависит от точной регуляции эпигенетических особенностей, в частности, статуса X-хромосомы. В этом контексте инактивация X-хромосомы и её эрозия остаются ключевыми проблемами в исследованиях ПСКч. Эрозия X-хромосомы является одной из основных причин вариабельности ПСКч в их способности к дифференцировке и моделированию. Этот процесс проявляется утратой экспрессии *XIST* и ассоциированной с ней метки H3K27me3. Данные события сопровождаются реактивацией аллелей неактивной X-хромосомы, что приводит к нарушению компенсации дозы X-сцепленных генов и может способствовать возникновению опухолевых процессов и различных синдромов (Anguera et al. 2012; Mekhoubad et al. 2012; Motosugi et al. 2022; Patel et al. 2017; Vallot et al. 2015).

4.1 Индукция и характеристика наивной плюрипотентности в среде HENSM

В процессе получения наивных ПСКч происходит реактивация X_i , после чего клетка содержит две активные X-хромосомы, которые напоминают таковые в эпибласте до имплантации. Последующий возврат к праймированному состоянию в некоторых случаях восстанавливает способность клеток к установлению XCI (Bayerl et al. 2021; Sahakyan et al. 2017; Theunissen et al. 2016). Современные исследования в области ПСКч обусловили разработку многочисленных протоколов перевода праймированных клеток в наивное состояние и уточнение его критериев (Bredenkamp et al. 2019a; Guo et al. 2017; Szczerbinska et al. 2019; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014). В настоящее время ПСКч, культивируемые в средах NHSM или TeSR, рассматриваются как промежуточное состояние между наивным и праймированным, что объясняется наличием аномалий в регуляции X-хромосомы (Bayerl et al. 2021; Theunissen et al. 2014). В ходе ряда недавних исследований были описаны эффективные условия культивирования, которые воспроизводимо индуцируют наивное состояние, при котором транскриптомные профили клеток образуют единый кластер, сопоставимый с профилями клеток ранних бластоцист человека (Huang et al. 2014). В частности, применение среды HENSM позволяет культивировать наивные ПСКч, обеспечивает стабильность клеточных линий и воспроизводимость их фенотипических характеристик.

В настоящем исследовании был успешно реализован процесс перевода праймированных ЭСКч и ИПСКч в наивное состояние с использованием среды HENSM. Однако непосредственный перенос праймированных ПСКч в среду HENSM приводил к существенной потере жизнеспособных клеток, что препятствовало эффективному репрограммированию и получению стабильных наивных культур. Для решения данной проблемы был оптимизирован протокол индукции путем введения промежуточного этапа, включающего культивирование ПСКч в среде с ингибитором киназ семейства SRC и добавлением LIF до помещения их в условия наивной плюрипотентности. Этот промежуточный этап оказался критически важным: он обеспечил клеткам необходимую компетентность для индукции наивного состояния, минимизировал клеточную гибель и значительно повысил эффективность и воспроизводимость репрограммирования. Эффективность переходного этапа, предположительно, обусловлена его способностью перенастраивать сигнальные пути и эпигенетический ландшафт клеток, снижая предрасположенность к спонтанной дифференцировке и создавая более оптимальные условия для достижения наивной плюрипотентности. Наш оптимизированный протокол, включавший также ферментативное пассирование с использованием TgprLE, позволял стабильно получать наивные ПСКч. Эти клетки демонстрировали выраженную экспрессию маркеров плюрипотентности и значительную активацию генов, специфичных для наивного состояния. Примечательно, что полученные по нашему протоколу наивные ПСКч обладали уникальной способностью формировать трофобластные клетки и бластоиды (3D-аналоги преимплантационных бластоцист) *in vitro*, что подтверждает их высокий дифференцировочный потенциал и соответствие истинному наивному состоянию.

Считается, что наивные ПСКч обладают повышенным потенциалом дифференцировки, демонстрируя высокую способность к формированию внезародышевых, первичных половых и нейральных производных (Buckberry et al. 2023; Irie and Surani 2016; Kisa et al. 2017; Lee et al. 2017; Ozaki et al. 2022). Однако их способность к образованию эндотелиальных клеток *in vitro* оказалась ограниченной. Вероятное объяснение заключается в отсутствии ключевых транскрипционных факторов, таких как OTX2 и ZIC2/3, которые играют критическую роль в инициации гастрюляции и последующей спецификации соматических линий. Эти гены характерны для постимплантационного эпибласта — стадии развития, которая воспроизводится праймированными ПСКч (Ee et al. 2024; Di Giovannantonio et al. 2021; Hossain et al. 2024;

Warr et al. 2008), но отсутствует в наивном состоянии (Buckberry et al. 2023; Guo et al. 2017; Lee et al. 2017; Liu et al. 2017). В соответствии с этим мы показали, что повторное праймирование наивных ПСКч восстанавливает их способность дифференцироваться в эндотелиальные клетки. Таким образом, потенциал наивных ПСКч к формированию мезодермальных и эндодермальных производных оказывается ограниченным, если клетки не проходят промежуточный этап повторного праймирования.

Хромосомная нестабильность является одной из ключевых проблем в культурах наивных ПСКч. Согласно данным предыдущих исследований, наивные ПСКч, поддерживаемые в среде 5iLAF, сохраняют нормальный кариотип на протяжении первых девяти пассажей, после чего начинают обнаруживаться хромосомные аномалии (Theunissen et al. 2014). В нашем исследовании наивные ИПСКч, полученные с использованием оптимизированного протокола, сохраняли нормальный кариотип до 12 пассажа, что превышает ранее установленные показатели. Тем не менее, начиная с 15 пассажа были выявлены хромосомные аномалии. Эти результаты свидетельствуют о том, что, хотя наш подход и увеличивает период геномной стабильности, риск возникновения кариотипических нарушений сохраняется при длительном культивировании. Для обеспечения геномной целостности наивных ПСКч в исследовательских и терапевтических целях необходимы постоянный контроль и дальнейшая оптимизация условий культивирования.

4.2 Динамика X-хромосомы при переходе между наивным и праймированным состояниями: реактивация и восстановление инактивации X-хромосомы

Статус X-хромосомы в ПСКч является одним из наиболее вариабельных и методологически значимых параметров в исследованиях плюрипотентности. Праймированные ПСКч с двумя X-хромосомами часто демонстрируют эрозию ХСІ, проявляющуюся отсутствием *XIST*, потерей H3K27me3 и частичной реактивацией X-сцепленных генов. Перевод ПСКч в наивное состояние сопровождается глубокой перестройкой эпигенетических характеристик Xi и Xe и приводит к формированию двух активных X-хромосом (XaXa), на которых при полном отсутствии аккумуляции H3K27me3 в ряде случаев наблюдается биаллельная экспрессия *XIST* (Bayerl et al. 2021; Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014; Vallot et al. 2017). Это отличается от состояния преимплантационного эпибласта человека *in vivo*, где обе X-хромосомы активны, но демонстрируют обогащение H3K27me3 (Alfeghaly et al. 2024). Следовательно, наши

данные, совместно с опубликованными наблюдениями, подтверждают, что индуцированные наивные ПСКч *in vitro* лишь частично воспроизводят эпигенетические свойства раннего эпибласта человека и представляют собой метастабильное состояние, отличающееся по набору ключевых эпигенетических признаков.

В нашем исследовании мы детально охарактеризовали динамику регуляции X-хромосомы в линиях ЭСК NuES9, ESM04 и линии ИПСК K7-4Lf при переходах между праймированным, наивным и повторно праймированным состояниями. Мы использовали комплексный подход, включающий анализ транскрипции генов X-хромосомы *XIST* и *HUWE1* методом РНК FISH и детекцию их эпигенетического статуса посредством анализа модификации хроматина H3K27me3. Выбор *HUWE1* был принципиально важным: этот ген практически не реактивируется при эрозии инактивации, однако восстанавливает биаллельную экспрессию при реактивации X-хромосомы. Таким образом, мы определили, что праймированные ПСК NuES9 и K7-4Lf, демонстрирующие эрозию (отсутствие H3K27me3 и *XIST*), не претерпели полную реактивацию X-сцепленных генов. В наивных условиях обе исследованные линии демонстрировали типичные признаки реактивации X-хромосомы: биаллельную экспрессию *XIST*, биаллельную экспрессию *HUWE1*, отсутствие аккумуляции H3K27me3. Эти данные подтверждают формирование состояния демпфирования транскрипции, характерного для индуцированной наивной плюрипотентности у ПСКч. Важно подчеркнуть, что состояние демпфирования при индукции наивной плюрипотентности *in vitro* отличается от сходного состояния X-хромосом в эпибласте ранней бластоцисты человека *in vivo*. Отсутствие сигналов H3K27me3 в наших экспериментальных наивных условиях совпадает с ранее описанными данными для других линий наивных ПСКч, как эмбриональных, так и индуцированных (Theunissen et al. 2016; Theunissen et al. 2014; Vallot et al. 2015). Линии наивных ПСКч достигают полной реактивации X-хромосомы, включая биаллельную экспрессию гена *XIST*. Тем не менее, их эпигенетический профиль может различаться, что, по-видимому, отражает биологические особенности конкретного протокола индукции наивности (Sahakyan et al. 2017). Стойкое отсутствие накопления H3K27me3 может отражать прямое влияние компонентов культуральной среды. Общим и наиболее значимым фактором в этих средах является ингибитор киназы MEK, который широко используется для снижения уровня глобального метилирования ДНК и облегчения перехода клеток в наивное состояние. Этот ингибитор играет ключевую роль в индукции наивной плюрипотентности, однако его влияние на эпигенетическое состояние является широким,

