



На правах рукописи

АРССАН МХД АМИН

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

1.5.7. Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Шевченко Александр Игоревич**
кандидат биологических наук, руководитель направления научно-производственного центра медицинских изделий Акционерного Общества «Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации» Госкорпорации «Росатом», г. Москва

Официальные оппоненты: **Васильев Станислав Анатольевич**
доктор биологических наук, заместитель директора по развитию Томского НИМЦ; ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории инструментальной геномики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН, г. Томск

Омелина Евгения Сергеевна
кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клеточного деления Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю. М. Лопухина ФМБА России, г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 20__ г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <https://www.icgbio.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

Введение

Актуальность проблемы. Плюрипотентные стволовые клетки человека (ПСКч) широко используют в фундаментальной науке и медицине для исследования процессов раннего развития, моделирования заболеваний, поиска новых лекарств и разработки подходов к клеточной терапии. ПСКч в культуре 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). 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 наивные ПСКч, соответствующие ранним стадиям преимплантационного развития, и праймированные ПСКч, отражающие постимплантационные стадии эмбриогенеза.

Одной из проблем, ограничивающих применение ПСКч в биомедицине, является то, что и наивные, и праймированные культуры 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. Линии ПСКч и их дифференцированные производные очень часто имеют нарушения в 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 использовании ПСКч в биомедицинских исследованиях, а также тормозят разработку подходов при их применении 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 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 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. Работа раскрывает новые механизмы эпигенетической регуляции X-хромосомы в наивных и праймированных ПСКч. 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 результатов работы. Результаты диссертационной работы представлены на международных и российских конференциях: «Новые подходы к генетической диагностике, лечению и профилактике частых наследственных заболеваний в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре» (Сургут, 2022), «CRISPR-2023» (Новосибирск, 2023), «Wurzburg 3R Initiative WI3R» (Бюрцбург, Германия, 2024), «VI Национальный конгресс по регенеративной медицине» (Санкт-Петербург, 2024), «CRISPR-2025» (Ереван, Армения, 2025).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы (202 источника). Объём составляет 122 страницы, включая 24 рисунка и 4 таблицы.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на линиях ЭСК HuES9 (Cowan et al. 2004) и ESM04 (Lagarkova et al. 2006), а также ИПСК K6-4Lf и K7-4LF (Malakhova et al. 2020). Наивные ПСКч получали и поддерживали в среде HENSM (Bayerl et al. 2021). Инактивацию X-хромосомы индуцировали повторным переводом наивных ПСКч в праймированное состояние. Статус X-хромосом исследовали методом РНК FISH, детектируя экспрессию генов *XIST* и *HUWE1*, а также с помощью иммуноокрашивания к маркерам активного (H3K4me2) и неактивного (H3K27me3) хроматина. Аллельную экспрессию генов X-хромосомы детектировали по однонуклеотидным различиям с помощью пиросеквенирования.

Результаты

1 Получение наивных плюрипотентных стволовых клеток

Мы планировали получить культуры наивных ПСКч, поскольку состояние наивной плюрипотентности позволяет регулировать эпигенетический статус X-хромосом. Для индукции наивной плюрипотентности в линиях HuES9, ESM04 и K7-4Lf использовали базовую среду HENSM, которая включала цитокин LIF, а также ингибиторы киназ MEK, PKC, SRC и сигнального пути WNT. Полученные наивные клетки росли в виде куполообразных колоний (рис. 1 а), экспрессировали маркёры наивных плюрипотентных клеток (рис. 1 б), дифференцировались в производные трёх зародышевых листков (рис. 1 г) и трофобластные клетки, демонстрирующие маркёры ранней плацентации (рис. 1 в). В условиях низкой адгезии наивные ПСКч формировали бластоиды (3D-аналоги ранних бластоцист) (рис. 1 д), что подтверждает их высокий потенциал развития, характерный для наивной плюрипотентности. Во всех культурах, поддерживаемых в среде HENSM, отмечалась выраженная активация экспрессии транспозонов семейства LTR7Y и генов, характерных для наивного состояния.

