



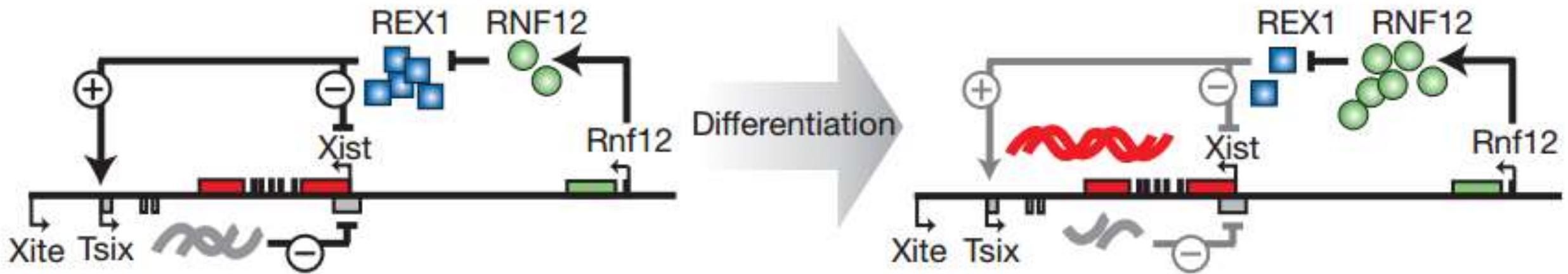
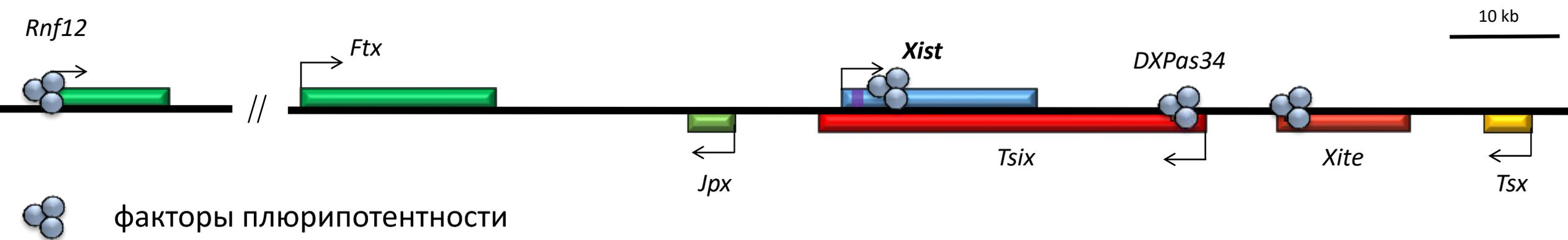
*Исследование процесса инактивации X-
хромосомы на модели гибридных клеток,
полученных слиянием эмбриональных
стволовых клеток и фибробластов*

Петрова Кристина Олеговна

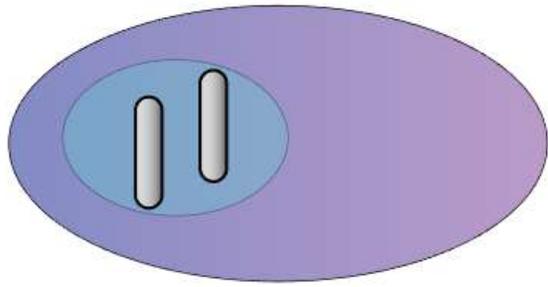
Научный руководитель: к.б.н., зав. лаб., **Баттулин Н.Р.**

