

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos studijų programos IV kurso studentė

Akvilė ŽLIBINAITĖ

Bakalauro darbas

Endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos ir epigenetinių pokyčių tyrimas

Darbo vadovė:

Dokt. Deimantė Žukauskaitė

Vilnius, 2022

Endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos ir epigenetinių pokyčių tyrimas

Darbas atliktas Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriuje

Akvilė Žlibinaitė

.....

Darbo vadovė:

Leisti / neleisti gintis:

Dokt. Deimantė ŽUKAUSKAITĖ

.....

TURINYS

Santrumpos	4
IVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Endometriumo sandara ir funkcijos	6
1.2 Endometriumo stromos ląstelių diferenciacija	7
1.3 Decidualizacija	8
1.4. Decidualizacijos genai	9
1.5. Epigenetinių veiksmų pokyčiai decidualizacijos metu	10
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	12
2.1 Medžiagos	12
2.2 Metodai	13
2.2.1. Ląstelių linijos	13
2.2.2. Ląstelių kultivavimas	13
2.2.3. Ląstelių diferencijavimas	13
2.2.4. Ląstelių dažymas	14
2.2.5. RNR skyrimas	15
2.2.6. kopijinės DNR (kDNR) sintezė	15
2.2.7. Realus laiko kiekybinė PGR (RL–kPGR)	16
2.2.8. Western blot analizė	17
2.2.9. Chromatino imunoišsodinimas (ChIP)	19
2.2.10. Metilintos DNR imunoišsodinimas (MeDIP)	21
2.2.11. Kiekybinė PGR (kPGR)	22
3. REZULTATAI	24
3.1. Endometriumo stromos ląstelių diferenciacija	24
3.2. Endometriumo stromos ląstelių decidualizacija	26
3.3 Western Blot analizė	27
3.4 Chromatino imunoišsodinimas	28
3.5. Metilintos DNR imunoišsodinimas	29
4. REZULTATŲ APTARIMAS	31
IŠVADOS	33
SANTRAUKA	34
SUMMARY	35
Literatūros sąrašas	36

Santrumpos

ACTB – β -aktinas;
cAMP – ciklinis adenoizino monofosfatas;
CD – ekto-5'-nukleotidazė;
ChIP – chromatino imunoišsodinimas;
DAG – kartu naudojamų deksametazono, askorbo rūgšties ir β -glicerofosfato pavadinimas;
db-cAMP – dibutiril-ciklinis adenoizino monofosfatas;
DMEM – „Dulbecco's Modified Eagle Medium“;
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
enSL – endometriumo stromos ląstelės;
FBS – embrioninis veršelio serumas;
GAPDH – gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazė;
H4hiperAc – H4 hiperacetilinas;
IBMX – 3-izobutil-1-metil-ksantinas;
IGF – insulino tipo augimo faktorius;
IGFBP1 – į insuliną panašus augimo faktorių prisijungiantis baltymas 1;
IL-6 – interleukinas 6;
iRNR – informacinė RNR;
kDNR – kopijinė DNR;
KT – kambario temperatūra;
MeDIP – metilintos DNR imunoišsodinimas;
MPA – medroksiprogesterono acetatas;
PBS – Fosfato buferinis tirpalas;
PKA – baltymų kinazė A;
PRL – prolaktinas;
PS – Penicilinas / Streptomicinas;
RL-kPGR – realaus laiko kokybinė polimerazės grandininė reakcija;
RR – retinoinė rūgštis;
TGF- β – transformuojantys augimo faktoriai β ;
TET – angl. *ten-eleven translocases*;
20 α -HSD – 20 α hidroksisteroido dehidrogenazė;
5-mC – 5-metilcitozinas.

IVADAS

Endometriumo stromos ląstelės sudaro didžiausią gimdos vidinio sluoksnio, vadinamo endometriumu, dalį. Jos atsakingos už audinio proliferaciją, regeneraciją, atsidalijimą mėnesinių metu ir gimdos pasiruošimą nėštumui. Šiuos procesus reguliuoja cikliška estrogeno ir progesterono kaita.

Gimdoje endometriumo stromos ląstelės yra atsakingos už laikino decidualinio audinio suformavimą. Jų diferenciacija į decidualines ląsteles yra kritiškai svarbus žingsnis sėkmingam embriono įsitvirtinimui gimdoje ir ankstyvojo nėštumo eigai.

Decidualizacijos metu vykstantiems fiziologiniams ir biocheminiams endometriumo stromos ląstelių pokyčiams didelę įtaką daro epigenetiniai mechanizmai. Nors jų veikimo principai jau yra plačiai ištirtini, tačiau dar trūksta žinių apie tai kaip epigenetinės modifikacijos, tokios kaip histonų acetilinimas ar DNR metilinimas, kinta endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos metu specifinių genų promotorių srityse. Svarbu išsiaiškinti, kaip šios genominės modifikacijos keičia chromatiną struktūrą ir kokią įtaką daro decidualinių genų raiškai.

Reikšmingų endometriumo audinio diferenciacijai epigenetinių veiksnių analizė leistų geriau suprasti molekulinį endometriumo ciklo reguliavimo būdus ir padėtų identifikuoti terapinius taikinius vaisingumo sutrikimų gydymui. Be to, endometriumo stromos ląstelės, dėka savo diferenciacijos potencialo, galėtų būti potencialus ląstelių pakaitinės terapijos šaltinis, panaudojamas pažeistų audinių regeneracijoje.

Darbo tikslas:

Įvertinti endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos potencialą ir plačiau ištirti decidualizacijos metu vykstančius epigenetinius pokyčius.

Darbo uždaviniai:

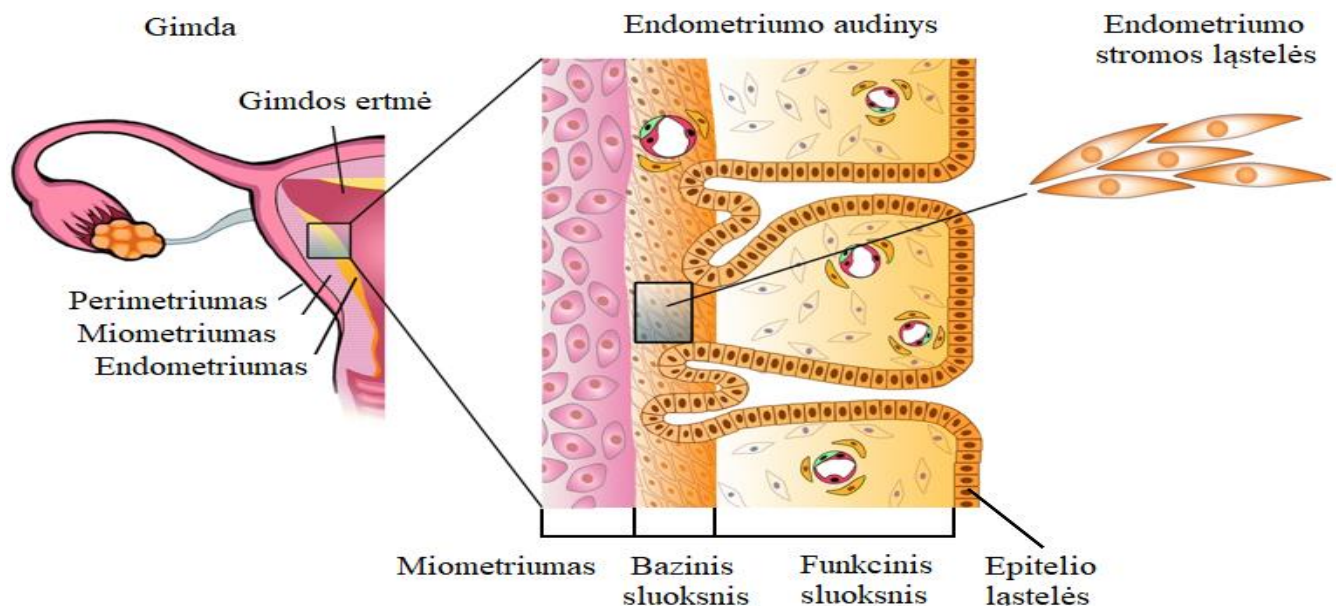
1. Įvertinti endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos potencialą indukuojant ląsteles diferencijuoti į skirtingų audinių ląstelių tipus.
2. Įvertinti specifinių induktorių įtaką endometriumo stromos ląstelių decidualizacijai *in vitro*, analizuojant decidualizacijos žymenų genų (*PRL* ir *IGFBP1*) raiškos pokyčius.
3. Nustatyti bendrus histono H4 hiperacetilinimo modifikacijos lygio pokyčius endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos metu.
4. Ištirti su decidualizacija susijusių genų (*WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*, *HOXA10*, *FOXO1*) promotorių ir egzonų sričių histono H4 hiperacetilinimo bei DNR metilinimo modifikacijos pokyčius endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Endometriumo sandara ir funkcijos

Vienas pagrindinių moters reprodukcinės sistemos organų yra gimda. Iš išorės ją dengia serozinis dangalas (perimetriumas), tuomet eina raumeninis sluoksnis (miometriumas) ir vidinėje pusėje esanti gimdos gleivinė (**endometriumas**) (1.1 pav.). Reprodukciniam amžiui endometriumas patiria daugiausiai morfologinių ir biocheminių pokyčių. Tai labai dinamiškas audinys, per moters gyvenimą jis atsinaujina apie 450 kartų (Okada *et al.*, 2018). Endometriumas dalyvauja daugelyje funkcijų, tokiose kaip gimdos pasiruošimas implantacijai, nėštumo palaikymas bei menstruacijos. Visas šias funkcijas reguliuoja tarpusavyje sąveikaujantys kiaušidžių išskiriami hormonai ir endometriumo bei imuninės sistemos ląstelės (Makieva S *et al.*, 2018).

Pagal sandarą endometriumas skirstomas į jungiamąjį ir epitelinį audinius. Jungiamąjį audinį sudaro gimdos liaukos supančios **stromos ląstelės**, spiralinės arterijos ir nervai. Epitelio ląstelės dengia gimdos gleivinės paviršių (Critchley *et al.*, 2020). Funkcionaliai endometriumą sudaro funkcinis ir pamatinis sluoksniai. Kas mėnesį dėl lytinių hormonų įtakos susiformuojančiame funkciname sluoksnyje implantuojasi blastocista ir vystosi placenta (nėštumo atveju). Čia išsidėsto gimdos liaukos, spiralinės arterijos bei jas supanti netanki stroma. Kiekvieno vaisingos moters ciklo metu, neįvykus implantacijai, funkcinis sluoksnis pašalinamas su krauju. Tuo tarpu prie miometriumo prisitvirtinęs pamatinis sluoksnis yra pastovus, jo storis menstruacinio ciklo metu nekinta. Pamatinėje endometriumo dalyje išsidėsto gimdos liaukų pamatas, tanki stroma ir didelės kraujagyslės. Po menstruacijų šis sluoksnis padeda atkurti naują funkcinį sluoksnį.



1.1 pav. Endometriumo stromos ląstelės organo, audinio ir ląstelės lygmeniu (Deryabin *et al.*, 2020).

Endometriumo ciklas skirstomas į mėnesines, proliferacinę ir sekrecinę fazes (Makieva S *et al.*, 2018). Pasibaigus mėnesinėms kiaušidėse susiformavęs Grafo folikulas, ima išskirti didelius kiekius estrogeno (Van Iten, 2016). Padidėjusi estrogeno koncentracija sukelia intensyvią endometriumo ląstelių proliferaciją, iš naujo formuojasi funkcinis sluoksnis. Tiesios endometriumo liaukos ilgėja, stromoje pradeda suktis į spiralines arterijas (Henriet *et al.*, 2012). Didžiausia estrogeno koncentracija pasiekama ovuliacijos metu (14 ciklo d.). Po ovuliacijos iš plyšusio folikulo susiformavęs geltonkūnis veikia antagonistiskai – išskiria progesteroną, skatinantį sekrecinės fazės pradžią. Vyksta **endometriumo stromos ląstelių (enSL) diferenciacija** ir endometriumas tampa pasiruošęs besivystančio embriono implantacijai (Makieva S *et al.*, 2018). Jei neįvykus, geltonkūnis sunyksta, todėl estrogenų ir progesterono koncentracija krenta. Endometriumas ima sekretuoti įvairias signalines molekules ir prasideda mėnesinės (Van Iten, 2016). Funkciniam sluoksniui atsidalijus, ciklas kartojasi.