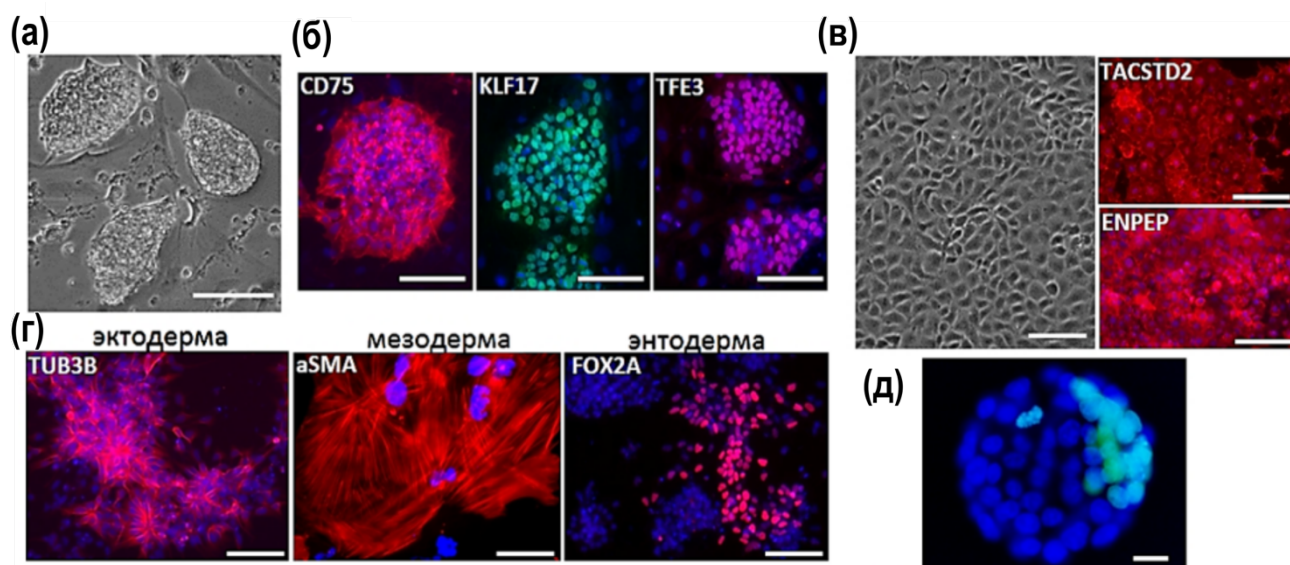


Рисунок 1. Наивные ПСКч, полученные в среде HENSM (линия ЭСК HuES9). (а) Морфология колоний. (б) Маркёры наивного состояния: CD75, KLF17, TFE3. (в) Производные трёх зародышевых листков. (г) Клетки трофэктодермы, экспрессирующие маркёры плацентации TACSTD2 и ENPEP, производные наивных ЭСКч. Линейка – 100 мкм. (д) Бластоид. ПСК окрашены антителами к OCT4 (зелёный), линейка – 10 мкм. (б – д). Ядра окрашены DAPI (синий).

2 Эпигенетический статус 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) (Disteche 2016; Patel et al. 2017). Однако в большинстве линий праймированных ПСКч инактивированное состояние X_i подвергается эрозии (X_e). Ранее способность среды HENSM эффективно регулировать

эпигенетическое состояние X-хромосом показана в единственной работе с использованием репортёрных конструкций (Bayerl et al. 2021). В этой работе, используя методы РНК FISH и иммунофлуоресценции, мы оценили эпигенетическое состояние X-хромосом в исходных праймированных линиях K7-4Lf, NuES9 и ESM04, и описали изменения, которые происходят при переходе клеток в наивное состояние в среде HENSM и при возврате из наивного состояния в праймированное (рис. 2).

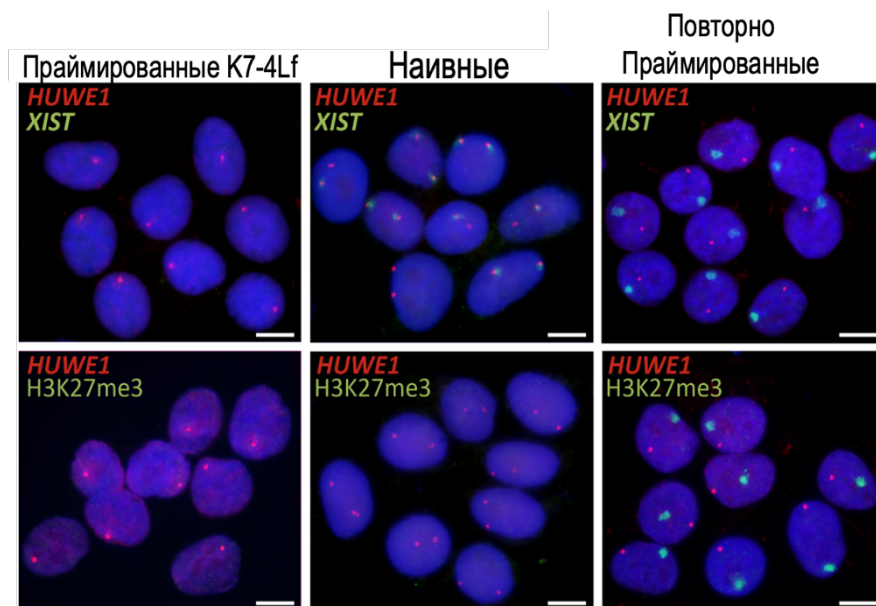


Рисунок 2. Эпигенетическое состояние X-хромосом в исходных праймированных, наивных и повторно праймированных ПСКч (на примере линии K7-4Lf), выявленное методом РНК FISH с зондами к генам *XIST* и *HUWE1*, а также иммуноокрашиванием к модификации H3K27me3. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка – 10 мкм.

Обнаружено, что в исходных праймированных ПСКч K7-4Lf и NuES9 присутствует X-хромосома с нарушениями инактивации, так как практически все ядра в культурах утратили характерную для Xi аккумуляцию РНК *XIST* и гистоновой модификации H3K27me3, являющихся основными участниками XCI (рис. 2). Линия ESM04 напротив демонстрирует стабильную инактивацию X-хромосомы. В ней практически во всех клетках детектируются сигналы РНК *XIST*, маркирующие Xi. Все исследуемые линии праймированных ПСКч обнаруживают моноаллельную экспрессию X-сцепленного гена *HUWE1*, что указывает на его транскрипцию на Xa и сохранение инактивированного состояния на Xi и Xe. Известно, что *HUWE1* практически не подвергается реактивации на Xe при эрозии, однако этот ген реактивируется в наивных ПСКч (Patel et al. 2017; Raposo et al. 2025; Vallot et al. 2015).