Новосибирск, 2018

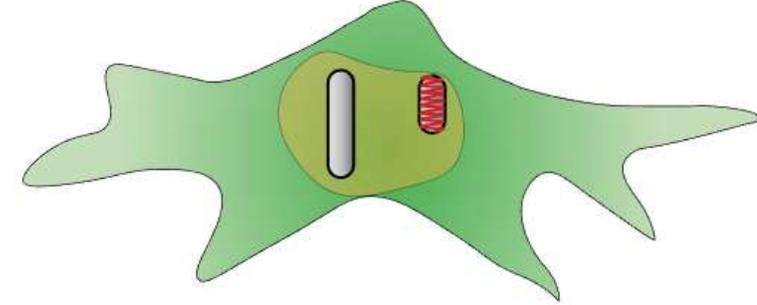
Центр инактивации X-хромосомы



Эпигенетические маркёры инактивированной X-хромосомы



Дифференцировка



Факторы плюрипотентности

Rnf12



Моноаллельная экспрессия *Xist*



Потеря меток активного хроматина



Рекрутирование PRC1/2



Приобретение меток неактивного хроматина



Сайленсинг генов на X-хромосоме



Поздняя репликация X-хромосомы



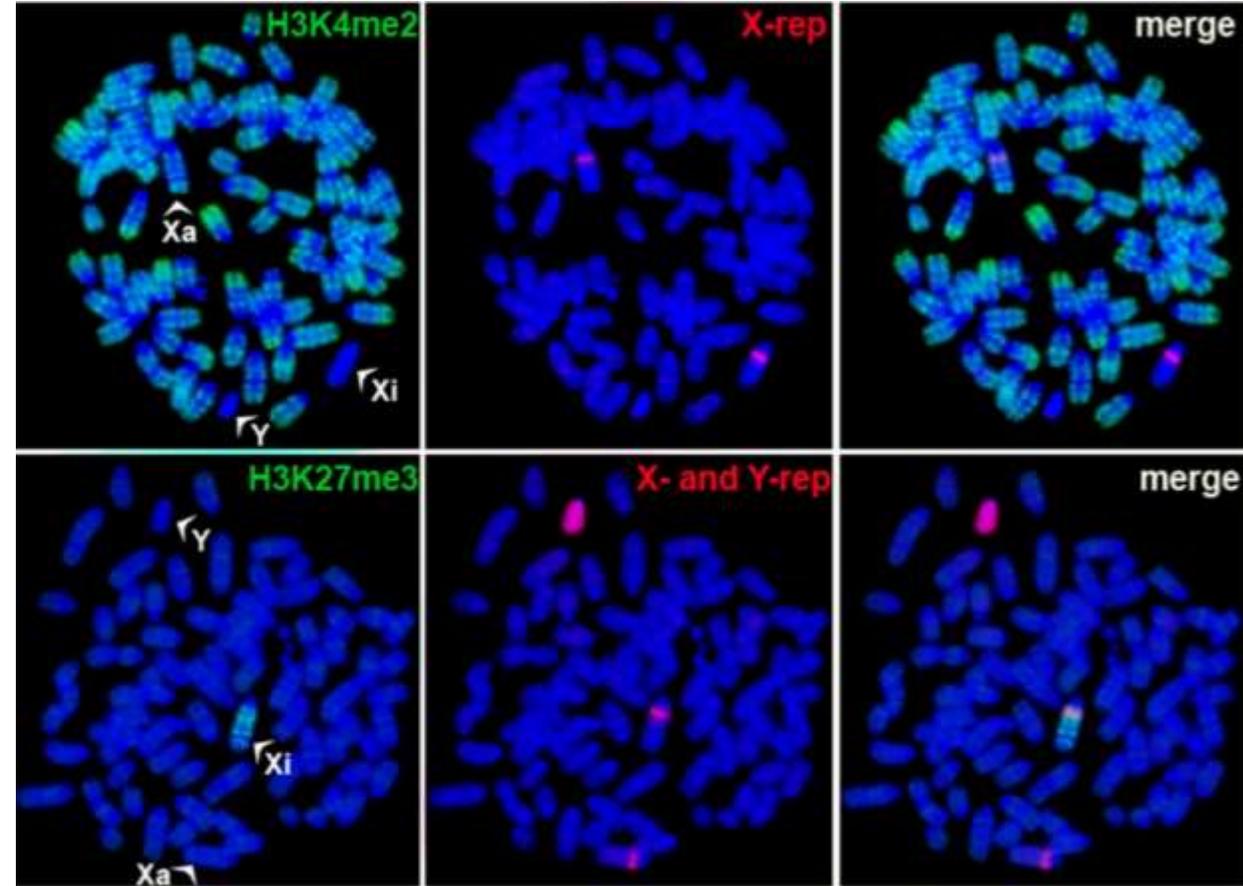
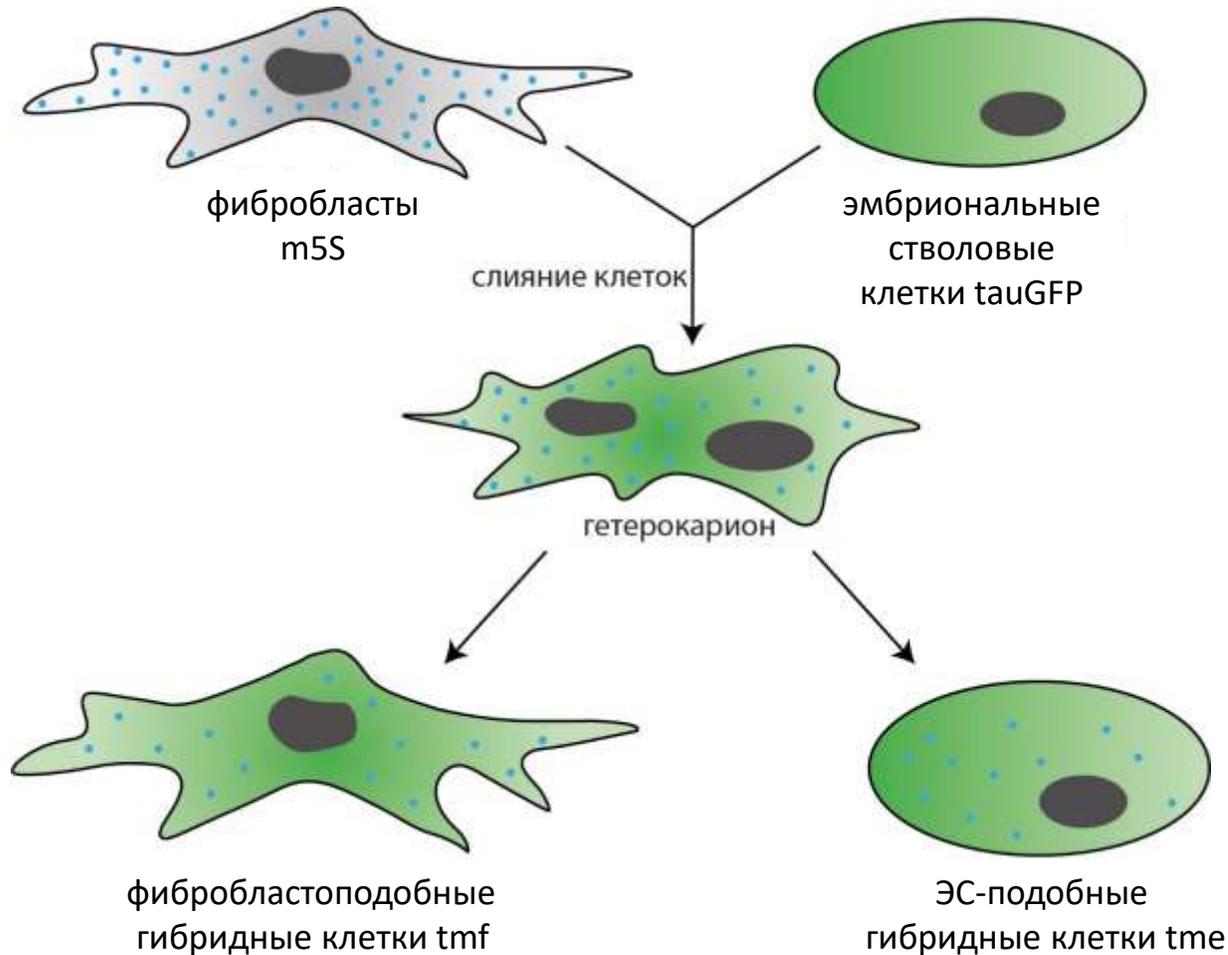
Включение гистона макроH2A



Метилирование CpG-островков

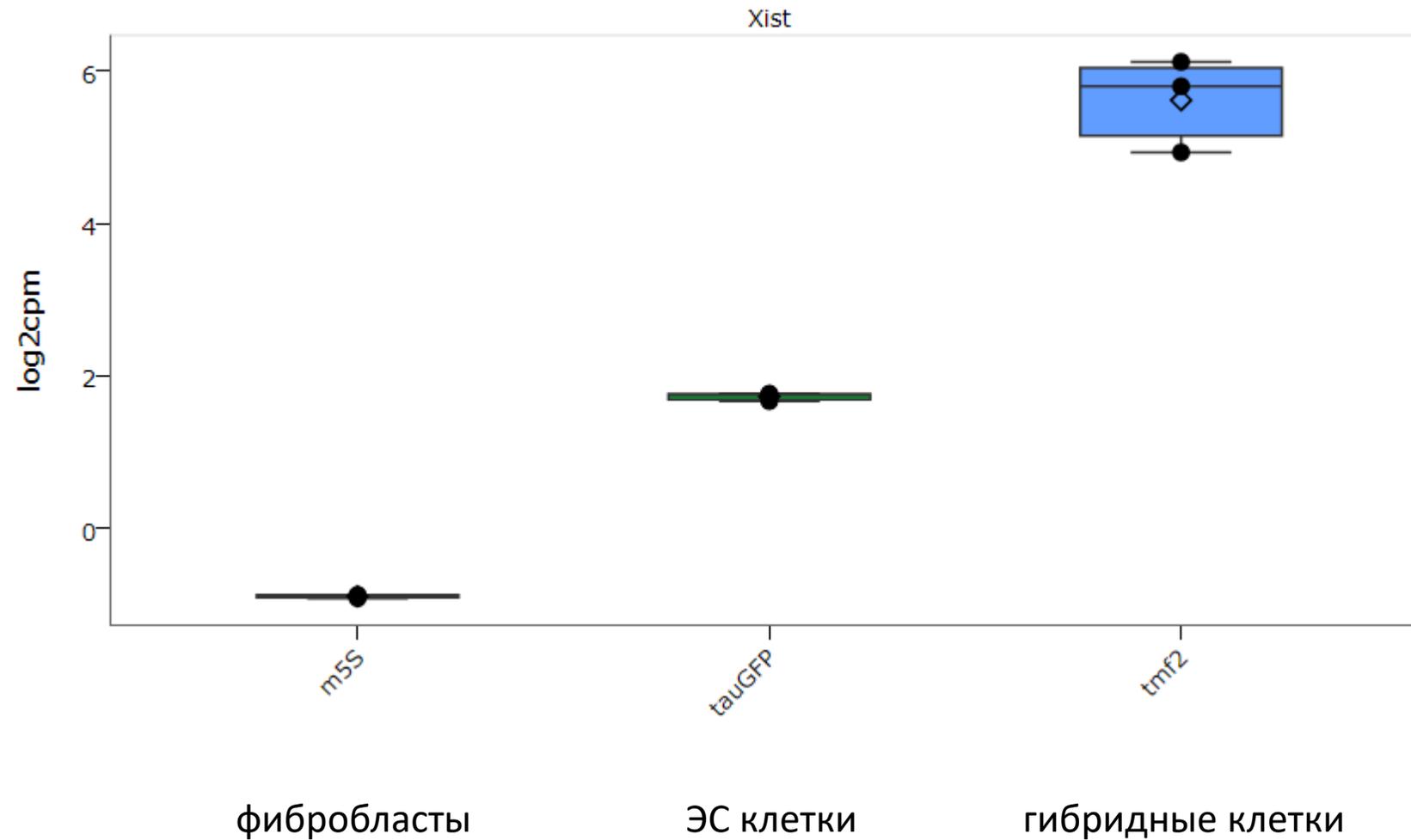


Слияние клеток



Иммунофлуоресцентное окрашивание препарата метафазных хромосом фибробластоподобных гибридных клеток