многофакторным и частично неконтролируемым, что приводит в том числе к дестабилизации дифференциально метилированных регионов по всему геному (Bayerl et al. 2021; Khan et al. 2021). В настоящее время при индукции и поддержании плюрипотентности предлагается снижать его концентрацию в среде, либо полностью отказаться от его использования, в том числе в среде HENSM, заменяя его на другой компонент (Bayerl et al. 2021). Недавние исследования убедительно показали, что именно MEK-ингибирование является основным фактором, запускающим потерю геномного импринтинга при индукции и поддержании наивной плюрипотентности ПСКч (Fischer et al. 2025). Это указывает на то, что интенсивное вмешательство в ключевые сигнальные пути, необходимые для получения наивного состояния, одновременно нарушают тонкие механизмы поддержания определенных эпигенетических меток. Таким образом, отсутствие обогащения на X-хромосомах на стадии демпфирования транскрипции модификации H3K27me3 в полученных наивных ПСКч, по-видимому, может являться следствием сопутствующей широкой эпигенетической дестабилизации, связанной с применением ингибитора киназы MEK. Ранее в рамках совершенствования протоколов, направленных на получение генетически и эпигенетически стабильных наивных ПСКч, из состава сред был исключён ингибитор GSK3, активирующий сигнальный путь WNT, активность которого вносила решающий вклад в эпигенетическую и геномную нестабильность наивных линий ПСКч (Bayerl et al. 2021). Дополнительной генетической и эпигенетической стабилизации линий наивных ПСКч удалось достичь введением в культуральную среду ингибиторов пути WNT (Bayerl et al. 2021). Однако, чтобы достичь максимального соответствия между культурами наивных клеток и состоянием наивной плюрипотентности в преимплантационных бластомерах, а также для повышения генетической и эпигенетической стабильности линий наивных клеток нужна дальнейшая оптимизация сред для культивирования наивных ПСКч.

4.3 Эпигенетическая асимметрия реактивированных X-хромосом в полученных наивных ПСКч

Наивные ПСКч, полученные из праймированных ЭСК и ИПСК, демонстрируют полную реактивацию X-хромосомы: обе X-хромосомы становятся транскрипционно активными, характеризуются биаллельной экспрессией генов и отсутствием аккумуляции H3K27me3. При повторном праймировании в ряде случаев такие клетки способны вновь инициировать процесс ХСІ, тем самым воспроизводя ключевой аспект ранней

эпигенетической динамики, обеспечивающей дозовую компенсацию X-сцепленных генов. Однако, согласно ряду исследований, восстановление XCI после возвращения в праймированное состояние происходит неоднородно. Значительная часть колоний сохраняет две активные X-хромосомы при практически полной утрате экспрессии *XIST*, и лишь последующая дифференцировка приводит к запуску *XIST*-зависимого каскада инактивации (Sahakyan et al. 2017).

Особенно показательны наблюдения о том, что восстановленная инактивация после повторного праймирования и последующей дифференцировки затрагивает преимущественно ту X-хромосому, которая была инактивирована в исходных праймированных клетках. Таким образом, вопреки фундаментальному принципу инактивации X-хромосомы в раннем эмбриогенезе человека, предполагающему случайный выбор одной из двух эквивалентных X-хромосом, XCI происходит не случайно. Эти данные указывают, что эпигенетическая память как активного, так и ранее инактивированного хроматина, сохраняется даже после транскрипционной реактивации в наивных ПСКч, определяя направление выбора X-хромосомы для XCI. В частности, можно предположить, что в хроматине, который был активным до индукции наивности, сохраняются репрессивные модификации или структурные особенности, препятствующие активации промотора *XIST* (заблокирован запуск *XIST*) и, соответственно, запуску XCI. Наши результаты согласуются с этой концепцией и показывают, что эпигенетическое перепрограммирование X-хромосомы при индукции наивности не является полным. Наш анализ распределения маркера активного хроматина H3K4me2 в трёх независимых линиях ПСКч: NuES9, ESM04 и K7-4Lf – выявил устойчивую асимметрию между X-хромосомами даже после их транскрипционной реактивации. Линия NuES9 в исходном праймированном состоянии обладала одной активной X-хромосомой и одной X-хромосомой с эрозией (Xe). После индукции наивности мы наблюдали аналогичный асимметричный паттерн: одна X-хромосома демонстрировала полное распределение H3K4me2, тогда как другая – показывала распределение этой метки такое же, как было в состоянии эрозии. Это указывает, что переход в наивность не полностью устраняет эпигенетические различия между X-хромосомами. Праймированные линии ESM04 и K7-4Lf имели одну активную X-хромосому с равномерным распределением H3K4me2 и одну неактивную X-хромосому с отсутствием H3K4me2. Однако после перехода в наивность ситуация изменилась: одна X-хромосома сохранила паттерн распределения H3K4me2, характерный активной X-хромосоме, тогда как вторая X-хромосома демонстрировала лишь частичное наличие

маркера активного хроматина H3K4me2, которое соответствовало паттерну Хе, такому же, как в линии NuES9. Таким образом, бывшие Xi и Хе не активируют хроматин до состояния, эквивалентного активной X-хромосоме, сохраняя таким образом признаки неактивного хроматина. В совокупности эти результаты подчёркивают, что в состоянии наивной плюрипотентности не происходит формирования эпигенетически эквивалентных X-хромосом. Можно предполагать, что наличие эпигенетической асимметрии между X-хромосомами является причиной неслучайной XCI при повторном праймировании и дифференцировке наивных ПСКч.

4.4 Ключевая роль ингибирования SRC-киназы в контроле над инактивацией X-хромосомы в наивных ПСКч

Наивные условия культивирования ПСКч включают комплекс ингибиторов киназ и ростовых факторов, которые совместно инициируют масштабное эпигенетическое перепрограммирование. Изучение вклада каждого из этих компонентов имеет ключевое значение для оптимизации эффективности получения наивного состояния и эпигенетических характеристик получаемых клеток. Реактивация Хе и Xi наблюдается практически во всех протоколах получения наивных ПСКч, однако только три протокола 5iLA/F, FINE и HENSM обеспечивают наивным клеткам возможность запускать XCI при праймировании и дифференцировке. Мы обратили внимание, что среды, обеспечивающие способность наивных ПСКч к XCI, содержат в своём составе ингибитор киназы SRC (SRCi). Мы обнаружили, что удаление SRCi из среды HENSM приводит к формированию наивных ПСКч, которые сохраняют морфологические признаки наивности, но утрачивают способность восстанавливать инактивацию X-хромосомы после повторного праймирования и дальнейшей дифференцировки. Иными словами, отсутствие SRCi нарушает ключевую характеристику истинной наивности — эпигенетическую пластичность, необходимую для полноценного запуска XCI. Более того, добавление SRCi в индукционную среду, ранее охарактеризованную как неспособную порождать наивные клетки, компетентные к последующему восстановлению XCI (например, среда t2iLGo), полностью изменило ситуацию. В присутствии SRCi клетки, индуцированные в этих условиях, приобретали способность к запуску XCI после повторного праймирования. Эти результаты подтверждают универсальную и недооценённую роль SRC-сигналинга в эпигенетическом перепрограммировании. Таким образом, ингибирование киназы SRC является ключевым регулятором эпигенетической динамики в процессе индукции наивной

плюрипотентности. Оно обеспечивает сохранение эпигенетической пластичности, позволяя клеткам поддерживать фундаментальное свойство, способность корректно инициировать ХСІ после выхода из наивного состояния.

4.5 Восстановление ХСІ в праймированных ПСКч с эрозией: синергия ростовых факторов LIF, FGF2 и ингибитора киназы SRC

Наши наблюдения, подчёркивающие необходимость ингибирования киназы SRC на этапе индукции наивного состояния, побудили нас проверить, позволяет ли SRC-сигналинг контролировать инактивацию X-хромосомы и её нарушения (эрозию) в праймированных ПСКч. Примечательно, что введение SRCi в праймированные культуры ИПСК с эрозией неактивного состояния оказалось достаточным для повторного появления гетерохроматинового маркера неактивной X-хромосомы H3K27me3 в части клеток. Этот результат свидетельствует о том, что блокирование SRC восстанавливает присущую праймированным ПСКч, но функционально подавленную способность регулировать состояние X-хромосомы.