В наивном состоянии в среде HENSM практически все клетки в линиях K7-4Lf, NuES9 и ESM04 экспрессируют ген *HUWE1* биаллельно (рис. 2). Часть клеток (от 21 до 37%) обнаруживает биаллельную экспрессию *XIST* и отсутствие аккумуляции на X-хромосомах метки неактивного хроматина H3K27me3. Такое эпигенетическое

состояние отражает промежуточные стадии реактивации X-хромосомы, характерные для наивного плюрипотентного состояния у человека.

В повторно праймированных клетках K7-4Lf, HuES9 и ESM04, полученных из наивных ПСКч, мы наблюдали картину завершённой XCI. Она проявляется в виде одного отчётливого облака РНК *XIST* или гистоновой модификации H3K27me3, соответствующего Xi, а также одного сигнала гена *HUWE1*, расположенного отдельно и соответствующего Xa (рис. 2). Таким образом, трансформация в среде HENSM праймированных ПСКч в наивные и их повторный возврат к праймированному состоянию позволяет устранить эрозию и получать культуры с нормальной XCI.

3 Анализ распределения модификации активного хроматина H3K4me2 на метафазных X-хромосомах в праймированных и наивных ПСК человека

Известно, что инактивация X-хромосомы при повторном праймировании наивных ПСКч происходит неслучайным образом. Для выяснения причин этого явления мы изучили в линиях ПСКч K7-4Lf, HuES9 и ESM04 распределение на хромосомах гистоновой метки H3K4me2, являющейся маркером активного хроматина (рис. 3).

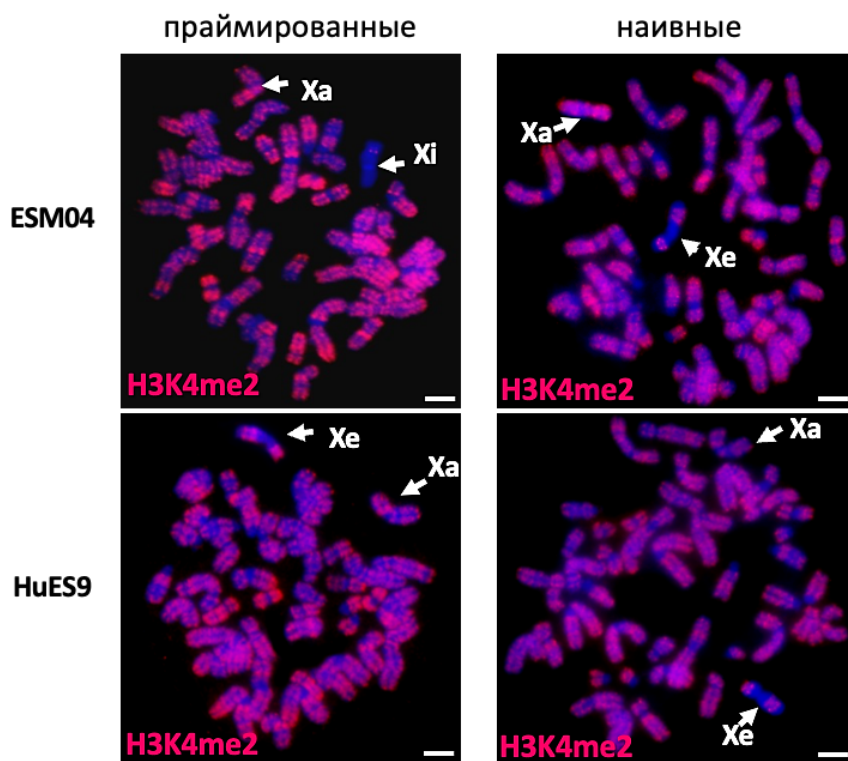


Рисунок 3.

Иммуноокрашивание метафазных хромосом ЭСКч ESM04 и HuES9 антителами к маркёру активного хроматина H3K4me2 (красный). Линейка – 10 мкм.

Xa – активная X-хромосома,
Xi – неактивная X-хромосома,
Xe – X-хромосома с эрозией.

Одна из X-хромосом во всех исследуемых праймированных линиях демонстрировала паттерн распределения H3K4me2, характерный для активной хромосомы (Xa). Другая X-хромосома в праймированных клетках K7-4Lf и ESM04 полностью лишена метки H3K4me2, что свидетельствует о преимущественно неактивном статусе хроматина X-хромосомы. Вторая X-хромосома в праймированных клетках HuES9 имела картину частичной реактивации (Xe), характерную для эрозии

XCI, которая проявлялась присутствием в некоторых районах X-хромосомы модификации активного хроматина H3K4me2 (рис. 3).

При переводе в наивное состояние клетки HuES9 сохранили паттерн распределения H3K4me2 на X-хромосоме (рис. 3), аналогичный исходной праймированной культуре. 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, обогащённых меткой H3K4me2. Очевидно, что 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. В целом ни одна из наивных клеточных линий не показала двух эпигенетически эквивалентных X-хромосом. Это позволяет предположить, что переход от праймированного к наивному состоянию, хотя и приводит к реактивации генов на X_i, однако неспособен полностью восстановить паттерн модификаций активного хроматина, характерный для X_a.

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

Из линии HuES9 получены два клона: HuES#21 и HuES#35. HuES#21 в праймированном состоянии демонстрировал наличие двух активных (X_a) X-хромосом, не отличающихся по распределению модификации активного хроматина H3K4me2 (рис. 4), тогда как клон HuES#35 имел эпигенетически неэквивалентные X-хромосомы: X_a и X_e (рис. 4). 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 (X_aX_a). Последующее повторное праймирование обеих культур привело к инактивации X-хромосомы, которая проявлялась в наличии одного ядерного сигнала H3K27me3 (X_i) и одного отдельного сигнала транскрипта гена *HUWE1* (X_a).