Экспрессия *Xist* в фибробластоподобных гибридах tmf2



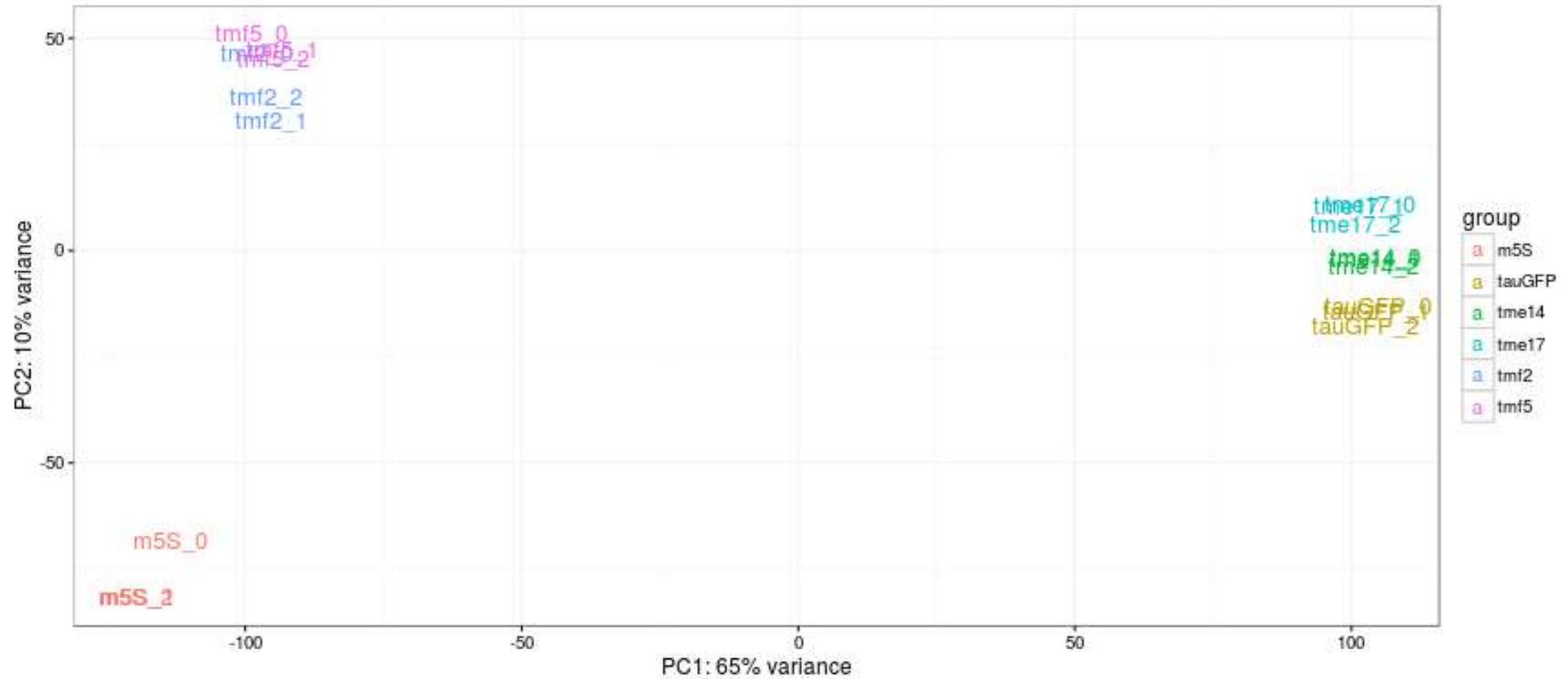
Цель исследования:

выявление причин нарушения процесса инактивации X-хромосомы в гибридных клетках, полученных слиянием эмбриональных стволовых клеток и фибробластов

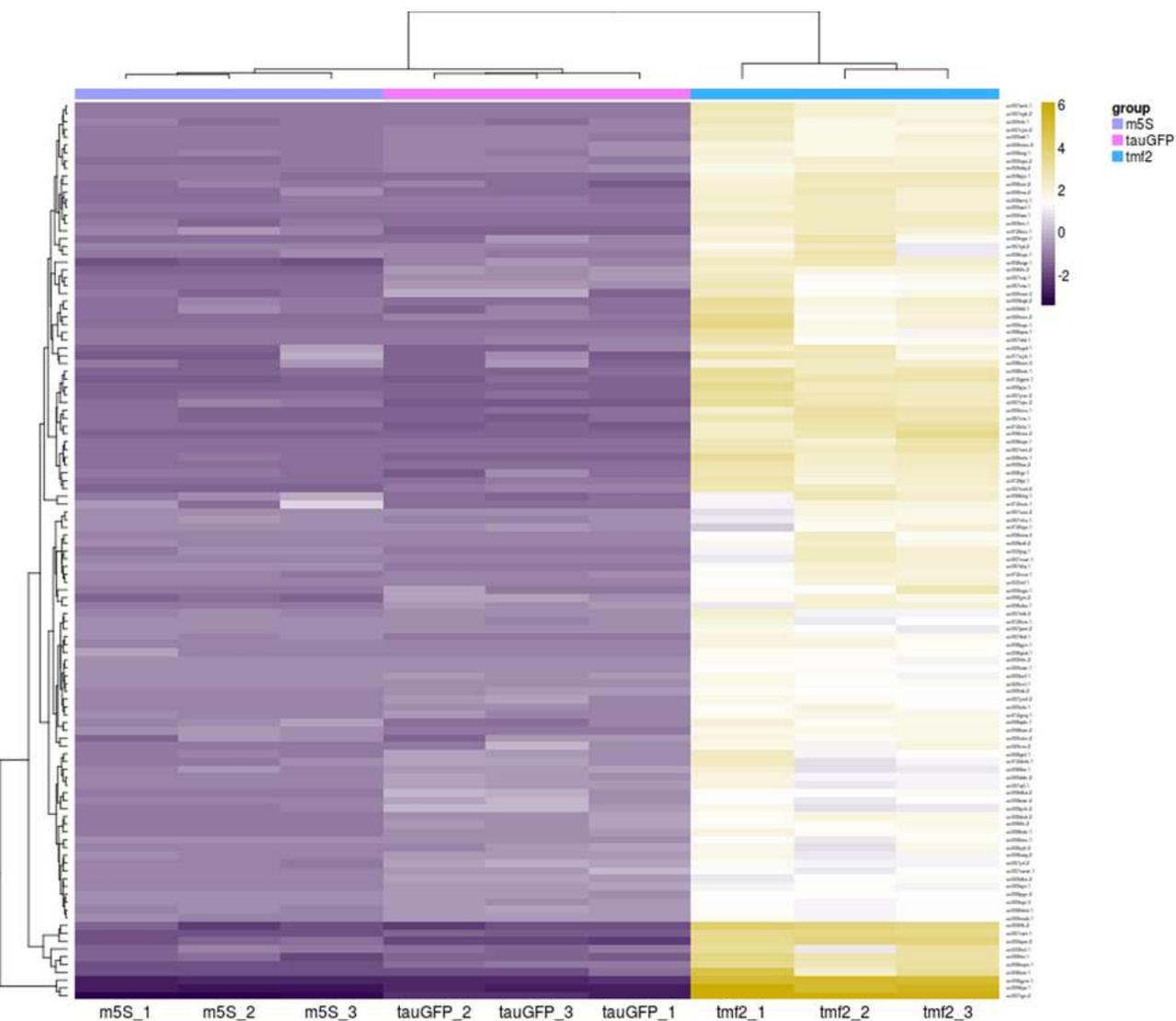
Задачи:

1. сравнение транскриптомов фибробластов и фибробластоподобных гибридных клеток;
2. выявление причин активации *Xist* в XY ЭС клетках после добавления повреждающих агентов;
3. получение ЭС клеток с маркированной РНК *Xist* для определения происхождения неактивной X-хромосомы в фибробластоподобных гибридных клетках.