Ранее было показано, что путь JAK–STAT3 играет ключевую роль в поддержании наивной плюрипотентности. Активация STAT3 под действием LIF широко используется для усиления плюрипотентности. В рамках нашего исследования мы также подтвердили, что хемокин CCL2 представляет собой мощный усилитель плюрипотентности, который активирует JAK–STAT3 и индуцирует псевдогипоксический транскрипционный профиль в ПСКч в условиях атмосферной концентрации кислорода. Такой псевдогипоксический ответ напоминает физиологическое состояние раннего эпибласта человека и, как было показано ранее, способствует стабилизации плюрипотентности. Важно отметить, что CCL2 не увеличивал потенциал ПСКч к дифференцировке, однако способствовал улучшению функциональной зрелости эндотелиальных производных. После обработки ПСКч хемокином CCL2 их эндотелиальные производные демонстрировали повышенную способность к формированию капилляроподобных структур. Эти данные мотивировали нас проверить, может ли активация JAK–STAT3 давать синергетический эффект с ингибированием киназы SRC для усиления регуляции X-хромосомы в праймированных ПСКч. Для этого были разработаны оптимизированные условия культивирования: iLF (SRCi + LIF + FGF2) и iCF (SRCi + CCL2 + FGF2). В обоих случаях активация JAK–STAT3 значительно усиливала появление и стабилизацию доменов H3K27me3. Ингибирование SRC в сочетании с LIF/CCL2 и FGF2 действовало кооперативно, восстанавливая ключевой

эпигенетический признак неактивной X-хромосомы. Дополнительный анализ экспрессии *XIST* подтвердил это: культуры, демонстрирующие восстановление H3K27me₃, также характеризовались выраженной активацией *XIST*, что согласуется с восстановлением классической оси регуляции XCI, связывающей транскрипцию *XIST* с обогащением H3K27me₃.

Отслеживание динамики культур на протяжении пассажей показало, что восстановление XCI происходит через характерное промежуточное состояние, напоминающее стадию демпфирования транскрипции, описанную в преимплантационных бластомерах человека. В этот транзитный период клетки демонстрировали аккумуляцию H3K27me₃ в ядре на обеих X-хромосомах и преимущественное присутствие несплайсированных, незрелых транскриптов *XIST*. Такая картина соответствует наблюдаемому в эмбриогенезе состоянию демпфирования транскрипции X-хромосом, когда незрелый *XIST* транскрибируется, но функционально неспособен запускать полноценную инактивацию. Ранее было выдвинуто предположение, что незрелый *XIST* либо не обеспечивает корректного связывания с PRC2, либо формирует трёхмерную структуру, препятствующую взаимодействию с компонентами, запускающими XCI. Наши данные полностью согласуются с этой моделью: в условиях iLF/iCF праймированные ПСКч первоначально вступают в состояние, аналогичное демпфированию транскрипции X-хромосом, и лишь затем переходят к зрелому состоянию XCI, характеризующемуся появлением одного домена H3K27me₃ и преобладанием зрелых транскриптов *XIST*. В совокупности полученные результаты демонстрируют, что модуляция сигналинга SRC и JAK-STAT3 позволяет направленно регулировать эпигенетическую пластичность праймированных ПСКч.

Ингибирование MEK остаётся ключевым фактором успешного перепрограммирования ПСКч в наивное состояние, при этом эффективность перехода напрямую зависит от степени подавления каскада MEK. Однако наши данные выявили, что ингибирование киназы MEK приводит к нарушению эпигенетической регуляции X-хромосомы, проявляющемуся в утрате H3K27me₃ и формированию аномальных состояний. Таким образом, несмотря на фундаментальную роль ингибирования MEK киназы в инициации наивной плюрипотентности, оно одновременно повышает уязвимость X-хромосомы и способствует эпигенетической нестабильности и гетерогенности клеточных популяций. Эти результаты согласуются с недавними публикациями,

демонстрирующими вклад подавления киназы MEK в утрату импринтинга и хромосомные нарушения в ПСКч (Fischer et al. 2025).

Ингибирование сигнального пути WNT, особенно его канонического компонента, рассматривается как важная стратегия стабилизации плюрипотентного состояния, поскольку оно позволяет ослабить конкурирующие сигнальные пути, ведущие к дифференцировке. В наших экспериментах блокада WNT-пути приводила к увеличению доли клеток с двумя сигналами H3K27me3 в ядре, что указывает на поддержание конфигурации демпфирования транскрипции X-хромосомы. Однако параллельно мы наблюдали, что у клеток снижалась способность переходить от демпфирования транскрипции к стабильной ХСИ (стабильной аккумуляции H3K27me3 на одной из двух X-хромосом), что может свидетельствовать о риске вторичной эрозии X-хромосомы. Эти наблюдения подчеркивают необходимость тонкой настройки WNT-ингибирования, поскольку оно может влиять на эпигенетическую стабильность X-хромосомы.

Тем не менее открытым остается вопрос о долгосрочной устойчивости ХСИ после её восстановления в условиях iLF. Требуются дальнейшие исследования, направленные на оценку стабильности ХСИ при длительном культивировании, а также после дифференцировки, чтобы определить пределы эпигенетической пластичности, которые можно использовать для улучшения качества линий ПСКч.

4.6 ПСКч с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами способны к случайной инактивации

Процесс перехода праймированных ПСКч в наивное состояние связан с масштабными эпигенетическими изменениями генома и характеризуется появлением двух активных X-хромосом. Однако оставалось не ясно, действительно ли такой переход способен полностью стереть «эпигенетическую память» исходного состояния клеточной линии, включая стойкие различия между активной и неактивной/претерпевшей эрозию X-хромосомами. Как показали наши результаты, стандартные протоколы индукции наивности приводят к формированию ПСКч с эпигенетически неэквивалентными X-хромосомами. Ключевую роль эпигенетической асимметрии активных X-хромосом в неспособности наивных ПСКч к случайной инактивации удалось подтвердить при анализе уникального клона, производного линии ЭСКч HuES9, в котором две активные X-хромосомы имели неотличимое на цитогенетическом уровне распределение модификации H3K4me2. Наивные клетки, полученные из этого клона с эпигенетически эквивалентными

активными X-хромосомами, восстановили способность к случайной ХСИ после повторного праймирования. Это демонстрирует, что эпигенетическое состояние X-хромосом в наивных ПСКч определяющим образом влияет на дальнейший паттерн инактивации X-хромосомы. Вероятно, когда X-хромосомы уже в исходном праймированном состоянии различаются, компоненты среды лишь усиливают или закрепляют эту асимметрию, что в итоге приводит к неслучайной ХСИ.

Наши данные указывают, что при исходной эпигенетической эквивалентности обе X-хромосомы симметрично проходят перезагрузку в наивное состояние под действием компонентов индукционной среды. В результате формируется стабильное состояние ХаХа, сохраняющее способность к восстановлению случайной ХСИ при повторном праймировании. Таким образом, наши данные показывают, что способность к воспроизведению случайной ХСИ наивными ПСКч может зависеть от эпигенетической эквивалентности X-хромосом. Эти результаты подчёркивают фундаментальную роль эпигенетической памяти, которая может сохраняться даже в наивных ПСКч и определять ключевые эпигенетические события при последующей дифференцировке.

4.7 Компетентность к восстановлению случайной инактивации X-хромосомы в культурах наивных ПСКч коррелирует с долей клеток, переходящих в состояние, подобное тотипотентному

Ранее было показано, что индукция и поддержание наивной плюрипотентности в значительной степени зависят от подавления сигнальных каскадов, запускающих дифференцировку, а не от постоянного воздействия ростовых факторов (Theunissen et al. 2014). Ключевую роль в стабилизации наивного состояния играют малые молекулы — ингибиторы киназных путей, тогда как необходимость и концентрации ростовых факторов остаются предметом дискуссии. В частности, оптимизация среды t2iLGo показала, что концентрация LIF может быть существенно снижена без утраты наивного статуса клеток, а в уже установленных наивных культурах ростовые факторы могут быть частично или полностью исключены без индукции дифференцировки (Io et al. 2021a; Takashima et al. 2014; Theunissen et al. 2014). В наших экспериментах удаление ростовых факторов из среды HENSM приводило к выраженному сдвигу клеток в сторону более раннего состояния развития, что сопровождалось активацией экспрессии транскрипционных факторов, ассоциированных с тотипотентностью, включая *LEUTX*, известный как маркер стадии ZGA (Mazid et al. 2022). Таким образом, отказ от ростовых факторов в среде для индукции наивной плюрипотентности создавал условия, позволяющие клеткам

продвинуться дальше по оси в сторону состояния, подобного тотипотентному. Примечательно, что именно культуры, обогащённые клетками, подобными тотипотентным, демонстрировали значительно повышенную способность к восстановлению случайной ХСІ после дифференцировки до праймированного состояния. Эти данные указывают на прямую корреляцию между возвратом клеток в сторону состояния, подобного тотипотентному, и восстановлением эпигенетической пластичности Х-хромосом. Таким образом, продвижение клеток к состоянию, близкому к тотипотентному, по-видимому, сопровождается стиранием устойчивой эпигенетической памяти на обеих Х-хромосомах, что приводит к утрате функциональной асимметрии между ними. В результате обе Х-хромосомы становятся эквивалентными и приобретают способность с равной вероятностью инициировать экспрессию *XIST* при переходе к дифференцировке (повторному праймированию), что обеспечивает воспроизведение истинно случайного паттерна инактивации Х-хромосомы. В этом контексте представляется интересным предположить, что компетентность к случайному выбору Х-хромосомы для инактивации может формироваться уже на стадиях, близких к стадии ZGA, и лишь реализовываться при последующем запуске программы ХСІ по мере выхода клеток из этого состояния. Такая модель допускает, что решение о потенциальной Х-хромосоме-мишени для инактивации подготавливается на более раннем этапе развития. В совокупности полученные результаты показывают, что восстановление корректного, случайного паттерна ХСІ в ПСКч требует более глубокого эпигенетического сброса, чем тот, который достигается при стандартной индукции наивной плюрипотентности. Продвижение клеток в сторону тотипотентно-подобного состояния представляет собой критический этап, обеспечивающий устранение устойчивой эпигенетической памяти Х-хромосом и восстановление их способности к *de novo* выбору Х-хромосомы для ХСІ при дифференцировке.