Чтобы выяснить, является ли восстановленная при повторном праймировании XCI случайной или неслучайной, определяли экспрессию аллелей X-хромосом по соотношению однонуклеотидных отличий, которое устанавливали методом пиросеквенирования ампликонов генов, полученных с кДНК. Клетки клона HuES#35 с неэквивалентными X-хромосомами (X_aX_e) после перевода в наивное состояние и повторного праймирования показали типичную неслучайную XCI в пользу аллелей одной из X-хромосом (рис. 4). Однако клон с изначально эквивалентными X-хромосомами (X_aX_a) после перевода в наивное состояние и повторного праймирования продемонстрировал биаллельный паттерн экспрессии, соответствующий случайной XCI. Таким образом, наивные ПСК с двумя эпигенетически эквивалентными X-хромосомами (X_aX_a) имеют способность к случайной XCI при повторном праймировании.

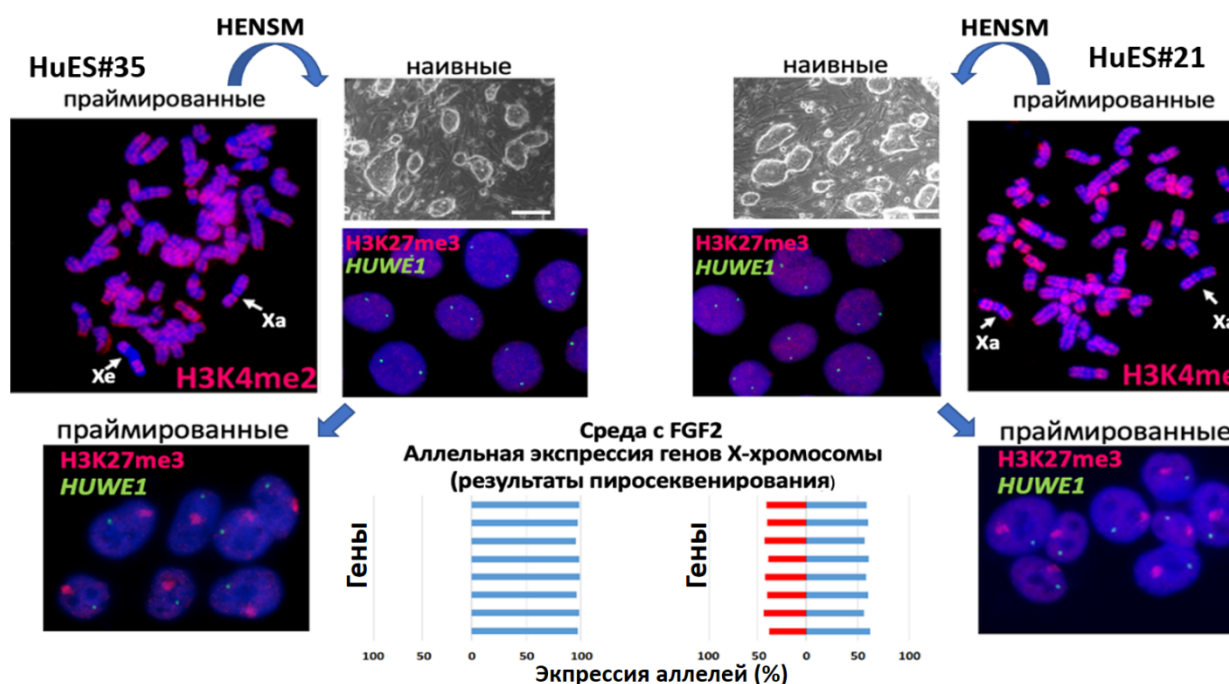


Рисунок 4. ЭСК с эпигенетически эквивалентными активными X-хромосомами способны к случайной инактивации при переходе из наивного в праймированное состояние. Показана морфология колоний в среде HENSM, иммуноокрашивание ядер на маркер Xi – H3K27me3, РНК FISH на моно/биаллельную экспрессию гена *HUWE1*. На графике аллельной экспрессии отложены частоты аллелей восьми генов (синие и красные столбцы), которые детектировались по SNP с помощью пиросеквенирования.

5 Влияние ингибитора SRC на способность наивных ПСКч к инактивации X-хромосомы

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 киназ 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. 5). Наивные клетки HuES9, полученные без SRCi, хотя и демонстрировали реактивацию *HUWE1*, полностью утратили способность запускать инактивацию X-хромосомы.

6 Влияние ингибитора SRC на эпигенетический статус X-хромосом в праймированных ПСКч

Поскольку SRCi влиял на способность наивных ПСКч запускать инактивацию X-хромосомы, мы предположили, что он также может регулировать статус X-хромосом в клетках с праймированной плюрипотентностью. Для проверки этого предположения праймированные линии ИПСК K6-4Lf и K7-4Lf культивировали в типичной для них

среде, содержащей фактор роста фибробластов FGF2, с добавлением SRCi. Исходным культурам K6-4Lf и K7-4Lf характерна эрозия ХС, проявляющаяся в утрате сигнала H3K27me3 на Xi (рис. 6 б, в). Однако после обработки SRCi в обеих линиях доля клеток, содержащих ядерные сигналы H3K27me3, статистически значимо возрастала ($p < 0,05$), при этом часть клеток демонстрировала наличие одновременно двух сигналов H3K27me3, характерных для состояния демпфирования транскрипции X-хромосом в преимплантационных эмбрионах (рис. 6 б, в). Однако более чем в половине клеток видимых изменений в эпигенетическом состоянии X-хромосом не регистрировалось.