Сравнение транскриптомов фибробластов m5S и фибробластоподобных гибридных клеток



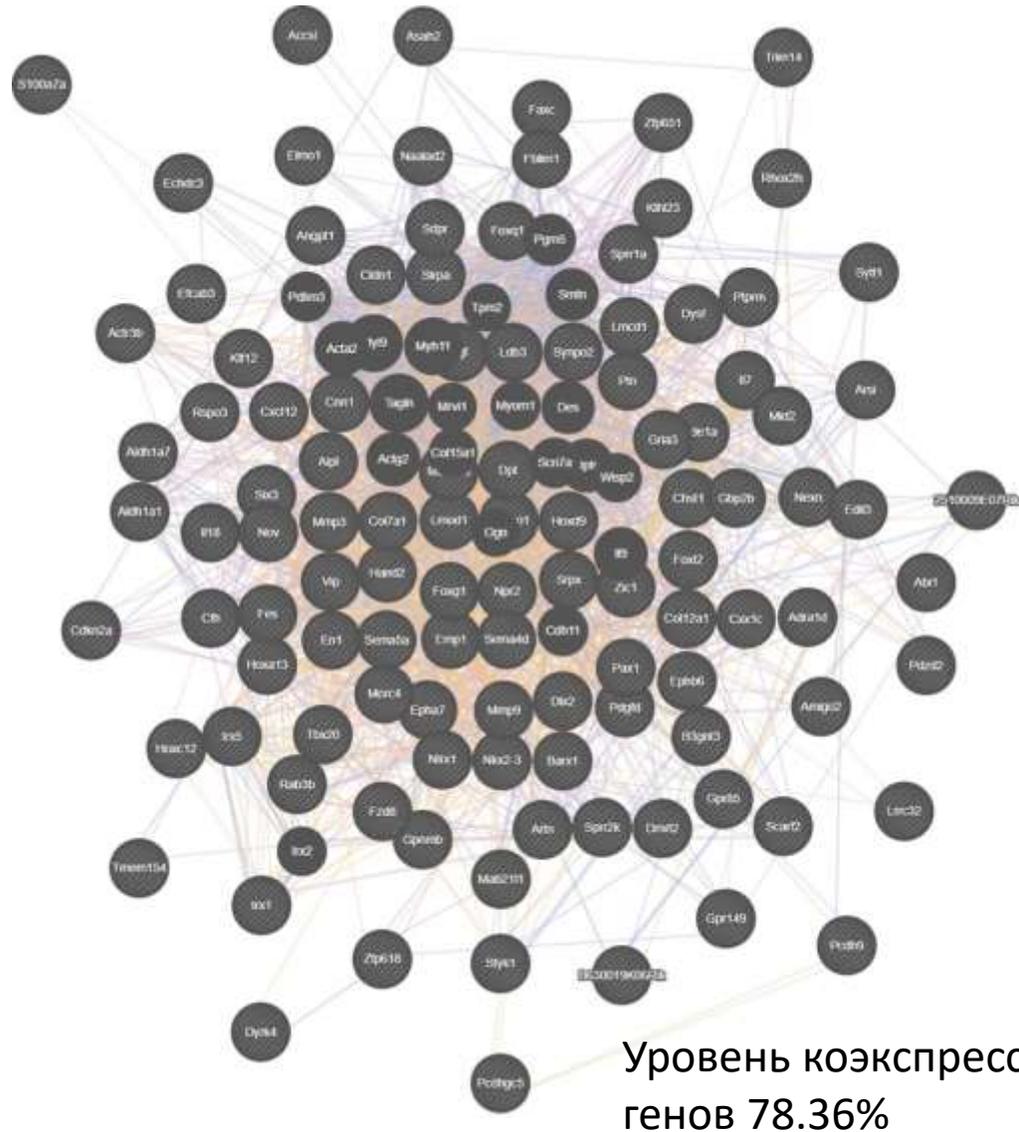
Сравнение транскриптомов фибробластов m5S и фибробластоподобных гибридных клеток



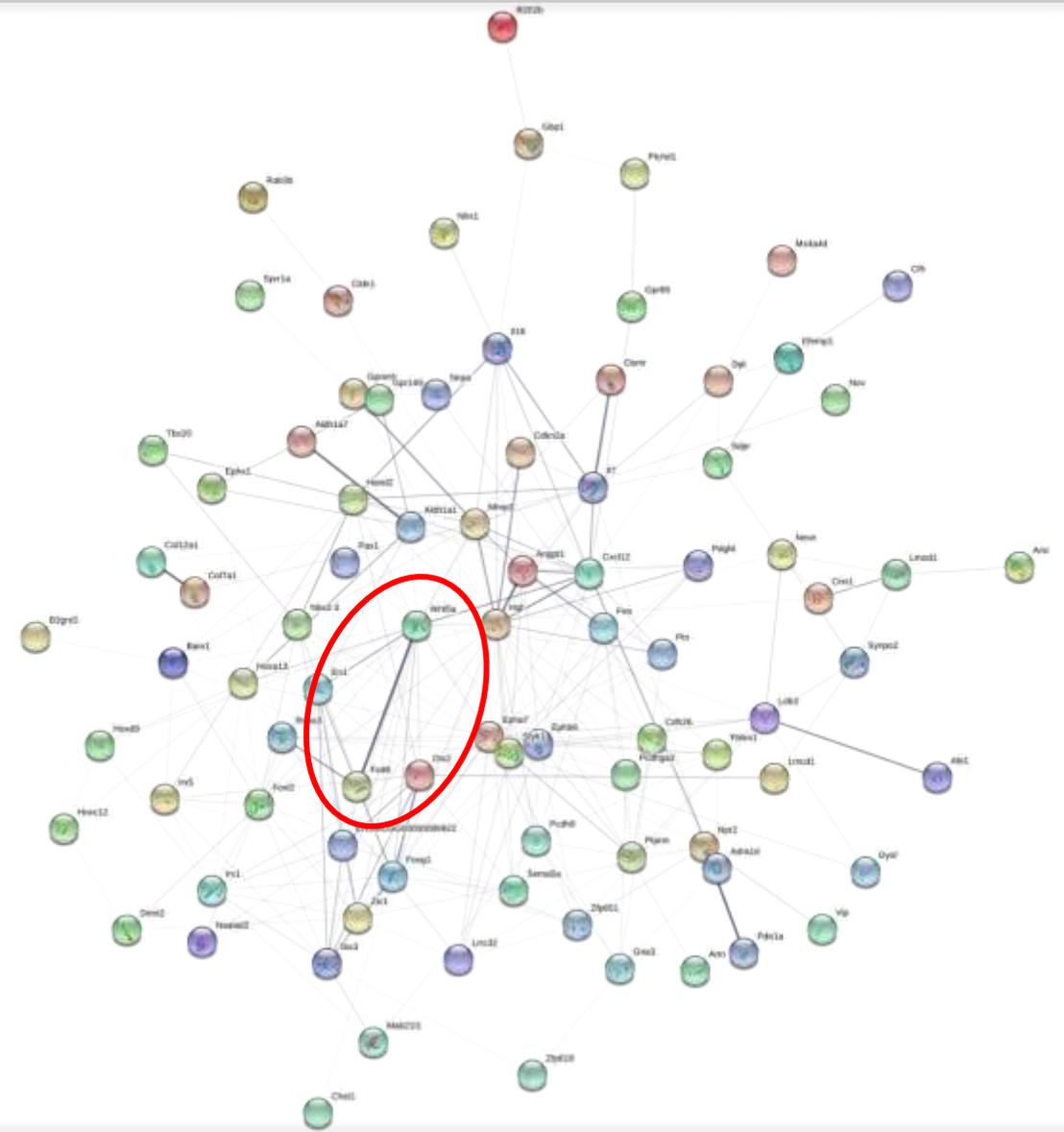
Функциональная аннотация

Термин GO	p-value
развитие многоклеточного организма GO:0007275	5,8E-6
клеточная адгезия GO:0007155	8,8E-6
врождённый иммунитет GO:0045087	5,1E-3
клеточный хемотаксис GO:0060326	8,0E-3
ангиогенез GO:0001525	8,6E-3
положительные регуляторы клеточной миграции GO:0030335	2,2E-2
положительные регуляторы клеточной пролиферации GO:0008284	2,4E-2
клеточная дифференцировка GO:0030154	2,6E-2
положительные регуляторы апоптоза GO:0043065	3,2E-2
иммунный ответ GO:0006955	3,5E-2