1.2 Endometriumo stromos ląstelių diferenciacija

Jungiamąjį audinį sudarančios **stromos ląstelės** yra atsakingos už šio audinio regeneraciją bei pasižymi imunomodulatorinėmis savybėmis (Keating, 2012). Pagal diferenciacijos potencialą EnSL priskiriamos **įvairiagalėms ląstelėms**, t.y., jos gali virsti audinio, iš kurio kilo arba kitų to paties gemalinio lapelio audinių ląstelėmis. **Ląstelių diferenciacija** apibrėžiama kaip jų fenotipo pokytis, sukeltas su ląstelinėmis funkcijomis susijusių genų raiškos. EnSL būdingi pagrindiniai įvairiagalių ląstelių požymiai: monosluoksnio formavimas kultūroje, adhezija prie plastikinių paviršių ir išskirtinių paviršiaus antigenų (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD140B) raiška (Kyurkchiev *et al.*, 2010). Įvairiagalės enSL pagal savo plastiškumo savybes panašios ne į kamienines, bet į **pirmtakines ląsteles**. Pastarosios yra labiau specifinės ir dalyvauja pažeistų audinių atsistatyme, bet ne *de novo* audinių atkūrimu (Kyurkchiev *et al.*, 2010). Pirmtakinių enSL diferenciaciją sunkiau sukelti, be to jų dalijimosi skaičius yra labiau apribotas. EnSL išsidėsto tiek pamatiniame, tiek funkciname sluoksniuose (Bozorgmehr *et al.*, 2020). Paveikus atitinkamomis indukcinėmis terpėmis enSL geba *in vitro* diferencijuoti į mezoderminę (**osteocitus**, **adipocitus**, **miocitus** ir **chondrocitus**), ektoderminę (**neuronus**) linijas (Ullah *et al.*, 2015).

Osteogeninei diferenciacijai sukelti protokoluose dažnai naudojami deksametazonas, askorbo rūgštis ir β -glicerofosfatas (šis derinys dar vadinamas DAG). Esminis požymis, jog ląstelės diferencijuoja į osteoblastus, yra vykstanti mineralizacija. Tai procesas, kurio metu osteoblastai į tarpląstelinį matriksą išskiria kalcio fosfatus, kurie vėliau virsta į pagrindinę kaulų masę sudarančio karbonizuoto hidroksiapatito kristalus (Mahamid *et al.*, 2011).

enSL *in vitro* **adipogeninei diferenciacijai** sukelti naudojami indometacinas, 3–izobutil–1–metil–ksantinas (IBMX) ir deksametazonas. Ląstelės šios diferenciacijos metu įgyja adipocitams būdingas fiziologines funkcijas, tokias kaip lipidų transportavimas ir sintezė, jautrumas insulinui ir adipocitams būdingų baltymų sekrecija (Tang ir Lane, 2012).

Miogenezei indukuoti naudojamas arklio serumas. Jame yra augimo faktorių, kurie padidina struktūrinių baltymų kiekį mioblastuose (miocitų pirmtakuose), skatina užląstelinio matrikso baltymų bei citokinų sintezę (Cai *et al.*, 2018). Esminis miogeninės diferenciacijos bruožas yra mioblastų susilieėjimas į pailgas daugiabranduoles ląsteles, vadinamas miotubulėmis (McRae *et al.*, 2017).

In vitro **chondrogeninei diferenciacijai** sukelti būtinas didelis ląstelių tankis, panašus į ląstelių kondensaciją *in vivo* (Bean ir Tuan, 2015). Taip pat stromos ląstelėms diferencijuoti į chondrocitus reikalingas transformuojantis augimo faktorius $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), nes geba ląstelėse aktyvuoti kremzlinį audinį sudarančio II tipo kolageno ir proteoglikanų raišką. (Kruger *et al.*, 2014).

Neurogeninei diferenciacijai indukuoti yra svarbi retinoinė rūgštis (RR) bei komercinis N2 papildas. RR yra signalizuojanti molekulė, kurios siunčiami signalai per RR receptorių skatina nervinių ląstelių pirmtakus pereiti iš proliferacinės į diferenciacijos fazę ir aktyvuoja specifinių neurogenų raišką (Janesick *et al.*, 2015). Tuo tarpu komercinis N2 papildas naudojamas postmitotinių neuronų išgyvenamumo palaikymui, kadangi jis slopina ne neuroninių ląstelių augimą kultūroje.

1.3 Decidualizacija

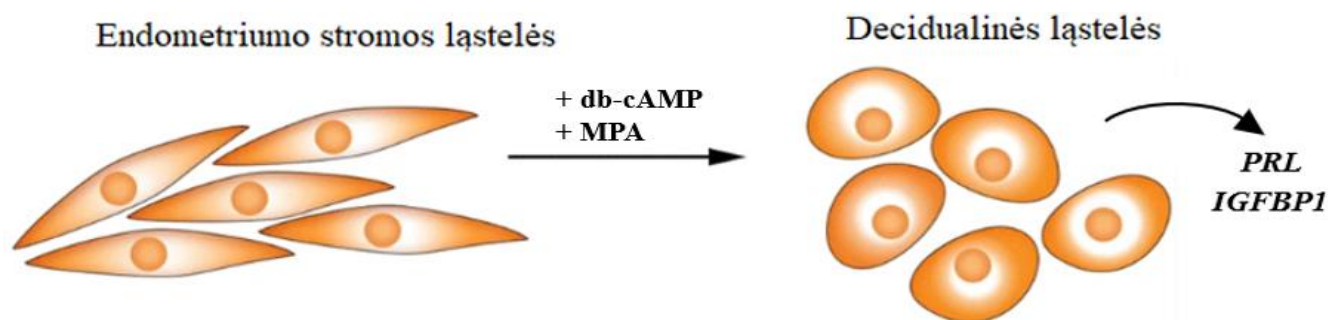
Decidualizacija yra procesas, kurio metu dėl progesterono koncentracijos padidėjimo sukeliamas enSL diferenciaciją į sekrecines decidualines ląsteles (Makieva *et al.*, 2018). Nors ir laikinas, **decidualinis audinys** yra kritiškai svarbus formuojantis receptyvią endometriumą. Nuo enSL decidualizacijos priklauso, ar sėkmingai vyks blastocistos implantacija bei nėštumo eiga iki placentos susiformavimo.

Pagrindė decidualinį audinį sudaro **diferencijuotos enSL**, naujai susiformavusios motinos kraujagyslės ir kraujo ląstelės (Mori *et al.*, 2016). Decidualizacijai būdingi morfologiniai enSL pokyčiai, sekrecinė gimdos liaukų transformacija, specializuotų gimdos natūralių žudikių ląstelių antplūdis ir kraujagyslių persitvarkymas.

Decidualizacijos metu blastocista bei endometriumas išskiria daug signalinių molekulių, kurių sukeliamos kaskadinės reakcijos sudaro sąlygas blastocistos priartėjimui, prisijungimui ir susilieėjimui su gimdos gleivine (Makieva *et al.*, 2018). Sekrecijos fazės viduryje išaugusi **progesterono** koncentracija žymi decidualizacijos proceso pradžią. Progesteronas veikia savo branduolinį progesterono receptorių, kuris ima siųsti signalus, palaikančius endometriumo homeostazę nėštumo

metu. Kiaušidžių išskiriamų hormonų sukelti signalai skatina viduląstelinio **ciklinio adenoizino monofosfato (cAMP)** kiekio padidėjimą (Okada *et al.*, 2018). Decidualinės enSL tampa apvalesnės, padidėja branduolių skaičius, glikogeno bei lipidų lašeliai ima kauptis citoplazmoje (Kajihara *et al.*, 2014).