Заключение

Плюрипотентные стволовые клетки человека представляют собой универсальную платформу для моделирования раннего развития человека и обладают значительным потенциалом в регенеративной медицине. Однако их ценность всецело зависит от возможности регулировать эпигенетические процессы ПСКч, в частности, состояние Х-хромосом. Отсутствие инактивации, её эрозия и невозможность воспроизводить случайную ХСІ остаются ключевыми проблемами эпигенетики ПСКч, так как они

напрямую влияют на дифференцировку, функциональный потенциал клеточных линий и возможности их трансляционного применения. Наше исследование показывает, что условия культивирования, сигнальные пути и стратегии трансформации между праймированным и наивным состоянием существенно влияют на статус X-хромосом, поддержание плюрипотентности и дифференцировочный потенциал ПСКч.

В этой работе был оптимизирован протокол перевода праймированных ПСКч в наивное состояние в среде HENSM. Введена переходная фаза, включающая ингибирование киназы SRC и добавление цитокина LIF, которая позволила более эффективно переводить праймированные ПСКч в наивное состояние с минимальными потерями жизнеспособности. Разработанный протокол обеспечивает получение ПСКч, обладающих ключевыми свойствами наивной плюрипотентности: высоким уровнем экспрессии маркеров плюрипотентности, увеличенной экспрессией генов, специфичных для наивного состояния, а также способностью наивных клеток формировать производные трофобласта и бластоиды.

Перевод праймированных ПСК в наивное состояние и повторное праймирование известно как способ борьбы с эрозией инактивации и используется чаще всего с протоколом 5iLAF. Уровень исправления эрозии в этой среде в среднем 88%. Среда HENSM для этих целей не использовалась, хотя заявленный процент клеток с инактивацией при повторном праймировании составляет 95%. В нашей работе мы повторили этот результат при коррекции эрозии и хотим обратить дополнительное внимание на эту среду и её возможности.

В работе показано, что переход клеток в наивное состояние сопровождается реактивацией X-хромосомы и появлением клеток с двумя транскрипционно активными X-хромосомами, демонстрирующими состояние, сходное с таковым в эпибласте до имплантации. Однако данная реактивация не приводит к полной эпигенетической эквивалентности X-хромосом, поскольку бывшая неактивная X-хромосома не восстанавливает активные модификации хроматина до паттерна активной X-хромосомы. Таким образом, реактивация X-хромосомы в наивных ПСКч носит неполный и асимметричный характер.

Анализируя компоненты среды для индукции наивного состояния, было показано, что ингибитор киназы SRC является ключевым фактором, обеспечивающим способность наивных ПСКч инициировать инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании клеток. Более того, наши результаты выявили, что ингибирование SRC в праймированных

ПСКч позволяет восстанавливать неактивное состояние X-хромосомы в условиях её эрозии. Данный процесс сопровождается восстановлением экспрессии РНК *XIST* и накоплением модификации неактивного хроматина H3K27me3. Данные о том, что запуск и перезапуск инактивации в ПСК человека зависит от ингибирования киназ SRC являются новыми и получены впервые. Более того, никому ранее не удавалось восстановить X-хромосому с эрозией до нормального неактивного состояния непосредственно в праймированных ПСКч. Эффективность коррекции эрозии в праймированных ПСК в наших экспериментах в отдельных случаях достигала 70%.

Показано, что праймированные ПСКч с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами после перевода в наивное состояние приобретают способность к случайной инактивации X-хромосомы. Также установлено, что способность к случайной ХСИ коррелирует с увеличением доли клеток, демонстрирующих переход к состоянию, подобному тотипотентному. Удаление из ростовой среды для наивных ПСКч факторов роста привело к увеличению фракции клеток, демонстрирующих переход к тотипотентности, и сопровождалось восстановлением потенциала клеток к случайной инактивации X-хромосомы. До сих пор случайную инактивацию в ПСКч пытались обеспечить путём оптимизации сред для наивных ПСКч, оставаясь в рамках контекста наивной плюрипотентности. Результаты этой работы позволили увидеть принципиально иной подход, предполагающий выход за пределы наивного плюрипотентного состояния в сторону тотипотентности. Эффективность запуска случайной инактивации после сдвига наивных ПСКч в состояние, подобное тотипотентному, составила ~ 60%. В настоящее время предложены специализированные среды для перевода наивных ПСКч в тотипотентное состояние и, возможно, их использование в дальнейшем позволит возвращать способность к случайной инактивации более эффективно.

В перспективе выявленные подходы позволят получать и поддерживать линии ПСКч с контролируемым и эпигенетически стабильным статусом X-хромосом. Полученные результаты создают основу для разработки оптимальных методов точного контроля эпигенетического состояния X-хромосом, что открывает новые возможности для фундаментальных исследований и применения ПСКч в регенеративной медицине.

Выводы

1. Культуры наивных плюрипотентных клеток HuES9, ESM04, K7-4Lf, полученные в среде HENSM, демонстрируют реактивацию генов бывшей неактивной X-хромосомы и биаллельную экспрессию гена *XIST*. При повторном переводе наивных плюрипотентных стволовых клеток в праймированное состояние в клетках восстанавливается неактивное состояние X-хромосомы.
2. В наивных плюрипотентных стволовых клетках человека 46,XX в среде HENSM бывшая неактивная X-хромосома не восстанавливает активные модификации хроматина (H3K4me2) до паттерна, эквивалентного активной X-хромосоме.
3. Ингибитор киназы SRC является ключевым фактором в среде для наивных клеток, вызывающим возобновление инактивации X-хромосомы при возврате наивных плюрипотентных стволовых клеток в праймированное состояние.
4. Сочетание ростовых факторов LIF и FGF2 совместно с ингибитором киназы SRC в праймированных плюрипотентных стволовых клетках человека позволяет восстанавливать неактивное состояние X-хромосомы в случае эрозии. При этом на неактивной X хромосоме восстанавливается экспрессия РНК *XIST* и обогащение гистоновой модификацией H3K27me3.
5. Праймированные эмбриональные стволовые клетки с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами после перевода в наивное состояние в среде HENSM способны к случайной инактивации X-хромосомы.
6. Переход культуры наивных плюрипотентных клеток человека в состояние, близкое к тотипотентному, восстанавливает способность клеток к случайной инактивации.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития ФГБУН ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН». Автор выражает признательность заведующему лабораторией эпигенетики развития Сурену Минасовичу Закияну за предоставленную возможность выполнить диссертационную работу, а также всему коллективу лаборатории эпигенетики развития за помощь и поддержку в работе и участие в обсуждении результатов.

Список литературы

1. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil. Steril. Elsevier*; 2011;95(2):520–4.
2. Alfeghaly C, Castel G, Cazottes E, Moscatelli M, Moinard E, Casanova M, et al. *XIST* dampens X chromosome activity in a SPEN-dependent manner during early human development. *Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group US New York*; 2024;31(10):1589–600.
3. An C, Feng G, Zhang J, Cao S, Wang Y, Wang N, et al. Overcoming autocrine FGF signaling-induced heterogeneity in naive human ESCs enables modeling of random X chromosome inactivation. *Cell Stem Cell. Elsevier*; 2020;27(3):482–97.
4. Anguera MC, Sadreyev R, Zhang Z, Szanto A, Payer B, Sheridan SD, et al. Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes. *Cell Stem Cell. Elsevier*; 2012;11(1):75–90.
5. Arez M, da Rocha ST. Why are imprints unstable in pluripotent stem cells? *Biochem. Soc. Trans. Portland Press Limited*; 2025;53(04):857–70.
6. Bar S, Seaton LR, Weissbein U, Eldar-Geva T, Benvenisty N. Global characterization of X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells. *Cell Rep. Elsevier*; 2019;27(1):20–9.
7. Bayerl J, Ayyash M, Shani T, Manor YS, Gafni O, Massarwa R, et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. *Cell Stem Cell. Elsevier*; 2021;28(9):1549–65.
8. Bi Y, Tu Z, Zhang Y, Yang P, Guo M, Zhu X, et al. Identification of ALPPL2 as a naive pluripotent state-specific surface protein essential for human naive pluripotency regulation. *Cell Rep. Elsevier*; 2020;30(11):3917–31.
9. Bi Y, Tu Z, Zhou J, Zhu X, Wang H, Gao S, et al. Cell fate roadmap of human primed-to-naive transition reveals preimplantation cell lineage signatures. *Nat. Commun. Nature Publishing Group UK London*; 2022;13(1):3147.
10. Blauwkamp TA, Nigam S, Ardehali R, Weissman IL, Nusse R. Endogenous Wnt signalling in human embryonic stem cells generates an equilibrium of distinct lineage-specified progenitors. *Nat. Commun. Nature Publishing Group UK London*; 2012;3(1):1070.
11. Boroviak T, Loos R, Lombard P, Okahara J, Behr R, Sasaki E, et al. Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Dev. Cell. Elsevier*; 2015;35(3):366–82.
12. Bredenkamp N, Stirparo GG, Nichols J, Smith A, Guo G. The cell-surface marker sushi containing domain 2 facilitates establishment of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports. Elsevier*; 2019a;12(6):1212–22.