Сравнение транскриптомов фибробластов m5S и фибробластоподобных гибридных клеток

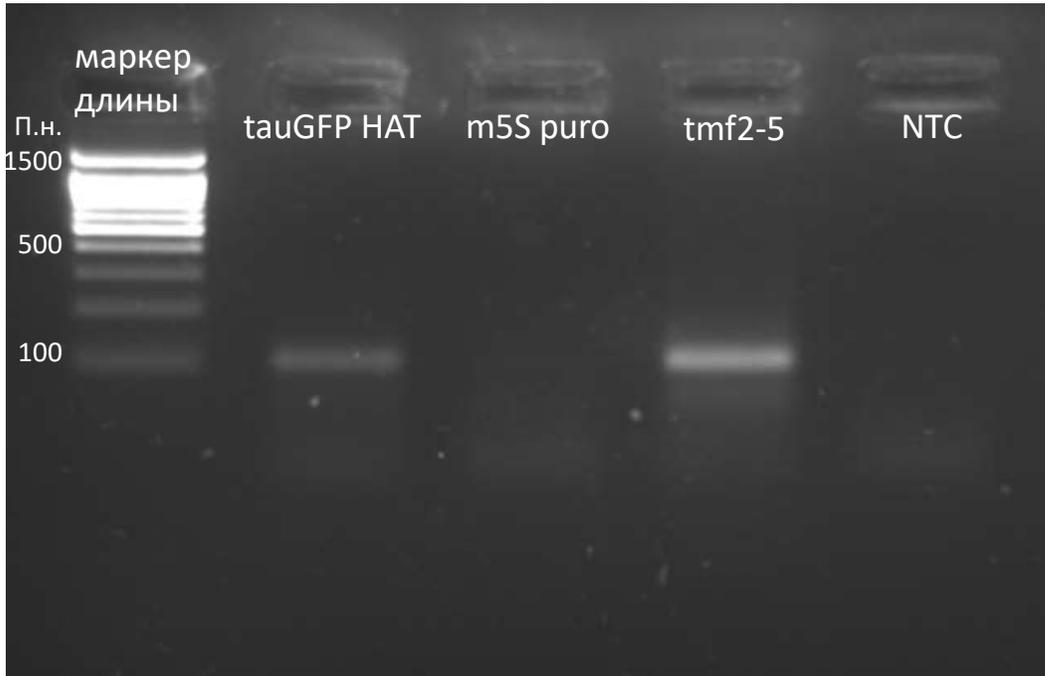


GeneMANIA (genemania.org)



String (string-db.org)

Анализ экспрессии генов



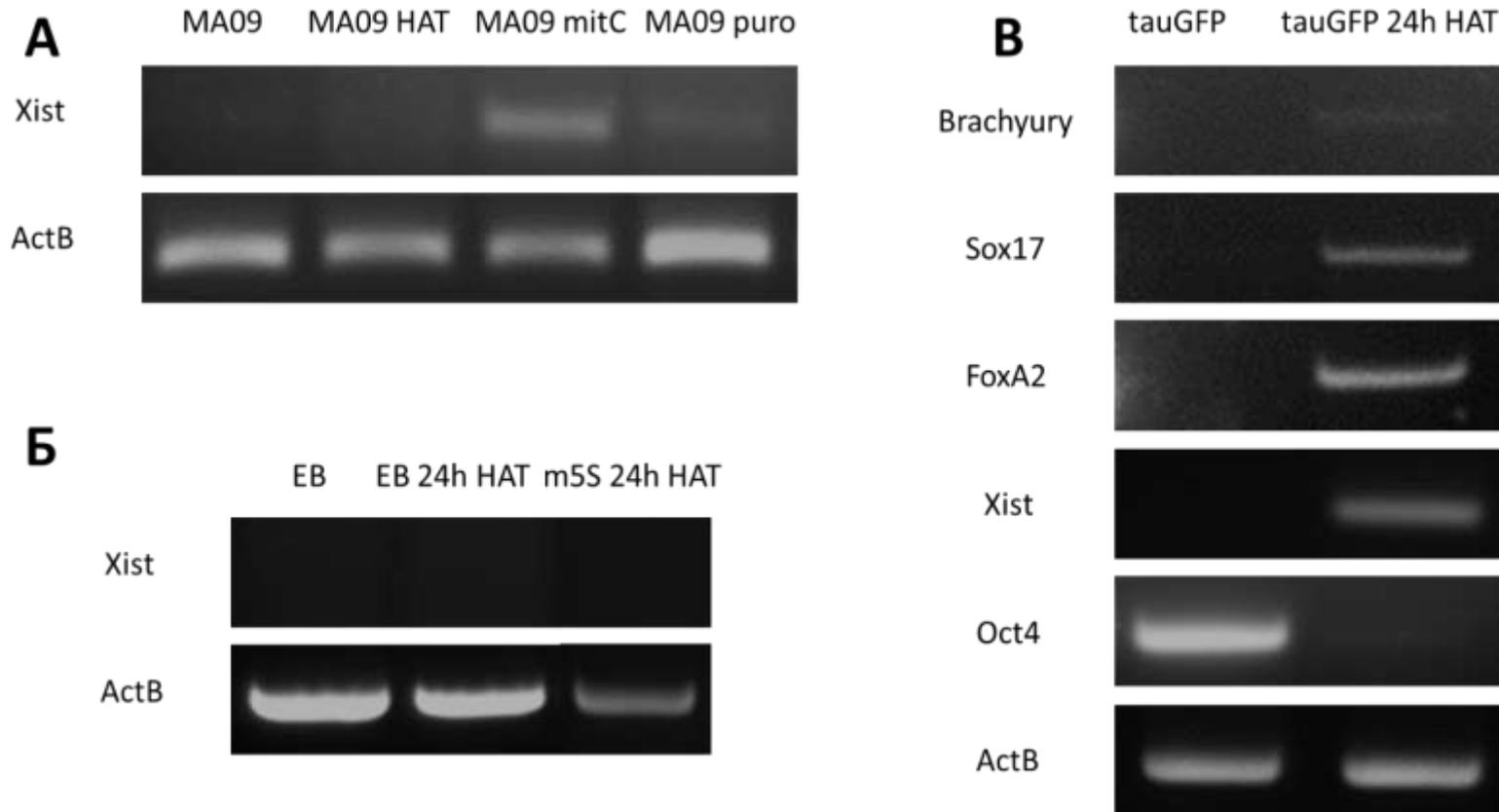
Фотография электрофореза продуктов ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к гену *Xist*

- tauGFP HAT* – культивирование клеток tauGFP 24 часа в среде ГАТ
- m5S puro – культивирование клеток m5S 24 часа с добавлением пурамицина
- tmf2-5 – гибридные клетки с неактивной X-хромосомой

Активация *Xist* может быть связана с:

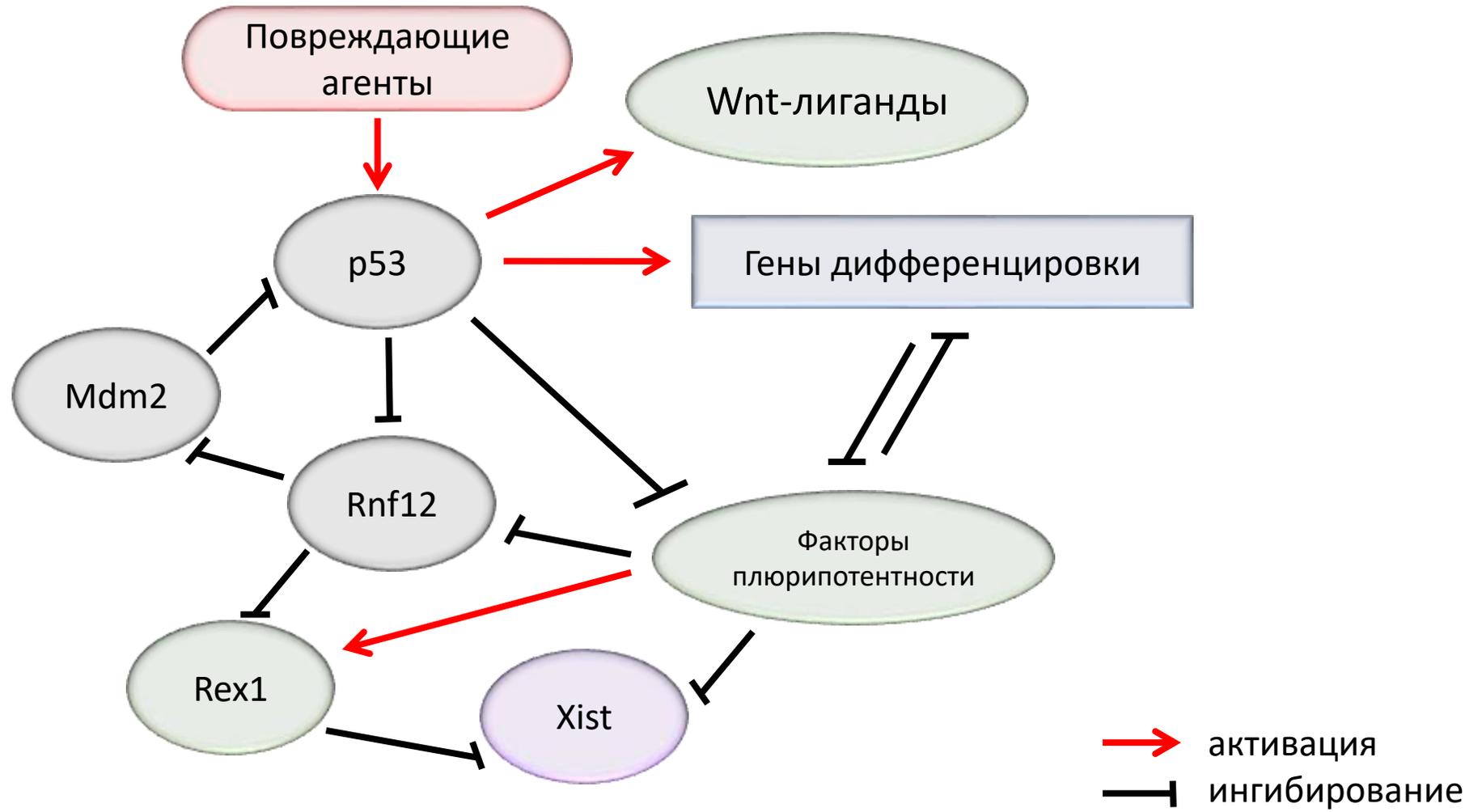
1. воздействием ГАТ (аминоптерин) на любые типы клеток
2. нарушением синтеза ДНК *de novo* под воздействием ГАТ в клетках, мутантных по *Hprt*
3. апоптозом плюрипотентных клеток

Анализ экспрессии генов

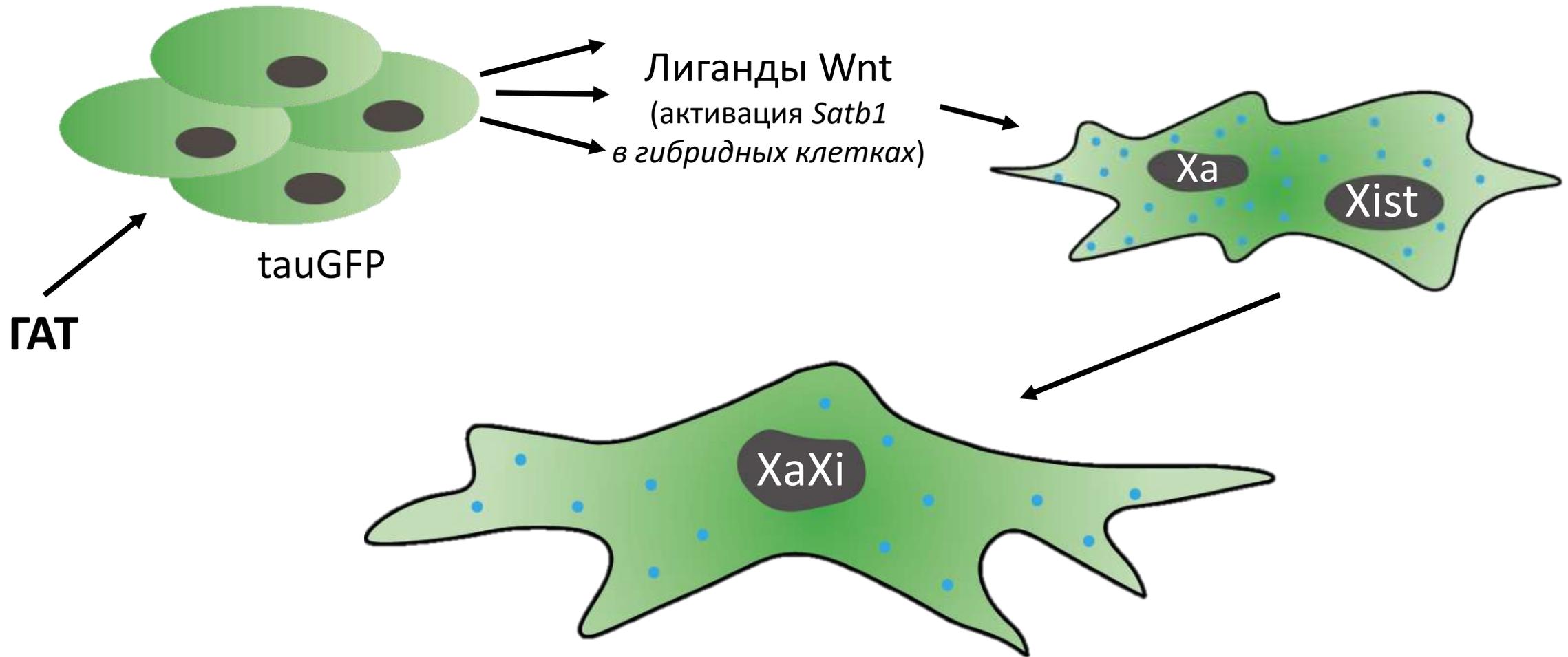


А – анализ экспрессии *Xist* в ЭС клетках MA09 с добавлением ГАТ, митомицина С и пурамицина; Б – анализ экспрессии *Xist* в дифференцированных клетках после добавления; В – анализ экспрессии генов дифференцировки и плюрипотентности в tauGFP через сутки после добавления ГАТ.