Žmogaus ląstelių kultūrose antrinis informacijos nešiklis **cAMP** yra žinomas kaip decidualizacijos induktorius, susijęs su decidualinių žymenų, tokių kaip **prolaktinas (PRL)** ir **insuliną panašus augimo faktorių prisijungiantis baltymas 1 (IGFBP1)**, raiška. *In vitro* decidualizacija su cAMP gali būti indukuota per mažiau nei tris dienas, aktyvuojat nuo cAMP priklausomą baltymų kinazės A (PKA) kelią (Gellersen ir Brosens, 2014). Tam naudojamas **dibutiril-cAMP (db-cAMP)**, kuris yra endogeninio cAMP poveikį imituojantis, ląstelėms pralaidus PKA aktyvatorius (Logan *et al.*, 2013). Indukuojant enSL kartu su cAMP dažnai naudojamas ir **medroksiprogesterono acetatas (MPA)**, dėl jo gebėjimo paskatinti *PRL* aktyvaciją (1.2 pav.).



1.2 pav. Endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos procesas (Deryabin *et al.*, 2020).

PRL laikomas vienu iš pagrindinių **decdualizacijos žymenų**, jo raiškos lygis stipriai išauga progresuojant implantacijai (Sangeeta Devi ir Halperin, 2014). *PRL* slopina interleukino 6 (IL-6) ir 20 α hidroksisteroido dehidrogenazės (20 α -HSD) veikimą decidualiniame audinyje. Abu šie baltymai trukdo normaliai nėštumo eigai, kadangi IL-6 išskiriamas uždegimo atveju, o 20 α -HSD katabolizuoja progesteroną į jo neaktyvią formą (Bao *et al.*, 2007). Kitas **decidualizacijos žymuo IGFBP1** reguliuoja insulino tipo augimo faktoriaus 1 (IGF-1) biologinį aktyvumą. Proliferacijos fazėje IGF-1 jungiasi prie savo receptoriaus ląstelės paviršiuje ir yra atsakingas už endometriumo proliferaciją. Tačiau sekrecinės fazės metu fosforilintas *IGFBP1* perneša IGF-1 į tarpląstelinę ertmę ir taip inhibuoja jo aktyvumą (Matsumoto *et al.*, 2008).

1.4. Decidualizacijos genai

Vienas iš pirminiūose decidualizacijos procesuose dalyvaujančių genų yra **FOXO1** (angl. *Forkhead box protein 1*). Šis genas svarbus ciklo reguliacijos, nuo progesterono priklausomos ląstelių

diferenciacijos, apoptozės, apsaugos nuo oksidacinio streso ir DNR reparacijos procesuose (Kajihara *et al.*, 2013).

Taip pat svarbus **HAND2** (angl. *Heart and neural crest derivatives expressed 2*) geno vaidmuo enSL decidualizacijoje. **HAND2** geno koduojamas transkripcijos faktorius aktyvuoja arba represuoja kitų endometriumo funkcijoms svarbių genų veiklą, t.y., veikia kaip jų reguliatorius. Todėl **HAND2** gali turėti įtakos hormoniniam priešimplantacinės gimdos receptyvumui (Okada *et al.*, 2018).

HOXA10 (angl. *Homeobox A10*) genas yra transkripcijos faktorius, kurio raiškos lygis endometriume padidėja implantacinio lango periodu (Samadieh Y, 2019). EnSL decidualizacijos metu veikiamas išaugusios progesterono ir estrogeno koncentracijos **HOXA10** reguliuoja decidualiniam audiniui specifinių genų, atsakingų už ląstelių augimą ir proliferaciją, raišką (Lu Z *et al.*, 2008).

WNT (pavadinimas kilęs iš angl. *Wingless* (liet. besparnis fenotipas)) šeimos genai dalyvauja embriono vystymesi, kamieninių ląstelių reguliacijoje, diferenciacijoje ir audinių homeostazėje (Sonderegger *et al.*, 2010). Vienas iš šios šeimos narių **WNT4** yra svarbus embriono ir endometriumo komunikacijos reguliatorius, kadangi dalyvauja decidualizacijos ir implantacijos procesuose (Li *et al.*, 2013).

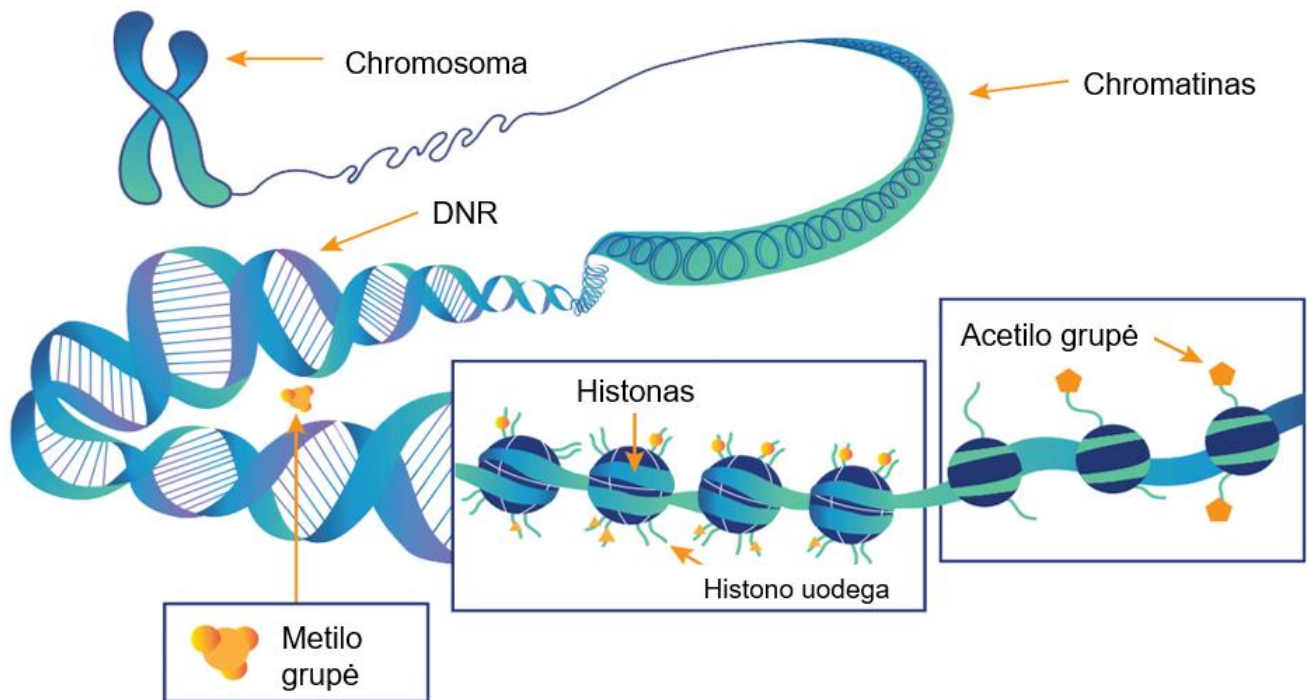
Be to, EnSL decidualizacijoje svarbus ir transkripcijos signalų keitiklis ir aktyvatorius 5A (**STAT5A**). **STAT** genų šeimos nariai veikia kaip signalo perdavėjai iš ląstelės membranos į branduolį, kur aktyvuoja su augimu ir diferenciacija susijusių genų raišką (Wu *et al.*, 2019). Staigus **STAT5A** kiekio padidėjimas decidualizacijos metu padeda sustiprinti **PRL** promotoriaus atsaką į cAMP ir MPA (Mak *et al.*, 2002).