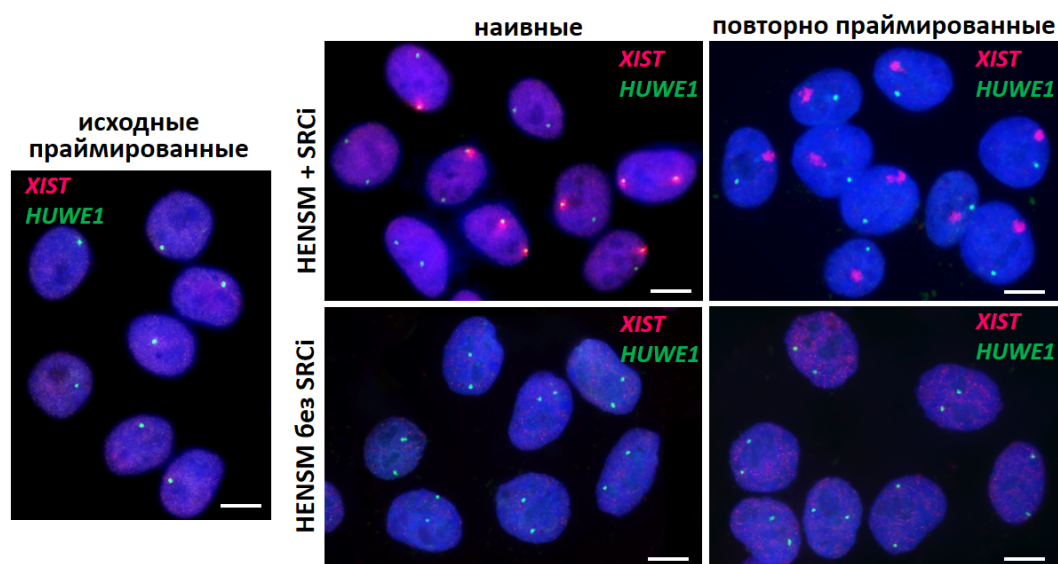


Рисунок 5. Ингибирование SRC позволяет наивным ПСКч воспроизводить инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании. Экспрессия *XIST* (красный) и *HUWE1* (зелёный) в исходных праймированных клетках линии HuES9, в наивных HuES9, полученных в среде HENSМ в присутствии SRCi и без него, а также после повторного праймирования. Ядра окрашены DAPI (синий). Линейка – 10 мкм.

В средах для культивирования наивных ПСКч наряду с ингибитором SRC в качестве незаменимых сопутствующих компонентов присутствуют ростовой фактор LIF и ингибитор киназы MEK. Они так же могут влиять на эпигенетическое состояние X-хромосом с эрозией в праймированных клетках.

Культивирование праймированных ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf в присутствии FGF2 совместно с ингибиторами SRC и MEK в течение 9 пассажей не приводило к статистически значимому изменению доли клеток с сигналом H3K27me3 (рис. 6 б). Однако сигналы H3K27me3 уменьшались в размере и становились более диффузными. Ядра с двумя дискретными сигналами H3K27me3 отсутствовали. Следовательно, ингибирование MEK в присутствии SRCi не способствует коррекции состояния эрозии ХС и нарушает распределение H3K27me3, типичное для Xi.

Кроме того, исследована среда iLF, содержащая SRCi, LIF и FGF2. Эта среда более эффективно противодействует эрозии, чем сочетание FGF2/SRCi, возвращая к пассажу 9 обогащение H3K27me3 в ядра от 75 до 93% клеток (рис. 6 б, в). 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 пассажу 9 бóльшая часть клеток имела один сигнал H3K27me3, что свидетельствовало о восстановлении нормального состояния неактивной X-хромосомы после эрозии. Тем не менее, важно отметить, что всегда оставалась доля клеток с нарушениями инактивации, которые не поддавались коррекции в праймированном состоянии.