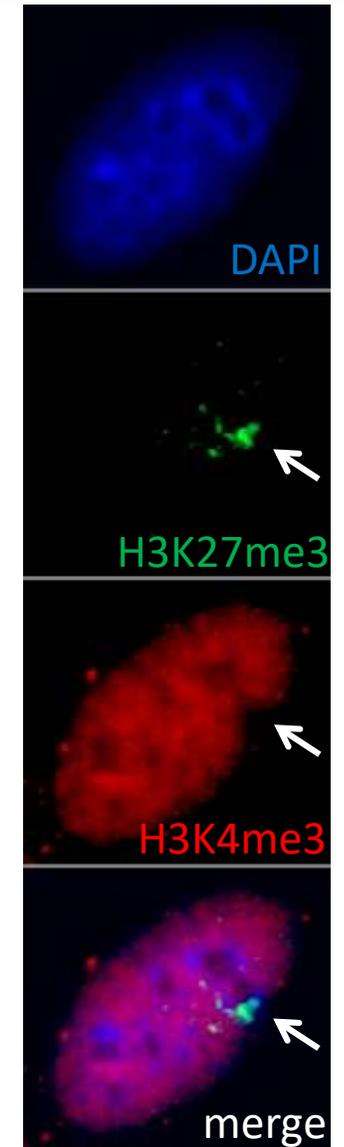
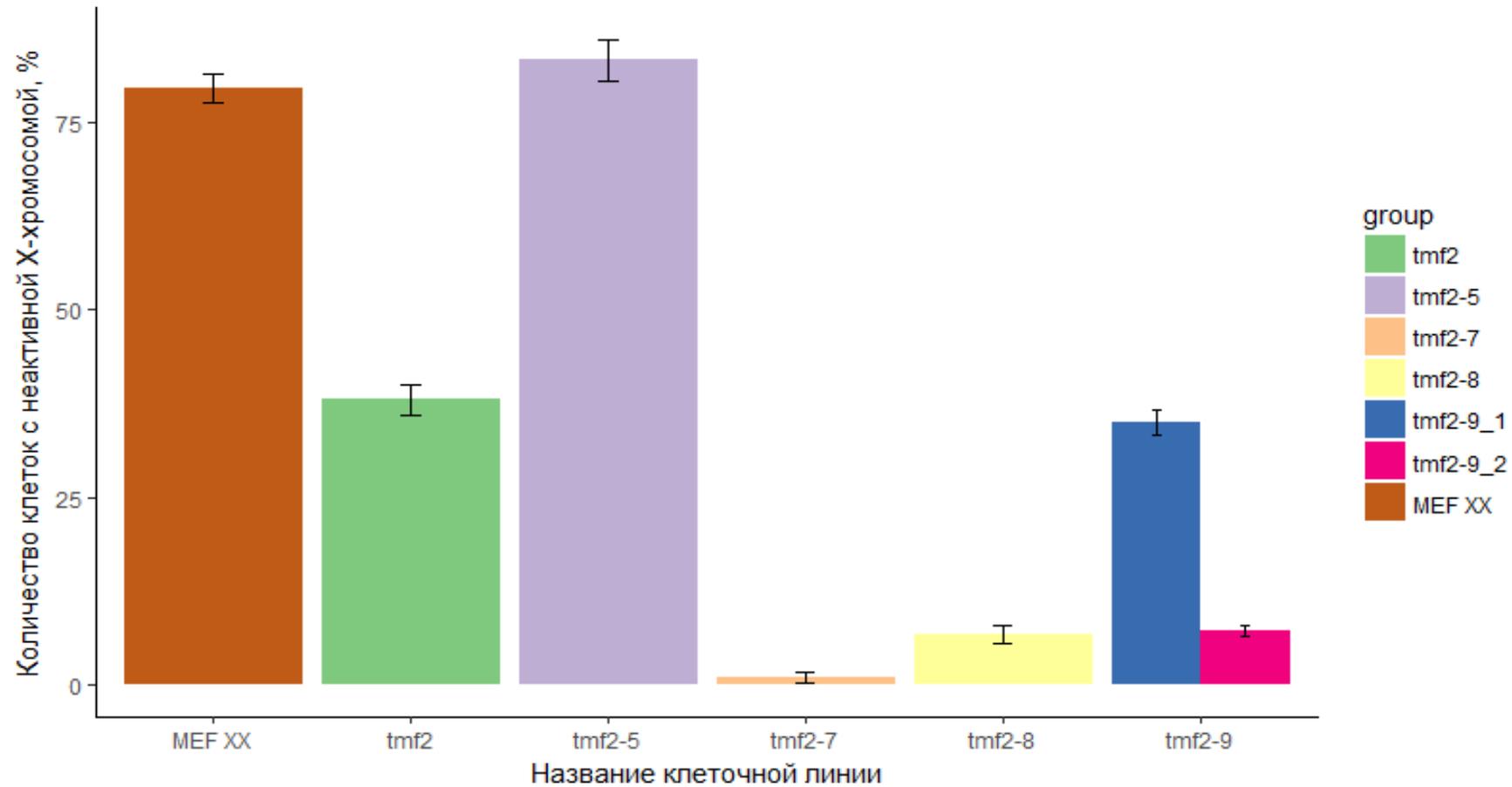
Активация экспрессии *Xist*