1.5. Epigenetinių veiksnių pokyčiai decidualizacijos metu

Genų raiškos profiliai decidualizacijos metu stipriai kinta dėl lytinių hormonų ir augimo faktorių veiklos, molekulinų bei epigenetinių mechanizmų. **Epigenetika** yra apibrėžiama kaip funkciškai svarbūs genomo pakitimai, nekeičiantys nukleotidų sekos, bet veikiantys chromatinio struktūrą. Pagrindinės epigenetinės modifikacijos yra **DNR metilinimas**, **histonų modifikacijos** ir **nekoduojančios RNR** (Loscalzo ir Handy, 2014).

Histonai yra DNR besijungiantys, teigiamai įkrauti konservatyvūs baltymai, padedantys supakuoti DNR į chromatiną formuojančias nukleosomas. Nukleosomos šerdį sudaro histonų oktamerai: po dvi kopijas H2A, H2B, H3 ir H4, o tarpus tarp nukleosomų jungia histonas H1 (Draizen *et al.*, 2016). Iš nukleosomų kyšantys histonų N galai gali būti veikiami grįžtamų potransliacinių modifikacijų, tokių kaip **acetilinimas** (1.3 pav.). Dažniausiai **acetilo grupė** prijungiama prie histonų N galo lizino liekanų. Acetilinimą atlieka **histonų acetiltransferazės (HAT)**, o deacetilinimą – **histonų**

deacetilazės (HDAC) (Shen *et al.*, 2015). Prie histono prijungus acetilo grupę atlaisvinama chromatino struktūra, todėl transkripcijos faktorių prieinamumas prie specifinių genų promotorių palengvėja, jų raiška suaktyvinama. Priešingai, deacetilinus histonus chromatinas tvirčiau susipakuoja, specifinių genų transkripcija inhibuojama. Chromatino struktūra dėl histonų acetilinimo kinta keliais būdais. Visų pirma, palengvinamas acetilintas lizino liekanas atpažįstančių baltymų domenų prisijungimas. Be to, histonų acetilinimas neutralizuoja teigiamą lizino krūvį ir taip susilpninama elektrostatinė DNR – histonų sąveika. Todėl chromatinas pereina į mažiau kondensuotą būseną (Taylor *et al.*, 2013).



1.3 pav. Epigenetinės modifikacijos: Histonų acetilinimas ir DNR metilinimas.

Parodyta, jog bet kurio lizino liekanos acetilinimas histono N gale aktyvuoja transkripciją (Kanzaki, 2016). Žinoma, kad daugiausiai acetilinamos penkios **histono 4** (toliau vadinamas **H4**) lizino (K) liekanos: K5, K8, K12, K16, K21 (Zheng *et al.*, 2013). Ryškus acetilinto H4 kiekis endometriume stebimas **sekrecinės fazės metu**. Jei implantacija neįvyksta, H4 acetilinimo lygis mažėja. Šie pokyčiai koreliuoja su sumažėjusiu lytinių hormonų ir decidualizacijai svarbių genų raiškos lygiais (Retis – Resendiz *et al.*, 2021).

Daugiausiai eukariotuose paplitusi epigenetinė modifikacija yra **DNR metilinimas** (3 pav.). Tai yra epigenetinis mechanizmas, kurio metu metilo grupė kovalentiniu ryšiu prijungiama prie citozino nukleotido 5' anglies atomo, kad susidarytų **5–metilcitozinas (5–mC)**. Ši modifikacija išskirtinai aptinkama CpG salose – DNR regionuose, kuriuose gausu citozino ir guanino nukleotidų. Kadangi CpG salose išsidėsto didžioji dalis genų promotorių, DNR metilinimas tiesiogiai daro įtaką tų genų

raiškai. Hipermetilinimas genų promotorių srityse susijęs su genų raiškos slopinimu, o hipometilinimas aktyvia raiška (Kim ir Costello, 2017). Raiškos slopinimas vyksta neleidžiant transkripcijos faktoriams prisijungti prie DNR arba pritraukiant prie metilintos DNR besijungiančių baltymų, padidinančių chromatinio tankį. Metilo grupę prie DNR prijungia **DNR metiltransferazės (DNMT)**, tuo tarpu demetilinimą daugiausiai reguliuoja **TET** (angl. *ten eleven translocation*) **translokazės** (Auclair ir Weber, 2012).

Kiekvienam žmogaus audiniui būdingas specifinis DNR metilinimo profilis, lemiantis audiniui specifinių genų transkripciją, vystymąsi ir funkcijas (Lokk *et al.*, 2014). Žinduolių embriogenezės bei ląstelių diferenciacijos metu DNR metilinimo profilis žymiai keičiasi. Ląstelėse nustatomi nauji genų raiškos profiliai, kurie vėliau yra palaikomi somatinėms ląstelėms dalijantis (Moore *et al.*, 2013). Po diferenciacijos DNR metilinimo profiliai dažniausiai būna stabilūs ir lengvai nebekinta, genų raiška reguliuojama kitomis modifikacijomis (Carvalho *et al.*, 2010).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų gamintojai