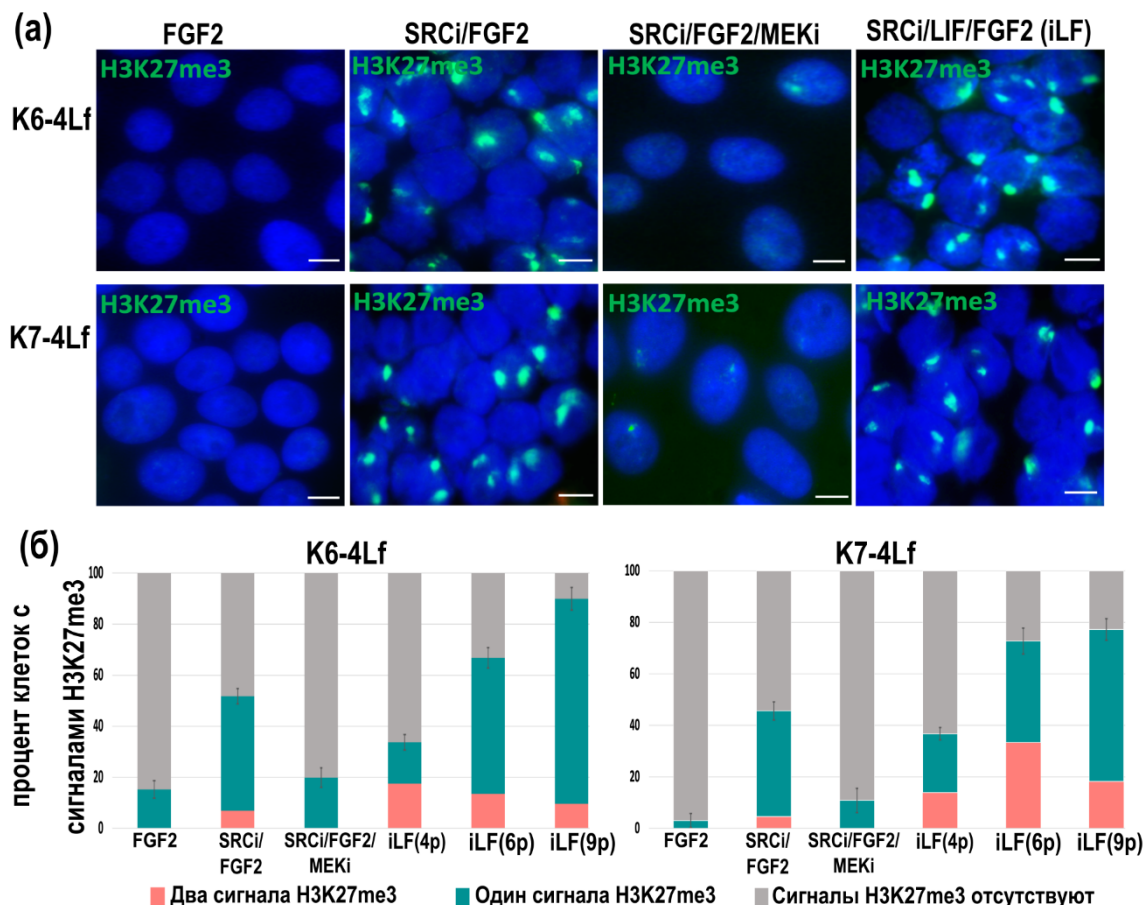


Рисунок 6. Влияние ингибитора SRC на состояние X-хромосом в культурах праймированных ИПСКч линий K6-4Lf и K7-4Lf. (а) Иммуноокрашивание ядер на модификацию хроматина H3K27me3 (зелёный). Линейка – 10 мкм. Ядра окрашены DAPI (синий). (б) Процент клеток, обнаруживающих сигнал H3K27me3. Культуры в среде iLF анализировались последовательно на пассажах 4, 6 и 9, для всех остальных комбинаций факторов детекция результатов проводилась на пассаже 9. FGF2 – исходные культуры, SRCi/FGF2, SRCi/FGF2/MEKi – культуры в средах с сочетанием соответствующих факторов. iLF – среда с SRCi, LIF, и FGF2.

Попытки вернуть в неактивное состояние X-хромосому с эрозией в праймированных ЭСК линии NuES9 не увенчались успехом. По-видимому, возврат X-хромосомы с эрозией в неактивное состояние в праймированных ПСКч возможен

только на начальных стадиях нарушения ХСІ и неосуществим на более поздних этапах. Вероятно, исправление эрозии ХСІ в данном случае возможно только через возврат клеток в наивное плюрипотентное состояние и повторное праймирование.

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

Длинная некодирующая РНК *XIST* 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 несплайсированного транскрипта *XIST* (Stork et al. 2019). В инактивации X-хромосомы участвует сплайсированный транскрипт *XIST* (Yue and Ogawa 2018).

Учитывая это, мы оценили транскрипцию *XIST* с помощью полуколичественного ПЦР и показали, что в среде iLF в K6-4Lf и K7-4Lf наблюдалась выраженная индукция *XIST*, которая следовала синхронно с постепенным увеличением доли клеток с сигналами H3K27me3 с 6 по 9 пассаж (рис. 7 а). 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.

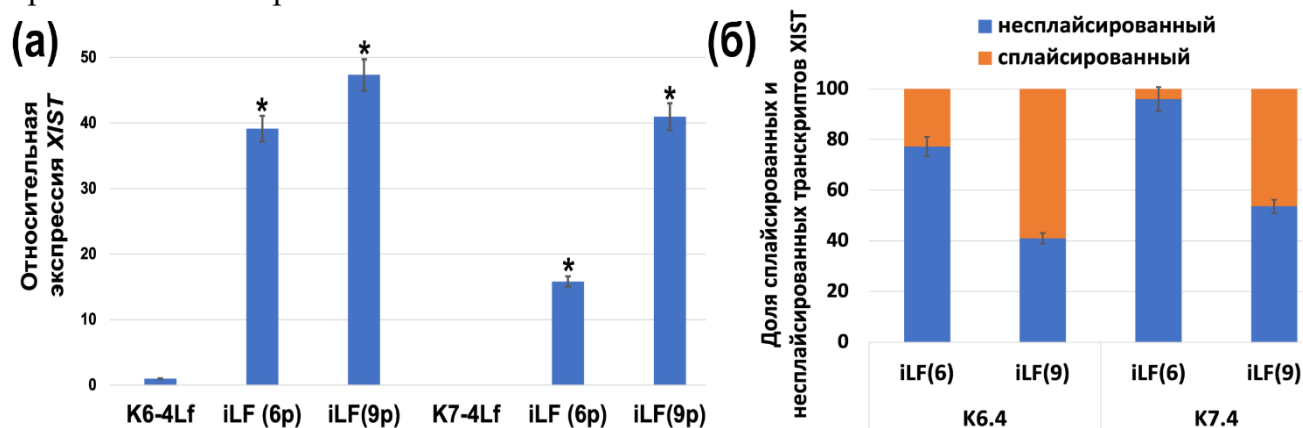


Рисунок 7. Экспрессия *XIST* в линиях ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF. (а) Относительная экспрессия *XIST* в линиях ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF на шестом и девятом пассажах. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) при сравнении исходных культур с культурами на пассажах 6 и 9 отмечены звёздочкой. (б) Доля сплайсированных и несплайсированных транскриптов *XIST* в линиях ИПСКч K6-4Lf и K7-4Lf в среде iLF на шестом и девятом пассажах.