Возможный механизм появления неактивной X-хромосомы

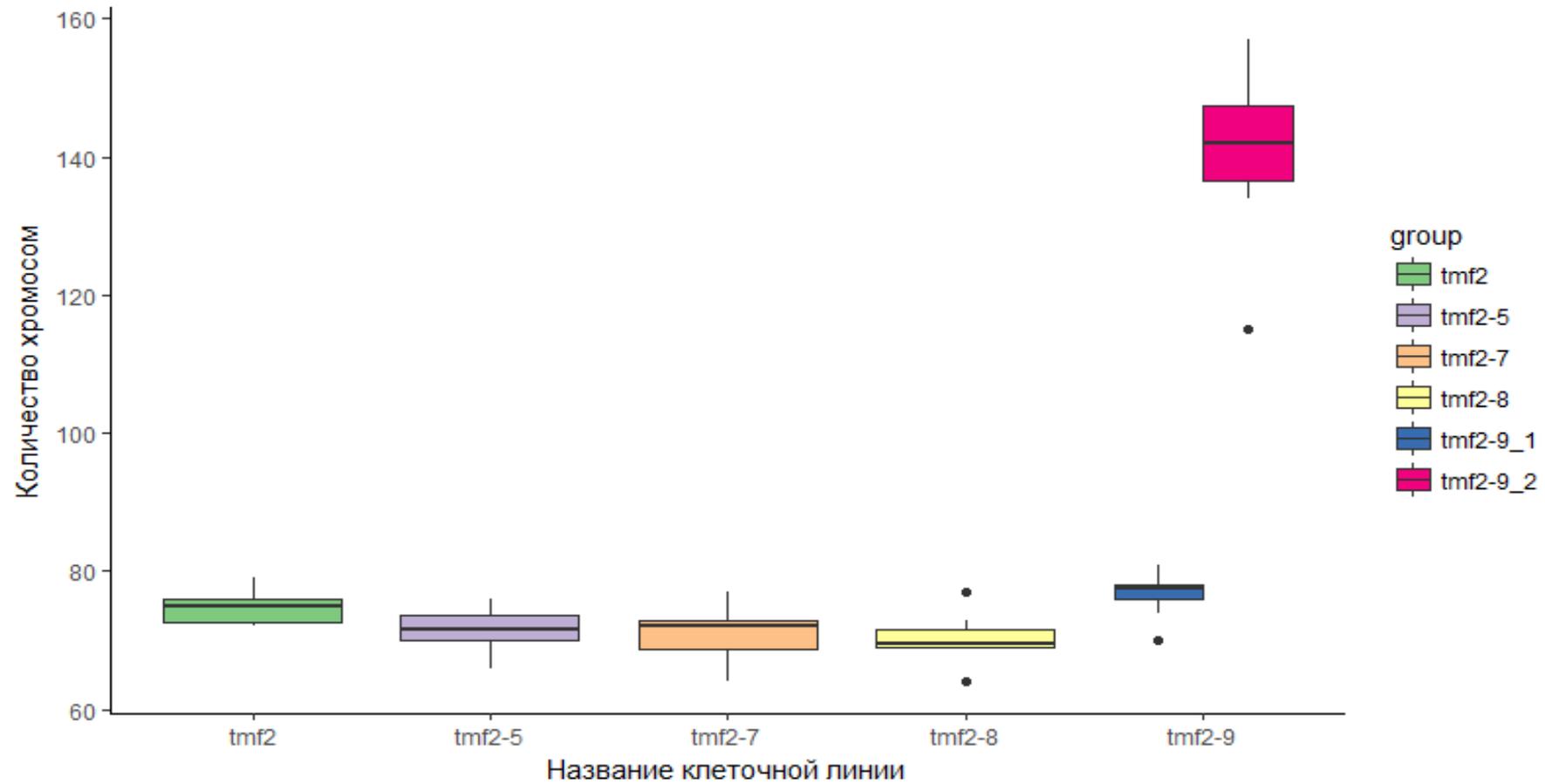


Результаты иммунофлуоресцентного анализа



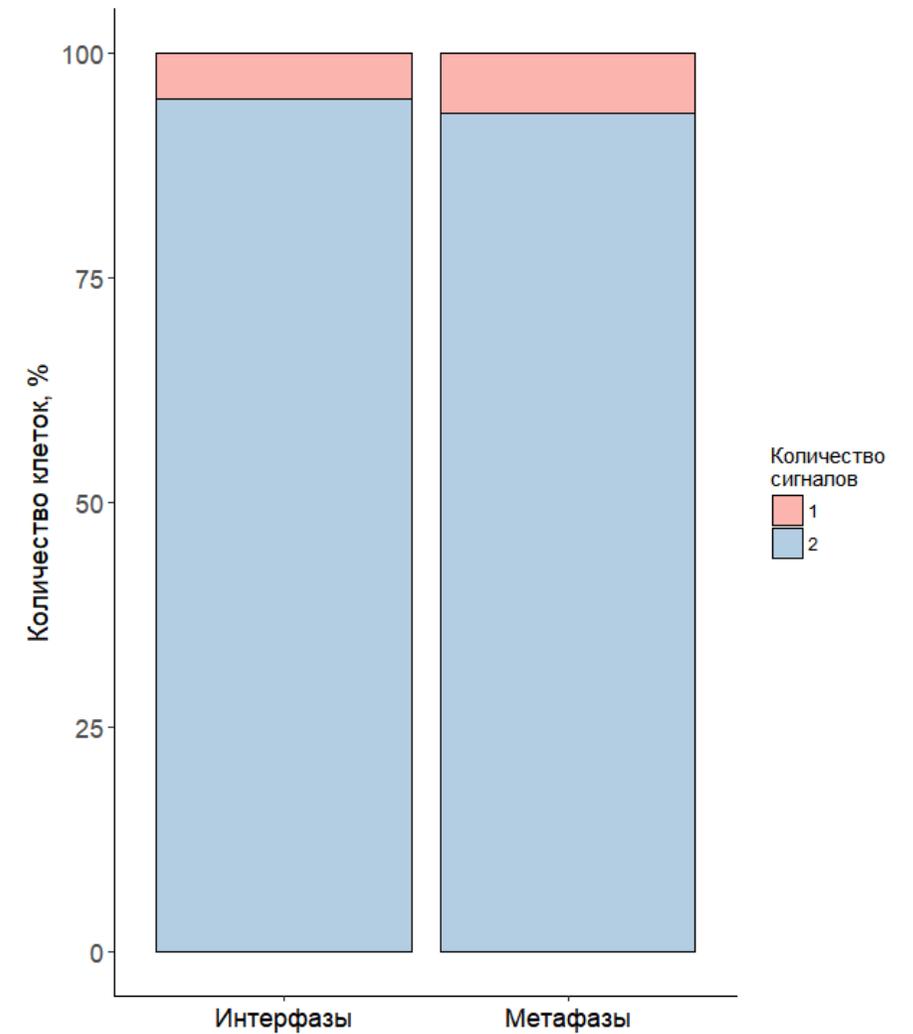
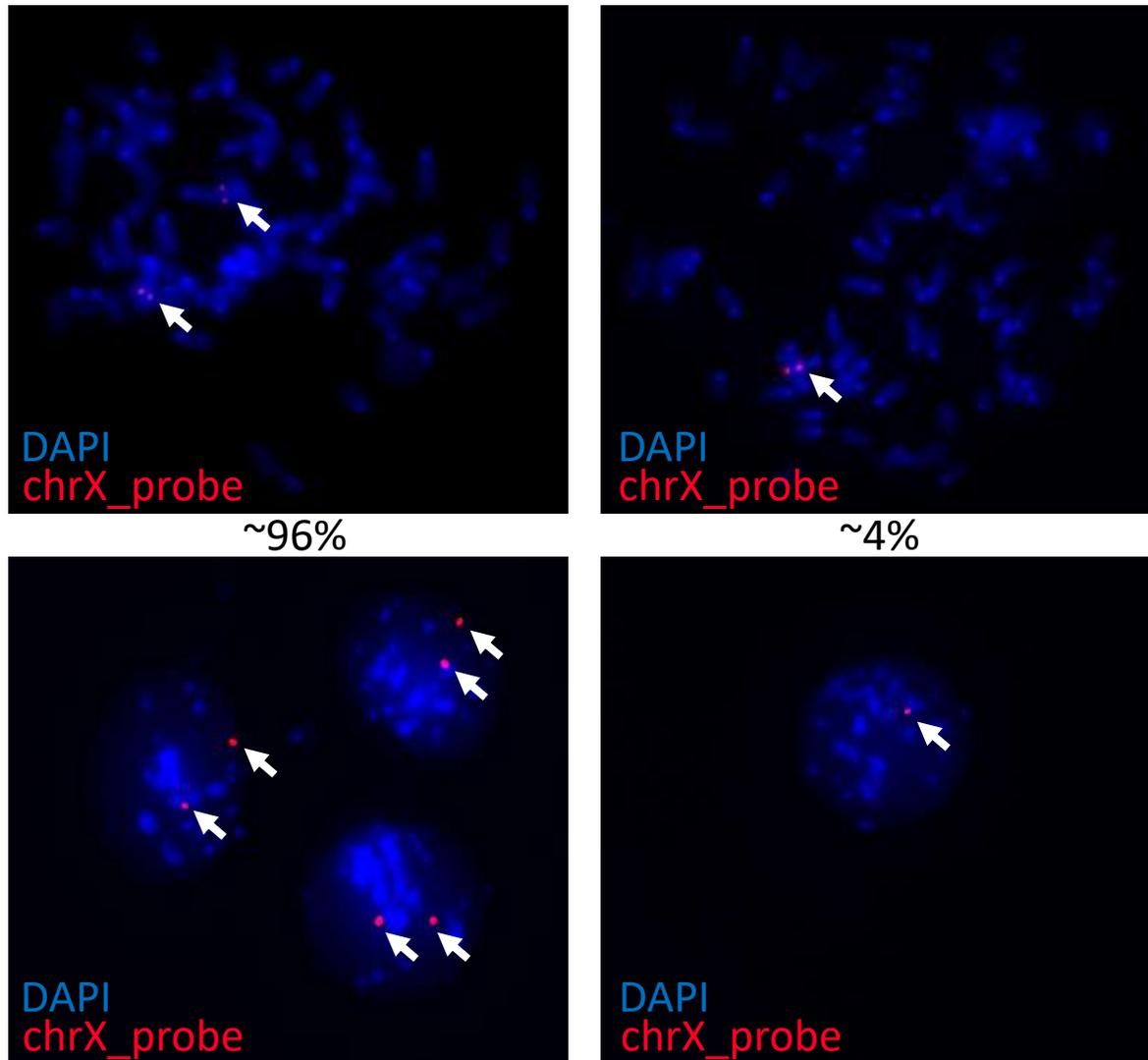
Название	MEF XX	tmf2	tmf2-5	tmf2-7	tmf2-8	tmf2-9_1	tmf2-9_2
Количество, %	79	38	83	<1	7	35	7

Результаты цитогенетического анализа



Название	tmf2	tmf2-5	tmf2-7	tmf2-8	tmf2-9_1	tmf2-9_2
Пределы изменчивости	70-79	66-79	64-77	64-78	70-81	115-157

Количество X-хромосом в tmf2



Выводы

1. Показано, что неактивное состояние X-хромосомы в фибробластоподобных гибридных клетках является нестабильным.
2. При добавлении повреждающих агентов в культуру эмбриональных стволовых клеток происходит активация экспрессии *Xist*. Перед гибелью дифференцированных клеток экспрессия *Xist* не наблюдается.
3. Анализ транскриптомных данных показал наличие группы генов с высоким уровнем экспрессии в фибробластоподобных гибридах по сравнению с обоими типами родительских клеток. Активация части этих генов может быть связана с активацией Wnt-сигнального пути.