Reagentas	Gamintojas
Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12 (DMEM/F12)	ATCC
DMEM (4,5 g/L gliukozės)	Genaxxon bioscience
DMEM (1 g/L gliukozės)	
Penicilinas (100 U/ml)/Streptomocinas (100 µg/ml) (PS)	
Fosfato buferinis tirpalas (PBS)	
Tripsinas / Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA)	
Vanduo be nukleazių	
RPMI terpė (be fenolio)	Corning
Medžio anglimi apdorotas FBS	Genetex
Embrioninis veršelio serumas (FBS)	Gibco
Arklio serumas	
N2 priedas	
SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit	Meridian Bioscience
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	
Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus	Zymo Research
Etanolis, 96 %	Vilniaus degtinė
Tripiano mėlis	Sigma-Aldrich
Deksametazonas	Cayman Chemical
IBMX	
Indometacinas	
β-glicerofosfatas	
Askorbo rūgštis	
Medroksiprogesterono acetatas (MPA)	
Retinoinė rūgštis	
Tripiano mėlis	Sigma-Aldrich
Oil Red O	
Alizarin Red S	
Kristalo violetas	
Dibutiril-cAMP (db-cAMP)	Selleckchem
Pirminiai antikūnai prieš žmogaus Acetyl-H4 (06-866)	Sigma-Aldrich
Pirminiai antikūnai prieš žmogaus β-aktiną (ab8229)	Abcam
Pirminiai antikūnai prieš žmogaus krienų peroksidazę (R-05072-500) ir H4	Advansta
Zymo-Spin ChIP Kit	Zymo Research
WesternBright™ ECL aptikimo rinkinys	Advansta
Quick-DNA/RNA Miniprep	Zymo Research
Universal qPCR Master Mix	Luna

2.2 Metodai

2.2.1. Ląstelių linijos

Žmogaus enSL išskirtos iš endometriumo biopsijos gautos iš Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Akušerijos ir ginekologijos centro Santaros vaisingumo centro. Šiam tyrimui atlikti suteiktas Vilniaus regiono biomedicinių tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 158200-18/7-1049-550).

2.2.2. Ląstelių kultivavimas

Žmogaus enSL, išskirtos iš endometriumo biopsijos, perkeliama į ląstelių auginimo flakonėlius su pilna mitybine terpe, sudaryta iš DMEM/F12 tirpalo praturtinto 10 % FBS ir 0,5 % PS. Ląstelės kultivuojamos inkubatoriuje, palaikant 5 % CO₂ koncentraciją ir +37 °C temperatūrą. Mitybinė terpė keičiama kas 2 – 3 dienas. Ląstelės persėjamos naudojant 1 X tripsino / EDTA tirpalą.

2.2.3. Ląstelių diferencijavimas

Tiriamos ląstelių *in vitro* diferenciacijos į adipogeninę, osteogeninę, miogeninę, neurogeninę linijas bei jų decidualizacija. Kokybiškai diferenciacija vertinama dažant ląsteles atitinkamais dažais, decidualizacija vertinama tiriant genų raiškos pokyčius.

Prieš indukciją ląstelės užsėjamos į kultivavimo plokšteles su šulinėliais RNR skyrimui ir dažymui. RNR skyrimui iš adipogeninės, osteogeninės, miogeninės krypties diferenciacijų užsėjama po 100 tūkst. ląstelių į šulinėlį, neurogeninei diferenciacijai užsėjama 85 tūkst. Chondrogeninei diferenciacijai ląstelės užsėjamos suformuojant 5 lašus po 100 tūkst. ląstelių. Dažymui adipogeninės, osteogeninės, miogeninės diferenciacijos ląstelių užsėjama po 25 tūkst. į šulinėlį, neurogeninei 17 tūkst., chondrogeninei 50 tūkst ląstelių (šulinėlyje formuojamas vienas koncentruotas ląstelių lašas). Decidualizacijai ląstelės užsėjamos į flakonėlius. Visos ląstelės auginamos pilnoje mitybinėje terpėje iki 80 – 85 % konfluencijos, išskyrus neurogeninę diferenciaciją, kuriai reikalinga 50-60 % konfluencija. Chondrogeninei diferenciacijai šulinėliai inkubatoriuje laikomi tik valandą, jame palaikoma 5 % CO₂ koncentracija ir 37 °C temperatūra ir iškart pilama diferenciacinė terpė. Mitybinė terpė keičiama kas 2 – 3 dienas ir pasiekus reikiamą konfluenciją užpilamos diferenciacinės terpės.

Adipogeninei diferenciacijai sukelti naudojama terpė, kurią sudaro DMEM (4,5 g/l gliukozės), 10 % FBS, 1 % PS, 1 μM deksametazono, 0,5 mM IBMX, 60 μM indometacino. Ląstelės diferencijuojamos apie dvi savaites.

Osteogeninės diferenciacijos terpės sudėtis: DMEM (1g/l gliukozės), 10 % FBS, 1 % PS, 0,1 μM deksametazono, 10 mM β–glicerofosfato, 50 μg/ml askorbo rūgšties. Diferencijuojama apie 2 savaites.

Miogeninei diferenciacijai sukelti naudojama terpė su DMEM (1 g/l gliukozės), 2 % arklio serumo, 1 % PS. Diferencijuojama apie 2 savaites.

Neurogeninė terpę sudaro DMEM/F12, 1 % PS, 1 % N2 priedo ir 1,5 μ M RR. Diferenciacija vertinama po maždaug 10 parų.

Chondrogeninei diferenciacinei terpei pagaminti naudota DMEM (4,5 g/L gliukozės), 1 % PS, 0,1 % deksametazono, 50 μ g/ml askorbo rūgšties, ITS 1 X (Insulinas 5 μ g/ml; Transferinas 2 mg/ml; Seleno rūgštis 1 mg/ml), 10 ng/ml TGF- β 3, 1 mM natrio piruvato ir 0,35 mM prolino. Diferencijuojama apie 2 savaites.

Ląstelių decidualizacija sukelti naudojama terpė iš RPMI (be fenolio), 2 % medžio anglimi apdoroto FBS, 0,5 mM db-cAMP, 1 % PS, dalis ląstelių auginama terpėje su papildomu 1 μ M MPA. Ląstelės diferencijuojamos 6 ir 24 val., poto iškart skiriama RNR ir DNR. Chromatino imunoišsodinimui (ChIP) bei *Western blot* metodui ląstelės diferencijuojamos 6, 24 ir 72 val.

Kontrolinės ląstelės užsėjamos į šulinėlius dažymui ir į flakonėlius RNR bei DNR skyrimui. Auginamos pilnoje mitybinėje terpėje, kol konfluencija pasiekia apie 85 – 90 % ir toliau naudojamos eksperimentuose.