Далее для оценки зрелых транскриптов *XIST* использовали праймеры к экзону 1, а для выявления его несплайсированных форм – к интрону 1. Экспрессия экзона 1 возрастала с пассажами и коррелировала с увеличением доли клеток с сигналами H3K27me3. Экспрессия интрона 1 также значимо повышалась, однако достигала максимума на 6-м пассаже и снижалась к 9-му. 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 K6-4Lf и до 90 % в K7-4Lf, тогда

как к 9-му пассажиру их доля снижалась примерно до 40% и 60% соответственно (рис. 7 б). Следовательно, на ранних этапах активации *XIST* преобладают несплайсированные транскрипты, а на более поздних накапливаются зрелые формы, что совпадает с переходом от наличия двух сигналов H3K27me₃, соответствующих стадии депмфирования транскрипции, к одиночным, характерным для неактивной X-хромосомы.

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

В ряде работ высказано предположение, что усиление сигнального пути JAK/STAT3 способствует регуляции эпигенетического статуса X-хромосом (An et al. 2020). Цитокин LIF является не единственным возможным индуктором сигнального каскада JAK/STAT3. Альтернативой LIF может выступать хемокин CCL2, который редко используется при культивировании ПСКч. Он способен активировать сигнальный путь JAK/STAT3 не только за счёт связывания с рецептором на мембране клетки, но и за счёт стабилизации транскрипционного фактора гипоксии HIF, который вносит дополнительный вклад в активацию каскада JAK/STAT3.

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, активацию каскада JAK/STAT3, а также зависящих от него ключевых транскрипционных факторов плюрипотентности OCT4, NANOG и TFCP2L1. Помимо этого, CCL2 увеличивал жизнеспособность и дифференцировочный потенциал культур ПСКч.

Для исследования возможностей использования хемокина CCL2 при коррекции эрозии XCI в праймированных ПСКч мы заменили LIF в среде iLF на CCL2. В условиях SRCi/CCL2/FGF2 культуры K6-4Lf и K7-4Lf сохраняли стабильность при пассировании, демонстрируя морфологию, типичную для плюрипотентных клеток. 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. Эти результаты показывают, что путь JAK–STAT3 наряду с ингибитором SRC участвует в эпигенетической регуляции X-хромосомы в ПСКч с праймированной плюрипотентностью. Однако использование цитокина LIF в сочетании с ингибитором SRC более эффективно восстанавливает эрозию и более стабильно поддерживает неактивное состояние X-хромосомы после восстановления нарушений XCI, чем аналогичная среда с CCL2.

9 Исключение факторов роста из среды HENSM обогащает культуру ПСКч клетками, подобными тотипотентным, и возвращает способность к случайной инактивации X-хромосомы

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, например, в среде t2iLGo (Bayerl et al. 2021; Io et al. 2021a). 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).

Анализ культур NuES9, поддерживаемых в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0, методом полуколичественного ОТ-ПЦР показал, что они имели повышенную экспрессию генов транскрипционных факторов *TFCP2L1*, *DNMT3L* и *KLF17*. Можно также отметить, что общие гены плюрипотентного состояния *OCT4* и *NANOG*, а также гены, характерные для состояния наивной плюрипотентности *TFCP2L1*, *DNMT3L*, имеют статистически более высокую экспрессию, 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 экспрессия генов тотипотентности (*ZSCAN4*, *LEUTX*, *TPRX1*). Наивысшая экспрессия этих генов была зафиксирована в культуре HENSM-0, не содержащей ростовых факторов.

Известно, что в культурах наивных ПСКч имеется небольшая субпопуляция клеток (~1–2%) с характеристиками транскриптома, сходными с тотипотентными клетками восьмиклеточного эмбриона, маркером которых служит экспрессия *LEUTX* (Mazid et al. 2022; Taubenschmid-Stowers and Reik 2023). Мы предположили, что рост экспрессии *LEUTX* в средах HENSM-L и HENSM-0 связан с повышением в культурах доли LEUTX-позитивных клеток, демонстрирующих переход в состояние, подобное тотипотентному. Для проверки этого предположения культуры проанализировали методом проточной цитометрии и показали, что при удалении ростовых факторов из среды HENSM доля LEUTX-позитивных клеток увеличивается (рис. 8 а).

Культуры NuES9, полученные во всех трех вариантах среды HENSM, демонстрировали две активные X-хромосомы у 95–97% клеток (рис. 8 б). При последующем праймировании ХСІ восстанавливалась в 94–97%.

Для определения характера ХСІ мы использовали ампликоны кДНК, полученной из культур после повторного праймирования, анализируя межallelные отличия восьми генов X-хромосомы. Производные HENSM-LA преимущественно

экспрессировали аллели только одной X-хромосомы, что указывает на неслучайную XCI. Однако производные HENSM-L и HENSM-0 показывали увеличение вклада второго аллеля, что соответствует частичному восстановлению случайной XCI. Наибольшая доля клеток, демонстрирующих способность к случайной инактивации, наблюдалась при дифференцировке клеток NuES9, культивируемых в среде HENSM-0 без ростовых факторов. Таким образом, восстановление случайной XCI коррелировало с долей *LEUTX*-положительных клеток, демонстрирующих переход к тотипотентному состоянию (рис. 8 в). Следовательно, 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 XCI в процессе их повторного праймирования или дифференцировки.