13. Bredenkamp N, Yang J, Clarke J, Stirparo GG, von Meyenn F, Dietmann S, et al. Wnt inhibition facilitates RNA-mediated reprogramming of human somatic cells to naive pluripotency. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2019b;13(6):1083–98.
14. Brenes AJ, Yoshikawa H, Bensaddek D, Mirauta B, Seaton D, Hukelmann JL, et al. Erosion of human X chromosome inactivation causes major remodeling of the iPSC proteome. *Cell Rep*. Elsevier; 2021;35(4).
15. Brockdorff N, Bowness JS, Wei G. Progress toward understanding chromosome silencing by Xist RNA. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 2020;34(11–12):733–44.
16. Buckberry S, Liu X, Poppe D, Tan JP, Sun G, Chen J, et al. Transient naive reprogramming corrects hiPS cells functionally and epigenetically. *Nature*. Nature Publishing Group UK London; 2023;620(7975):863–72.
17. Buecker C, Chen H-H, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, et al. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2010;6(6):535–46.
18. Buecker C, Srinivasan R, Wu Z, Calo E, Acampora D, Faial T, et al. Reorganization of enhancer patterns in transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2014;14(6):838–53.
19. Cecalev D, Viçoso B, Galupa R. Compensation of gene dosage on the mammalian X. *Development*. The Company of Biologists Ltd; 2024;151(15):dev202891.
20. Cerase A, Pintacuda G, Tattermusch A, Avner P. Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biol*. Springer; 2015;16:1–12.
21. Chaligné R, Heard E. X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS Lett*. Elsevier; 2014;588(15):2514–22.
22. Chaligné R, Popova T, Mendoza-Parra M-A, Saleem M-AM, Gentien D, Ban K, et al. The inactive X chromosome is epigenetically unstable and transcriptionally labile in breast cancer. *Genome Res*. Cold Spring Harbor Lab; 2015;25(4):488–503.
23. Chan Y-S, Göke J, Ng J-H, Lu X, Gonzales KAU, Tan C-P, et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2013;13(6):663–75.
24. Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril*. Elsevier; 2009;91(6):2381–90.
25. Chen H, Guo R, Zhang Q, Guo H, Yang M, Wu Z, et al. Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences; 2015;112(44):E5936–43.
26. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation

- patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* Taylor & Francis; 2003;23(16):5594–605.
27. Choi HS, Kim H, Won A, Kim J-J, Son C-Y, Kim K-S, et al. Development of a decoy immunization strategy to identify cell-surface molecules expressed on undifferentiated human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* Springer; 2008;333(2):197–206.
 28. Chow JC, Hall LL, Baldry SEL, Thorogood NP, Lawrence JB, Brown CJ. Inducible *XIST*-dependent X-chromosome inactivation in human somatic cells is reversible. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* National Academy of Sciences; 2007;104(24):10104–9.
 29. Cinkornpumin JK, Kwon SY, Guo Y, Hossain I, Sirois J, Russett CS, et al. Naive human embryonic stem cells can give rise to cells with a trophoblast-like transcriptome and methylome. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2020;15(1):198–213.
 30. Cloutier M, Kumar S, Buttigieg E, Keller L, Lee B, Williams A, et al. Preventing erosion of X-chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London; 2022;13(1):2516.
 31. Collier AJ, Panula SP, Schell JP, Chovanec P, Reyes AP, Petropoulos S, et al. Comprehensive cell surface protein profiling identifies specific markers of human naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2017;20(6):874–90.
 32. Collier AJ, Rugg-Gunn PJ. Identifying human naïve pluripotent stem cells—evaluating state-specific reporter lines and cell-surface markers. *Bioessays.* Wiley Online Library; 2018;40(5):1700239.
 33. Cornacchia D, Zhang C, Zimmer B, Chung SY, Fan Y, Soliman MA, et al. Lipid deprivation induces a stable, naive-to-primed intermediate state of pluripotency in human PSCs. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2019;25(1):120–36.
 34. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *New England Journal of Medicine.* Mass Medical Soc; 2004;350(13):1353–6.
 35. Csokmay JM, Hill MJ, Cioppettini F V, Miller KA, Scott Jr RT, Frattarelli JL. Live birth sex ratios are not influenced by blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.* Elsevier; 2009;92(3):913–7.
 36. D'Antonio-Chronowska A, Donovan MKR, Greenwald WWY, Nguyen JP, Fujita K, Hashem S, et al. Association of human iPSC gene signatures and X chromosome dosage with two distinct cardiac differentiation trajectories. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2019;13(5):924–38.
 37. Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* National Academy of Sciences; 2012;109(12):4485–90.
 38. Dekel C, Morey R, Hanna J, Laurent LC, Ben-Yosef D, Amir H. Stabilization of hESCs in two distinct substates along the continuum of pluripotency. *iScience.* Elsevier; 2022;25(12).

39. Disteche CM. Dosage compensation of the sex chromosomes and autosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* Elsevier; 2016;56:9–18.
40. Dodsworth BT, Hatje K, Rostovskaya M, Flynn R, Meyer CA, Cowley SA. Profiling of naïve and primed human pluripotent stem cells reveals state-associated miRNAs. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK London; 2020;10(1):10542.
41. Dong C, Beltcheva M, Gontarz P, Zhang B, Popli P, Fischer LA, et al. Derivation of trophoblast stem cells from naïve human pluripotent stem cells. *Elife.* eLife Sciences Publications Ltd; 2020;9:e52504.
42. Dossin F, Pinheiro I, Żylicz JJ, Roensch J, Collombet S, Le Saux A, et al. SPEN integrates transcriptional and epigenetic control of X-inactivation. *Nature.* Nature Publishing Group UK London; 2020;578(7795):455–60.
43. Duggal G, Warriar S, Ghimire S, Broekaert D, Van der Jeught M, Lierman S, et al. Alternative routes to induce naive pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* Oxford University Press; 2015;33(9):2686–98.
44. Ee LS, Medina-Cano D, Uyehara CM, Schwarz C, Goetzler E, Salataj E, et al. Transcriptional remodeling by OTX2 directs specification and patterning of mammalian definitive endoderm. *bioRxiv.* 2024;
45. Factor DC, Corradin O, Zentner GE, Saiakhova A, Song L, Chenoweth JG, et al. Epigenomic comparison reveals activation of “seed” enhancers during transition from naive to primed pluripotency. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2014;14(6):854–63.
46. Fischer LA, Meyer B, Reyes M, Zemke JE, Harrison JK, Park K, et al. Tracking and mitigating imprint erasure during induction of naive human pluripotency at single-cell resolution. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2025;20(3).
47. Freland L, Beaulieu J-M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Front. Mol. Neurosci.* Frontiers Media SA; 2012;5:14.
48. Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature.* Nature Publishing Group UK London; 2013;504(7479):282–6.
49. Geens M, Chuva De Sousa Lopes SM. X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells as a model for human development: back to the drawing board? *Hum. Reprod. Update.* Oxford University Press; 2017;23(5):520–32.
50. Geens M, Seriola A, Barbé L, Santalo J, Veiga A, Dee K, et al. Female human pluripotent stem cells rapidly lose X chromosome inactivation marks and progress to a skewed methylation pattern during culture. *Mol. Hum. Reprod.* Oxford University Press; 2016;22(4):285–98.
51. Greber B, Lehrach H, Adjaye J. Control of early fate decisions in human ES cells by distinct