2.2.4. Ląstelių dažymas

Adipogeninei diferenciacijai įvertinti ląstelės fiksuojamos 4 % paraformaldehido tirpalu 15 min KT, poto praplaunama 2 kartus su PBS. Ląstelės dažomos *Oil Red O* tirpalu (pradinis tirpalas paruoštas izopropanolyje praskiestas vandeniu santykiu 3:2) 15 min KT, praplaunama 3 kartus distiliuotu vandeniu ir fotografuojama mikroskopu.

Osteogeninės diferenciacijos ląstelės fiksuojamos 75 % šaltu EtOH 30 min KT, poto praplaunama 2 kartus distiliuotu vandeniu. Dažoma *Alizarin Red S* tirpalu (paruoštu vandenyje, pH 5,5) 2 – 3 min, praplaunama 3 kartus distiliuotu vandeniu ir iškart fotografuojama mikroskopu.

Neurogeninei ir **miogeninei** diferenciacijoms įvertinti ląstelės fiksuojamos 30 min KT 0,1 % kristalo violeto tirpalu, paruoštu 20 % etanolyje. Poto dažas nuplaunamas 3 kartus distiliuotu vandeniu ir fotografuojama mikroskopu.

Chondrogeninės diferenciacijos ląstelės fiksuojamos 4 % paraformaldehidu 30 min KT. Poto praplaunama 2 kartus distiliuotu vandeniu ir dažoma 1 % *Alcian Blue* tirpalu, paruoštu su 0,1 N HCl, laikoma per naktį (apie 16 val.). Tuomet praplaunama 3 kartus distiliuotu vandeniu ir fotografuojama mikroskopu.

Kontrolinės ląstelės dažomos aprašytais būdais atitinkamais dažais, siekiant palyginti jas su diferencijavusių ląstelių linijomis.

2.2.5. RNR skyrimas

Siekiant įvertinti diferenciacijai būdingų genų raiškos pokyčius, išskiriama diferencijuotų ir kontrolinių ląstelių **RNR**. Tam naudojamas *Direct-zolTM RNA MiniPrep Plus* (Zymo Research, JAV) rinkinys. Ląstelės lizuojamos *TRIzol®* reagentu (40 µl/cm²) 5 min KT. Perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlį be ribonukleazių (RNazių). Į lizatą pridedamas vienodas tūris 96 % EtOH, sumaišoma purtyklėje. Mėgintuvėlio turinys perkeliamas į *Zymo-SpinTM IIICG* kolonėlę, patalpintą į naują surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama, centrifugatas nupilamas. Visi centrifugavimai atliekami 12000 xg greičiu, 30s, KT, nebent nurodyta kitaip. Į kolonėlę įpilama RNR plovimo buferio ir centrifuguojama, centrifugatas nupilamas. Pasiruošiamas DNR nukleazės mišinys visiems mėginiams: atsižvelgiant į mėginių skaičių X, į mėgintuvėlį be RNazių įpilama $5 \times (X+2)$ µl DNazės I (6 U/µl) ir $75 \times (X+2)$ µl DNR smulkinimo buferio. Mišinys po 80 µl perkeliamas į kiekvieno mėginio kolonėlę ir inkubuojama 15 min KT. Į kolonėlę įpilama RNR buferio prieš plovimą (angl. *pre-wash*) ir centrifuguojama, centrifugatas nupilamas. Plovimas kartojamas 2 kartus. Į kolonėlę įpilama RNR plovimo buferio ir centrifuguojama 2 min. Kolonėlė perkeliama į 1,5 ml mėgintuvėlį be RNazių, įpilama 20 µl vandens be nukleazių, kelias minutes inkubuojama KT ir centrifuguojama. Išskirtos RNR koncentracija (ng/µl) ir grynumas įvertinamas su nanofotometru. Mėgintuvėlis su RNR saugomas –80 °C temperatūros šaldiklyje iki panaudojimo kopijinės DNR (kDNR) sintezėje.

2.2.6. kopijinės DNR (kDNR) sintezė

kDNR sintezei naudojamas *SensiFASTTM cDNA Synthesis Kit* (Meridian) rinkinys, užtikrinantis efektyvią pirmos grandinės kDNR sintezę iš nedidelio kiekio pradinės RNR.

Reakcijos mišinys ruošiamas X RNR mėginių skaičiui. Į atskirą mėgintuvėlį be RNazių įpilama $4 \times (X+2)$ µl *5X TransAmpTM* reakcijos buferio, $1 \times (X+2)$ µl atvirkštinės transkriptazės. Mišinys sumaišomas purtyklėje. Į atskirus mėgintuvėlius be RNazių įpilamas atitinkamas tūris vandens be nukleazių (kad galutinis tūris būtų 20 µl), 5 µl reakcijos mišinio ir apskaičiuotas reikalingas tūris RNR mėginio (200 ng). Mėginiai sumaišomi purtyklėje. Termocikleryje nustatoma gamintojo nurodyta programa kDNR sintezei: inkubacija 10 min +25 °C, inkubacija 15 min +42 °C, inkubacija 5 min +85 °C. Susintetinta kDNR praskiedžiama 10 kartų vandeniu be nukleazių ir laikoma –20 °C temperatūroje iki panaudojimo realaus laiko kiekybinėje polimerazės grandininėje reakcijoje (RL–kPGR).

2.2.7. Realaus laiko kiekybinė PGR (RL-kPGR)

Norint nustatyti genų raiškos pokyčius, atliekama **RL-kPGR reakcija**, naudojant *SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit* (Meridian) rinkinį. Tyrime naudotos pradmenų sekos pateikiamos **2.2 lentelėje**.

2.2 lentelė. RL-kPGR naudotų pradmenų sekos

Genas	Tiesioginio pradmens seka	Atvirkštinio pradmens seka
<i>PRL</i>	5'-TGACCCTTCGAGACCTGTTTG	5'-CTTGCTCCTTGTCTTCGGG
<i>IGFBP1</i>	5'-TTTTACCTGCCAAACTGCAACA	5'-CCCATTCGAAGGGTAGACGC

Visi reagentai laikomi šaldomame stovelyje. Paruošiamas reakcijos mišinys, kurį sudaro 5 µl *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* 2X, 2,6 µl vandens be nukleazių, po 0,2 µl specifinių genui tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (2.2 lentelė). Mišinys išpilstomas po 8 µl į atšaldytus kPRG mėgintuvėlius ir dar įpilama po 2 µl 10 kartų skiestos kDNR. Į nespecifinės sąveikos kontrolinius mėginius įpilama 2 µl vandens be nukleazių. Kiekvienam mėginiui atliekami du pakartojimai. RL-kPGR reakcija atlikta *Rotor-Gene™ 6000* termocikleryje, pagal programą, pateikiamą **2.3 lentelėje**. Pasibaigus reakcijai nustatoma reakcijos produktų lydimosi temperatūra: kaitinama +50 °C - 99 °C temperatūroje.