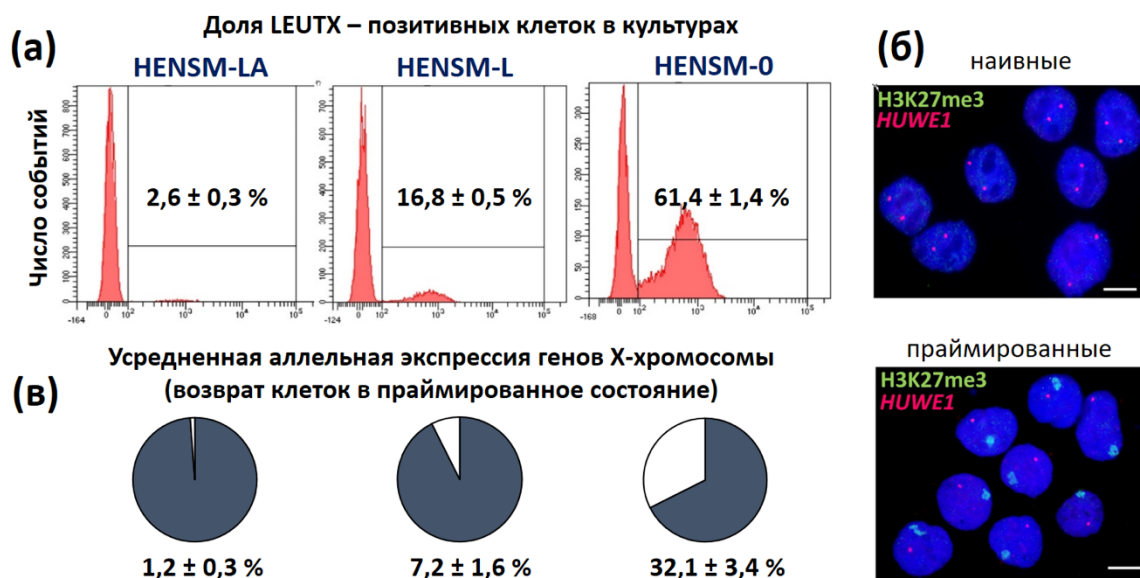


Рисунок 8. Способность к случайной инактивации X-хромосомы зависит от доли клеток в культуре, демонстрирующих переход к тотипотентному состоянию. (а) Содержание клеток с маркером LEUTX в средах HENSM-LA, HENSM-L и HENSM-0. На графиках проточной цитометрии приведена средняя величина со стандартным отклонением. (б) Эпигенетический статус X-хромосом в культурах наивных и повторно праймированных ЭСК. Иммуноокрашивание ядер ЭСК с антителами к модификации H3K27me3 (зелёный) и РНК FISH с зондом гена *HUWE1* (красный); ядра окрашены DAPI (синий), линейка – 10 мкм. (в) Круговые диаграммы показывают соотношение экспрессии аллелей генов X-хромосом после запуска инактивации. Усреднённая аллельная экспрессия генов рассчитана как среднее арифметическое долей аллельной экспрессии восьми X-сцепленных генов.

Обсуждение

В диссертационной работе показано, что переход ПСКч из праймированного в наивное состояние сопровождается реактивацией неактивной X-хромосомы и появлением клеток с двумя транскрипционно активными X-хромосомами. 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. Такая эпигенетическая асимметрия между X-хромосомами, вероятно, может являться причиной неслучайной XCI при повторном праймировании и дифференцировке наивных ПСКч.

Мы показали, что ингибитор SRC является ключевым фактором, обеспечивающим способность наивных ПСКч инициировать инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании клеток. Можно предположить, что добавление SRCi к любой из наивных сред, в которой он отсутствует, позволит получать наивные ПСКч, способные при праймировании и дифференцировке воспроизводить процесс инактивации X-хромосомы. Кроме того, мы выявили, что ингибирование SRC в праймированных ПСКч позволяет восстанавливать неактивное состояние X-хромосомы при эрозии. Данный процесс сопровождается восстановлением экспрессии РНК *XIST* и накоплением модификации неактивного хроматина H3K27me3. Наибольшую способность корректировать эрозию демонстрировало сочетание ингибитора SRC с цитокином LIF и ростовым фактором FGF2. Интересно, 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, когда незрелый *XIST* транскрибируется, но функционально неспособен запускать полноценную инактивацию.

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 XCI коррелирует с увеличением доли клеток, демонстрирующих переход к состоянию, подобному тотипотентному, что, по-видимому, сопровождается стиранием устойчивой эпигенетической памяти на обеих X-хромосомах и приводит к утрате функциональной асимметрии между ними. В результате обе X-хромосомы приобретают способность с равной вероятностью инициировать инактивацию X-хромосомы. Это позволяет предположить, что компетентность к случайному выбору X-хромосомы для инактивации может формироваться на стадиях, близких к зиготической активации генома.

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 с кариотипом 46,XX в среде HENSM бывшая неактивная X-хромосома не восстанавливает активные модификации хроматина (H3K4me2) до паттерна, эквивалентного активной X-хромосоме.
3. Ингибитор киназ 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 киназ 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.

Список основных публикаций по теме диссертационной работы

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.