- states of TGF β pathway activity. *Stem Cells Dev.* SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA; 2008;17(6):1065–78.
52. Di Giovannantonio LG, Acampora D, Omodei D, Nigro V, Barba P, Barbieri E, et al. Direct repression of Nanog and Oct4 by OTX2 modulates the contribution of epiblast-derived cells to germline and somatic lineage. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 2021;148(10):dev199166.
 53. Göke J, Lu X, Chan Y-S, Ng H-H, Ly L-H, Sachs F, et al. Dynamic transcription of distinct classes of endogenous retroviral elements marks specific populations of early human embryonic cells. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2015;16(2):135–41.
 54. Goto Y, Takagi N. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 1998;125(17):3353–63.
 55. Gu M. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial cells. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Wiley Online Library; 2018;98(1):e64.
 56. Guo G, Stirparo GG, Strawbridge SE, Spindlow D, Yang J, Clarke J, et al. Human naive epiblast cells possess unrestricted lineage potential. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2021;28(6):1040–56.
 57. Guo G, von Meyenn F, Rostovskaya M, Clarke J, Dietmann S, Baker D, et al. Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 2017;144(15):2748–63.
 58. Hall LL, Byron MEG, Butler J, Becker KA, Nelson A, Amit M, et al. X-inactivation reveals epigenetic anomalies in most hESC but identifies sublines that initiate as expected. *J. Cell. Physiol.* Wiley Online Library; 2008;216(2):445–52.
 59. Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, et al. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. *The American Journal of Human Genetics.* Elsevier; 2016;99(5):1045–58.
 60. Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* National Academy of Sciences; 2010;107(20):9222–7.
 61. Hauth A, Panten J, Kneuss E, Picard C, Servant N, Rall I, et al. Escape from X inactivation is directly modulated by levels of Xist non-coding RNA. *BioRxiv.* 2024;
 62. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, et al. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group UK London; 2017;12(4):683–96.
 63. Heard E, Mongelard F, Arnaud D, Avner P. Xist yeast artificial chromosome transgenes function as

- X-inactivation centers only in multicopy arrays and not as single copies. *Mol. Cell. Biol.* Taylor & Francis; 1999;19(4):3156–66.
64. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.* Oxford University Press; 2002;20(4):329–37.
 65. Herzel L, Straube K, Neugebauer KM. Long-read sequencing of nascent RNA reveals coupling among RNA processing events. *Genome Res.* Cold Spring Harbor Lab; 2018;28(7):1008–19.
 66. Hoffman LM, Hall L, Batten JL, Young H, Pardasani D, Baetge EE, et al. X-inactivation status varies in human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* Oxford University Press; 2005;23(10):1468–78.
 67. Hossain I, Priam P, Reynoso SC, Sahni S, Zhang XX, Côté L, et al. ZIC2 and ZIC3 promote SWI/SNF recruitment to safeguard progression towards human primed pluripotency. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London; 2024;15(1):8539.
 68. Hu Z, Li H, Jiang H, Ren Y, Yu X, Qiu J, et al. Transient inhibition of mTOR in human pluripotent stem cells enables robust formation of mouse-human chimeric embryos. *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science; 2020;6(20):eaaz0298.
 69. Huang K, Maruyama T, Fan G. The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2014;15(4):410–5.
 70. Huang X, Balmer S, Lyu C, Xiang Y, Malik V, Wang H, et al. ZFP281 controls transcriptional and epigenetic changes promoting mouse pluripotent state transitions via DNMT3 and TET1. *Dev. Cell.* Elsevier; 2024;59(4):465–81.
 71. Inoue A, Jiang L, Lu F, Zhang Y. Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Lab; 2017;31(19):1927–32.
 72. Io S, Iemura Y, Takashima Y. Optimized protocol for naive human pluripotent stem cell-derived trophoblast induction. *STAR Protoc.* Elsevier; 2021a;2(4):100921.
 73. Io S, Kabata MIO, Iemura Y, Semi K, Morone N, Minagawa A, et al. Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells in vitro. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2021b;28(6):1023–39.
 74. Irie N, Surani MA. Efficient induction and isolation of human primordial germ cell-like cells from competent human pluripotent stem cells. *Germline stem cells.* Springer; 2016. p. 217–26.
 75. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group UK London; 2010;11(2):113–27.
 76. Jiapaer Z, Li G, Ye D, Bai M, Li J, Guo X, et al. LincU preserves naive pluripotency by restricting ERK activity in embryonic stem cells. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2018;11(2):395–409.

77. Johnson KR, Mallon BS, Fann YC, Chen KG. Multivariate meta-analysis reveals global transcriptomic signatures underlying distinct human naive-like pluripotent states. *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2021;16(5):e0251461.
78. Khan SA, Audergon PNCB, Payer B. X-chromosome activity in naive human pluripotent stem cells—are we there yet? *Stem Cell Investig*. 2017;4:54.
79. Khan SA, Park K, Fischer LA, Dong C, Lungjangwa T, Jimenez M, et al. Probing the signaling requirements for naive human pluripotency by high-throughput chemical screening. *Cell Rep*. Elsevier; 2021;35(11).
80. Khan SA, Theunissen TW. Modeling X-chromosome inactivation and reactivation during human development. *Curr. Opin. Genet. Dev*. Elsevier; 2023;82:102096.
81. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*. Nature Publishing Group UK London; 2017;548(7669):592–6.
82. Kim K-Y, Hysolli E, Tanaka Y, Wang B, Jung Y-W, Pan X, et al. X chromosome of female cells shows dynamic changes in status during human somatic cell reprogramming. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2014;2(6):896–909.
83. Kim S, Suh MR, Yoon HS, Lee JB, Oh SK, Moon SY, et al. Identification of developmental pluripotency associated 5 expression in human pluripotent stem cells. *Stem Cells*. Oxford University Press; 2005;23(4):458–62.
84. Kirkeby A, Main H, Carpenter M. Pluripotent stem-cell-derived therapies in clinical trial: A 2025 update. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2025;32(1):10–37.
85. Kisa F, Shiozawa S, Oda K, Yoshimatsu S, Nakamura M, Koya I, et al. Naive-like ESRRB+ iPSCs with the capacity for rapid neural differentiation. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2017;9(6):1825–38.
86. Kurek D, Neagu A, Tastemel M, Tüysüz N, Lehmann J, van de Werken HJG, et al. Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2015;4(1):114–28.
87. Lagarkova MA, Volchkov PY, Lyakisheva A V, Philonenko ES, Kiselev SL. Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines. *Cell Cycle*. Taylor & Francis; 2006;5(4):416–20.
88. Lee J-H, Laronde S, Collins TJ, Shapovalova Z, Tanasijevic B, McNicol JD, et al. Lineage-specific differentiation is influenced by state of human pluripotency. *Cell Rep*. Elsevier; 2017;19(1):20–35.
89. Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell*. Elsevier; 2010;141(5):872–83.
90. Levin-Ferreyra F, Kodali S, Cui Y, Pashos ARS, Pessina P, Brumbaugh J, et al. Transposable element activity captures human pluripotent cell states. *EMBO Rep*. 2024;26(2):329.
91. Li J, Ming Z, Yang L, Wang T, Liu G, Ma Q. Long noncoding RNA *XIST*: Mechanisms for X

- chromosome inactivation, roles in sex-biased diseases, and therapeutic opportunities. *Genes Dis.* Elsevier; 2022;9(6):1478–92.
92. Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, Murphy TL, Murphy KM. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. Oxford University Press for The Company of Biologists Limited; 2006;
 93. Linneberg-Agerholm M, Wong YF, Romero Herrera JA, Monteiro RS, Anderson KG V, Brickman JM. Naïve human pluripotent stem cells respond to Wnt, Nodal and LIF signalling to produce expandable naïve extra-embryonic endoderm. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 2019;146(24):dev180620.
 94. Liu X, Nefzger CM, Rossello FJ, Chen J, Knaupp AS, Firas J, et al. Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming. *Nat. Methods.* Nature Publishing Group US New York; 2017;14(11):1055–62.
 95. Loda A, Heard E. Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS Genet.* Public Library of Science San Francisco, CA USA; 2019;15(9):e1008333.
 96. De Los Angeles A. Safeguarding genomic imprints in naive human pluripotency. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2025;20(5).
 97. Luna M, Duke M, Copperman A, Grunfeld L, Sandler B, Barritt J. Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertil. Steril.* Elsevier; 2007;87(3):519–23.
 98. Ly T, Ahmad Y, Shlien A, Soroka D, Mills A, Emanuele MJ, et al. A proteomic chronology of gene expression through the cell cycle in human myeloid leukemia cells. *Elife.* eLife Sciences Publications Ltd; 2014;3:e01630.
 99. Maalouf WE, Mincheva MN, Campbell BK, Hardy ICW. Effects of assisted reproductive technologies on human sex ratio at birth. *Fertil. Steril.* Elsevier; 2014;101(5):1321–5.
 100. Malakhova AA, Grigor'eva E V, Pavlova S V, Malankhanova TB, Valetdinova KR, Vyatkin Y V, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.* Elsevier; 2020;48:101952.
 101. Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell.* Elsevier; 2010;143(4):527–39.
 102. Marks H, Kerstens HHD, Barakat TS, Splinter E, Dirks RAM, van Mierlo G, et al. Dynamics of gene silencing during X inactivation using allele-specific RNA-seq. *Genome Biol.* Springer; 2015;16:1–20.
 103. Martello G, Bertone P, Smith A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J.* John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK; 2013;32(19):2561–

- 74.
104. Mathieu J, Detraux D, Kuppers D, Wang Y, Cavanaugh C, Sidhu S, et al. Folliculin regulates mTORC1/2 and WNT pathways in early human pluripotency. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group UK London; 2019;10(1):632.
105. Mazid MA, Ward C, Luo Z, Liu C, Li Y, Lai Y, et al. Rolling back human pluripotent stem cells to an eight-cell embryo-like stage. *Nature.* Nature Publishing Group UK London; 2022;605(7909):315–24.
106. Mekhoubad S, Bock C, De Boer AS, Kiskinis E, Meissner A, Eggan K. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2012;10(5):595–609.
107. Mossahebi-Mohammadi M, Quan M, Zhang J-S, Li X. FGF signaling pathway: a key regulator of stem cell pluripotency. *Front. Cell Dev. Biol.* Frontiers Media SA; 2020;8:79.
108. Morey C, Rougeulle C, Ouimette J-F. Unleashing *XIST* from X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Cell Biol.* Elsevier; 2025;92:102446.
109. Motosugi N, Sugiyama A, Okada C, Otomo A, Umezawa A, Akutsu H, et al. De-erosion of X chromosome dosage compensation by the editing of *XIST* regulatory regions restores the differentiation potential in hPSCs. *Cell reports methods.* Elsevier; 2022;2(12).
110. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* Nature Publishing Group UK London; 2007;9(1):64–71.
111. Närvä E, Stubb A, Guzmán C, Blomqvist M, Balboa D, Lerche M, et al. A strong contractile actin fence and large adhesions direct human pluripotent colony morphology and adhesion. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2017;9(1):67–76.
112. Nazor KL, Altun G, Lynch C, Tran H, Harness J V, Slavin I, et al. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2012;10(5):620–34.
113. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2009;4(6):487–92.
114. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* Elsevier; 2015;26(5):533–44.
115. Nocente MC, Della Rosa M, Malcolm AA, Lister G, Savin I, Ray-Jones H, et al. Poising and connectivity of emergent human developmental enhancers in the transition from naive to primed pluripotency. *bioRxiv.* Cold Spring Harbor Laboratory; 2025;2010–25.
116. O'Brien CM, Chy HS, Zhou Q, Blumenfeld S, Lamshead JW, Liu X, et al. New monoclonal antibodies to defined cell surface proteins on human pluripotent stem cells. *Stem Cells.* Oxford

- University Press; 2017;35(3):626–40.
117. Okae H, Toh H, Sato T, Hiura H, Takahashi S, Shirane K, et al. Derivation of human trophoblast stem cells. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2018;22(1):50–63.
118. Okamoto I, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, et al. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature*. Nature Publishing Group UK London; 2011;472(7343):370–4.
119. Oldak B, Wildschutz E, Bondarenko V, Comar M-Y, Zhao C, Aguilera-Castrejon A, et al. Complete human day 14 post-implantation embryo models from naive ES cells. *Nature*. Nature Publishing Group UK London; 2023;622(7983):562–73.
120. O’Leary T, Heindryckx B, Lierman S, Van Bruggen D, Goeman JJ, Vandewoestyne M, et al. Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group US New York; 2012;30(3):278–82.
121. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* Wiley Online Library; 2015;4(3):215–66.
122. Osnato A, Brown S, Krueger C, Andrews S, Collier AJ, Nakanoh S, et al. TGF β signalling is required to maintain pluripotency of human naïve pluripotent stem cells. *Elife*. eLife Sciences Publications Ltd; 2021;10:e67259.
123. Owens DW, McLean GW, Wyke AW, Paraskeva C, Parkinson EK, Frame MC, et al. The catalytic activity of the SRC family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell–cell contacts. *Mol. Biol. Cell*. The American Society for Cell Biology; 2000;11(1):51–64.
124. Ozaki H, Suga H, Sakakibara M, Soen M, Miyake N, Miwata T, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into hypothalamic vasopressin neurons with minimal exogenous signals and partial conversion to the naive state. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK London; 2022;12(1):17381.
125. Panova A V, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Kiselev SL. Epigenetic reprogramming by naïve conditions establishes an irreversible state of partial X chromosome reactivation in female stem cells. *Oncotarget*. 2018;9(38):25136.
126. Pastor WA, Chen D, Liu W, Kim R, Sahakyan A, Lukianchikov A, et al. Naive human pluripotent cells feature a methylation landscape devoid of blastocyst or germline memory. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2016;18(3):323–9.
127. Patel A, Sabbineni H, Clarke A, Somanath PR. Novel roles of SRC in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci.* Elsevier; 2016;157:52–61.
128. Patel S, Bonora G, Sahakyan A, Kim R, Chronis C, Langerman J, et al. Human embryonic stem cells do not change their X inactivation status during differentiation. *Cell Rep.* Elsevier;

- 2017;18(1):54–67.
129. Patrat C, Ouimette J-F, Rougeulle C. X chromosome inactivation in human development. *Development*. The Company of Biologists Ltd; 2020;147(1):dev183095.
 130. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*. Nature Publishing Group UK London; 1996;379(6561):131–7.
 131. Petropoulos S, Edsgård D, Reinius B, Deng Q, Panula SP, Codeluppi S, et al. Single-cell RNA-seq reveals lineage and X chromosome dynamics in human preimplantation embryos. *Cell*. Elsevier; 2016;165(4):1012–26.
 132. Pham TXA, Panda A, Kagawa H, To SK, Ertekin C, Georgolopoulos G, et al. Modeling human extraembryonic mesoderm cells using naive pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2022;29(9):1346–65.
 133. Picton HM, Elder K, Houghton FD, Hawkhead JA, Rutherford AJ, Hogg JE, et al. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. European Society of Human Reproduction and Embryology; 2010;16(8):557–69.
 134. Pintacuda G, Wei G, Roustan C, Kirmizitas BA, Solcan N, Cerase A, et al. hnRNPK recruits PCGF3/5-PRC1 to the Xist RNA B-repeat to establish polycomb-mediated chromosomal silencing. *Mol. Cell*. Elsevier; 2017;68(5):955–69.
 135. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science; 2003;300(5616):131–5.
 136. Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2002;36(1):233–78.
 137. Podkalicka P, Stępniewski J, Mucha O, Kachamakova-Trojanowska N, Dulak J, Łoboda A. Hypoxia as a driving force of pluripotent stem cell reprogramming and differentiation to endothelial cells. *Biomolecules*. MDPI; 2020;10(12):1614.
 138. Posynick BJ, Brown CJ. Escape from X-chromosome inactivation: an evolutionary perspective. *Front. Cell Dev. Biol.* Frontiers Media SA; 2019;7:241.
 139. Prokhorovich MA, Lagar’kova MA, Shilov AG, Karamysheva T V, Kiselyov SL, Rubtsov NB. Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability. *Bull. Exp. Biol. Med.* Springer; 2007;144(1):126–9.
 140. Qian X, Kim JK, Tong W, Villa-Diaz LG, Krebsbach PH. DPPA5 supports pluripotency and reprogramming by regulating NANOG turnover. *Stem Cells*. Oxford University Press; 2016;34(3):588–600.
 141. Raposo AC, Caldas P, Jeremias J, Arez M, Mateus FC, Barbosa P, et al. Gene reactivation upon

- erosion of X chromosome inactivation in female hiPSCs is predictable yet variable and persists through differentiation. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2025;20(5).
142. Resnick R, Wong C-J, Hamm DC, Bennett SR, Skene PJ, Hake SB, et al. DUX4-induced histone variants H3. X and H3. Y mark DUX4 target genes for expression. *Cell Rep*. Elsevier; 2019;29(7):1812–20.
 143. Richart L, Picod-Chedotel M-L, Wassef M, Macario M, Aflaki S, Salvador MA, et al. *XIST* loss impairs mammary stem cell differentiation and increases tumorigenicity through Mediator hyperactivation. *Cell*. Elsevier; 2022;185(12):2164–83.
 144. Richter KS, Anderson M, Osborn BH. Selection for faster development does not bias sex ratios resulting from blastocyst embryo transfer. *Reprod. Biomed. Online*. Elsevier; 2006;12(4):460–5.
 145. Rostovskaya M. Capacitation of human naïve pluripotent stem cells. *Human Naïve Pluripotent Stem Cells*. Springer; 2022;117–31.
 146. Sahakyan A, Kim R, Chronis C, Sabri S, Bonora G, Theunissen TW, et al. Human naive pluripotent stem cells model X chromosome dampening and X inactivation. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2017;20(1):87–101.
 147. Sala D, Sacco A. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling as a potential target to treat muscle wasting diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. LWW; 2016;19(3):171–6.
 148. Sandilands E, Akbarzadeh S, Vecchione A, McEwan DG, Frame MC, Heath JK. SRC kinase modulates the activation, transport and signalling dynamics of fibroblast growth factor receptors. *The EMBO Reports*. Springer; 2007;8(12):1162–9.
 149. Schmitz DA, Wu J. Hidden totipotency in naïve human pluripotent stem cell cultures. *Life medicine*. Oxford University Press UK; 2022;1(3):250–3.
 150. Shakiba N, White CA, Lipsitz YY, Yachie-Kinoshita A, Tonge PD, Hussein SMI, et al. CD24 tracks divergent pluripotent states in mouse and human cells. *Nat. Commun*. Nature Publishing Group UK London; 2015;6(1):7329.
 151. Shang Y, Wang N, Wang H, An C, Sun W. Modeling X chromosome inactivation using t5iLA naive human pluripotent stem cells. *BMC Biol*. Springer; 2024;22(1):210.
 152. Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences; 2008;105(12):4820–5.
 153. Skakkebaek A, Bojesen A, Kristensen MK, Cohen A, Hougaard DM, Hertz JM, et al. Neuropsychology and brain morphology in Klinefelter syndrome—the impact of genetics. *Andrology*. Wiley Online Library; 2014;2(4):632–40.
 154. Song J, Janiszewski A, De Geest N, Vanheer L, Talon I, El Bakkali M, et al. X-chromosome dosage modulates multiple molecular and cellular properties of mouse pluripotent stem cells independently

- of global DNA methylation levels. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2019;12(2):333–50.
155. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 2010;24(20):2239–63.
 156. Di Stefano B, Ueda M, Sabri S, Brumbaugh J, Huebner AJ, Sahakyan A, et al. Reduced MEK inhibition preserves genomic stability in naive human embryonic stem cells. *Nat. Methods*. Nature Publishing Group US New York; 2018;15(9):732–40.
 157. Stork C, Li Z, Lin L, Zheng S. Developmental Xist induction is mediated by enhanced splicing. *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press; 2019;47(3):1532–43.
 158. Stubb A, Guzmán C, Närvä E, Aaron J, Chew T-L, Saari M, et al. Superresolution architecture of cornerstone focal adhesions in human pluripotent stem cells. *Nat. Commun*. Nature Publishing Group UK London; 2019;10(1):4756.
 159. Szczerbinska I, Gonzales KAU, Cukuroglu E, Ramli MN Bin, Lee BPG, Tan CP, et al. A chemically defined feeder-free system for the establishment and maintenance of the human naive pluripotent state. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2019;13(4):612–26.
 160. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song C-X, Han JW, Kim S, et al. Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet*. Public Library of Science San Francisco, USA; 2011;7(6):e1002154.
 161. Takagi N. Imprinted X-chromosome inactivation: enlightenment from embryos in vivo. *Semin. Cell Dev. Biol*. Elsevier; 2003; 319–29.
 162. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. Elsevier; 2007;131(5):861–72.
 163. Takahashi S, Kobayashi S, Hiratani I. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer; 2018;75:1191–203.
 164. Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficz G, Krueger F, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*. Elsevier; 2014;158(6):1254–69.
 165. Taubenschmid-Stowers J, Reik W. Human 8-cell embryo-like cells from pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev*. Elsevier; 2023;81:102066.
 166. Taubenschmid-Stowers J, Rostovskaya M, Santos F, Ljung S, Argelaguet R, Krueger F, et al. 8C-like cells capture the human zygotic genome activation program in vitro. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2022;29(3):449–59.
 167. Teklenburg G, Weimar CHE, Fauser BCJM, Macklon N, Geijsen N, Heijnen CJ, et al. Cell lineage specific distribution of H3K27 trimethylation accumulation in an in vitro model for human implantation. *PLoS One*. Public Library of Science San Francisco, USA; 2012;7(3):e32701.
 168. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. Nature Publishing

- Group UK London; 2007;448(7150):196–9.
169. Theunissen TW, Friedli M, He Y, Planet E, O’Neil RC, Markoulaki S, et al. Molecular criteria for defining the naive human pluripotent state. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2016;19(4):502–15.
 170. Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2014;15(4):471–87.
 171. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science; 1998;282(5391):1145–7.
 172. Trusler O, Huang Z, Goodwin J, Laslett AL. Cell surface markers for the identification and study of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. Elsevier; 2018;26:36–43.
 173. Tu Z, Bi Y, Zhu X, Liu W, Hu J, Wu L, et al. Modeling human pregastrulation development by 3D culture of blastoids generated from primed-to-naïve transitioning intermediates. *Protein Cell*. Oxford University Press US; 2023;14(5):337–49.
 174. Turinetto V, Giachino C. Histone variants as emerging regulators of embryonic stem cell identity. *Epigenetics*. Taylor & Francis; 2015;10(7):563–73.
 175. Valamehr B, Robinson M, Abujarour R, Rezner B, Vranceanu F, Le T, et al. Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. Elsevier; 2014;2(3):366–81.
 176. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci*. Company of Biologists; 2005;118(19):4495–509.
 177. Vallot C, Ouimette J-F, Makhoulouf M, Féraud O, Pontis J, Côme J, et al. Erosion of X chromosome inactivation in human pluripotent cells initiates with XACT coating and depends on a specific heterochromatin landscape. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2015;16(5):533–46.
 178. Vallot C, Patrat C, Collier AJ, Huret C, Casanova M, Ali TML, et al. XACT noncoding RNA competes with *XIST* in the control of X chromosome activity during human early development. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2017;20(1):102–11.
 179. Wang Y, Hussein AM, Somasundaram L, Sankar R, Detraux D, Mathieu J, et al. microRNAs regulating human and mouse naïve pluripotency. *Int. J. Mol. Sci*. MDPI; 2019;20(23):5864.
 180. Wang Y, Zhao C, Hou Z, Yang Y, Bi Y, Wang H, et al. Unique molecular events during reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) at naïve state. *Elife*. eLife Sciences Publications, Ltd; 2018;7:e29518.
 181. Ware CB, Nelson AM, Meham B, Hesson J, Zhou W, Jonlin EC, et al. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences; 2014;111(12):4484–9.

182. Warr N, Powles-Glover N, Chappell A, Robson J, Norris D, Arkell RM. *Zic2*-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Hum. Mol. Genet.* Oxford University Press; 2008;17(19):2986–96.
183. Welling M, Chen H, Muñoz J, Musheev MU, Kester L, Junker JP, et al. *DAZL* regulates *Tet1* translation in murine embryonic stem cells. *EMBO Rep.* 2015;16(7):791–802.
184. Wojdyla K, Collier AJ, Fabian C, Nisi PS, Biggins L, Oxley D, et al. Cell-surface proteomics identifies differences in signaling and adhesion protein expression between naive and primed human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* Elsevier; 2020;14(5):972–88.
185. Wutz A. Epigenetic alterations in human pluripotent stem cells: a tale of two cultures. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2012;11(1):9–15.
186. Xie P, Ouyang Q, Leng L, Hu L, Cheng D, Tan Y, et al. The dynamic changes of X chromosome inactivation during early culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* Elsevier; 2016;17(1):84–92.
187. Xu R, Li S, Wu Q, Li C, Jiang M, Guo L, et al. Stage-specific H3K9me3 occupancy ensures retrotransposon silencing in human pre-implantation embryos. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2022;29(7):1051–66.
188. Xu Z, Robitaille AM, Berndt JD, Davidson KC, Fischer KA, Mathieu J, et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* National Academy of Sciences; 2016;113(42):e6382–e90.
189. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2020;27(4):523–31.
190. Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A, Guo G. Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. *Cell Stem Cell.* Elsevier; 2021;28(6):1016–22.
191. Yeom Y Il, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, et al. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development.* The Company of Biologists Ltd; 1996;122(3):881–94.
192. Yildirim E, Kirby JE, Brown DE, Mercier FE, Sadreyev RI, Scadden DT, et al. *Xist* RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell.* Elsevier; 2013;152(4):727–42.
193. Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* Nature Publishing Group UK London; 2008;453(7194):519–23.
194. Yu B, Qi Y, Li R, Shi Q, Satpathy AT, Chang HY. B cell-specific *XIST* complex enforces X-inactivation and restrains atypical B cells. *Cell.* Elsevier; 2021a;184(7):1790–803.
195. Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L, et al. Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. *Nature.* Nature Publishing Group UK London;

- 2021b;591(7851):620–6.
196. Yu L, Wei Y, Sun H-X, Mahdi AK, Arteaga CAP, Sakurai M, et al. Derivation of intermediate pluripotent stem cells amenable to primordial germ cell specification. *Cell Stem Cell*. Elsevier; 2021c;28(3):550–67.
 197. Yu X, Liang S, Chen M, Yu H, Li R, Qu Y, et al. Recapitulating early human development with 8C-like cells. *Cell Rep*. Elsevier; 2022;39(12).
 198. Yue M, Ogawa Y. CRISPR/Cas9-mediated modulation of splicing efficiency reveals short splicing isoform of Xist RNA is sufficient to induce X-chromosome inactivation. *Nucleic Acids Res*. Oxford University Press; 2018;46(5):e26–e26.
 199. Zakharova IS, Zhiven' MK, Saaya SB, Shevchenko AI, Smirnova AM, Strunov A, et al. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts. *J. Transl. Med*. Springer; 2017;15(1):54.
 200. Zimmerlin L, Park TS, Huo JS, Verma K, Pather SR, Talbot Jr CC, et al. Tankyrase inhibition promotes a stable human naïve pluripotent state with improved functionality. *Development*. The Company of Biologists Ltd; 2016;143(23):4368–80.
 201. Zlotorynski E. X-chromosome inactivation unravelled. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. Nature Publishing Group UK London; 2015;16(6):325.
 202. Żylicz JJ, Bousard A, Žumer K, Dossin F, Mohammad E, Da Rocha ST, et al. The implication of early chromatin changes in X chromosome inactivation. *Cell*. Elsevier; 2019;176(1):182–97.