2.3 lentelė. RL-kPGR naudota programa

	Temperatūra	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija, polimerazės aktyvinimas	95 °C	2 min	1
Denatūracija	95 °C	5 s	40
Pradmenų prikibimas prie matricinės DNR	60 °C	10 s	
DNR kopijos ilginimas	72 °C	20 s	

Gauti rezultatai analizuojami *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* programa. Parenkamas slenkstis (0,2), jog atskirti nespecifinės sąveikos mėginius. Ciklo reikšmės, ties kuriomis buvo kertamas slenkstis, atitinka reikšmes, kai jau aptinkamas pradinės medžiagos kiekis mėginyje. Šios reikšmės vadinamos C_T reikšmėmis. Genų raiškos pokyčiui įvertinti pasitelkiamas $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodas. Kaip referentinis genas naudotas *GAPDH*. Apskaičiavus tiriamojo mėginio ir *GAPDH* geno C_T verčių skirtumą gaunama ΔC_T reikšmė (**1 formulė**). Tada randama $\Delta\Delta C_t$ reikšmė (**2 formulė**) ir apskaičiuojama santykinė geno raiška (**3 formulė**).

$$1) \Delta C_t = C_t (\text{tiriamo geno}) - C_t (\text{GAPDH})$$

$$2) \Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{tiriamo mėginio}) - \Delta C_t (\text{tiriamo mėginio kontrolės})$$

$$3) \text{Santykinė geno raiška} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.2.8. Western blot analizė

Bendriems **H4 hiperacetilavimo (H4hiperAc)** modifikacijos lygio pokyčiams enSL decidualizacijos metu įvertinti atlikta **Western blot analizė**. Tyrimui naudoti iš kontrolinių ir indukuotų decidualizacijai enSL išskirti baltymai.

Baltymai išfrakcionuojami atliekant elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAGE) 7,5 – 15 % gradientinio elektroforezės gelyje (**2.4 lentelė**). Paruošiami gradientinio gelio sunkusis bei lengvasis tirpalai ir supilami į gradientatorių. Gelio užpylimo forma prijungiama prie gradientatoriaus. Įjungus pompą, tirpalai palaipsniui maišosi tarpusavyje ir lėtai teka į gelio užpylimo formą. Geliai paliekami polimerizuotis 2 – 2,5 val., vėliau laikomi +4 °C elektroforezės buferiniame tirpale.

2.4 lentelė. Gradientinio gelio sudėtis

Medžiaga	Sunkus tirpalas (15 % AA/bisAA)	Lengvas tirpalas (7,5 % AA/bisAA)
ROTIPHORESE Gel 30 (37.5:1) (Carl Roth)	7,5 ml	3, 75 ml
Skirstomojo gelio buferis (Tris-Cl / NDS, pH 8,8, 4X)	3,75 ml	3,75 ml
87 % Glicerinas	1,02 ml	-
H ₂ O	2,73 ml	7,5 ml
10 % APS	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Ant paruoštų gradientinių gelių užpilamas 4 % koncentruojantis gelis (**2.5 lentelė**), įstatomos šukutės ir paliekama stingti 20-30 min. Surenkamas baltymų elektroforezės aparatas, įstatomas paruoštas gelis ir užpilama elektroforezės buferinio tirpalo (1X NDS-PAGE). Elektroforezė vykdoma esant 25 mA stiprumo srovei apie 2 val.

2.5 lentelė. Western blot naudojamų tirpalų sudėtis

4 % koncentruojantis gelis	• 1,5 ml 4 % koncentruojančio akrilamido/bisakrilamido (AA/bisAA) gelio tirpalo; • 60 µl 10 % APS; • 3 µl TEMED.
4 % koncentruojančio AA/bisAA gelio tirpalas (10 ml)	• 1,3 ml LAA/bisAA tirpalo; • 2,5 ml Tris/Cl-NDS, pH 6,8 4 X; • 6,5 ml dejonizuoto vandens (dH₂O).
60 µl 10 % amonio persulfatas (APS)	• 20 mg Amonio persulfato; • iki 200 µl dH₂O.
Koncentruojančio gelio buferis Tris-Cl / NDS, pH 6,8, 4 X	• 0,5 M Tris; • 0,4 % NDS • iki 100 ml dH₂O

2.5 lentelės tęsinys	
Gradientinio gelio buferis Tris-Cl / NDS, pH 8,8, 4 X	• 1,5 M Tris; • 0,4 % NDS • iki 500 ml dH₂O
10 X NDS-PAGE buferis	• 30 g Tris bazės; • 144 g glicino; • 10 g NDS; • iki 1 l dH₂O.
10 X baltymų pernešimo buferis	• 30 g Tris bazės; • 144 g glicerino; • iki 1 l dH₂O.
Pirminių antikūnų skiedimo tirpalas (4 % pienas (su 0,05 % PBST))	• 0,6 g pieno miltelių; • 15 ml 0,1 % PBST
Antrinių antikūnų skiedimo tirpalas (2 % pienas (su 0,1 % PBST))	• 0,3 g pieno miltelių; • 15 ml 0,1 % PBST.

Po elektroforezės atliekamas baltymų pernešimas ant PVDF membranų. Pernešimas vykdomas per naktį +4 °C (apie 16 val.), esant 125 mA srovei, naudojant 1 X baltymų pernešimo buferį.

Toliau atliekamas membranų blokavimas pieno tirpalu. Membrana inkubuojama 1 val. KT 5 % pieno tirpale (ruoštime su 0,1 % PBST) ant vartyklės. Tiksliniai baltymai aptikti naudojant pirminius antikūnus prieš žmogaus Acetyl-H4 (06-866, Sigma–Aldrich) ir H4 (Advansta). Antikūnai skiedžiami pirminių antikūnų skiedimo tirpalu pagal gamintojo rekomendacijas ir užpilami ant membranų, inkubuojama 2 val. KT. Tada membranų plaunamos 3 kartus po 15 min su 0,1 % PBST tirpalu ant vartyklės, KT. Vėliau inkubuojama 1 val. KT ant vartyklės su antriniais antikūnais konjuguotais su krienų peroksidaze. Antikūnai skiesti pagal gamintojo rekomendacijas antrinių antikūnų skiedimo tirpalu. Vėl kartojamas membranų plovimas, paskutinį kartą su PBS tirpalu.

Chemoiliuminescencinė detekcija vykdoma su *WesternBright™ ECL* aptikimo rinkiniu (Advansta), į kurį įeina krienų peroksidazės substratas. Rinkinio tirpalai sumaišomi santykiu 1:1. Membrana dedama į substratą ir inkubuojama 5 min, detekcija atliekama tamsoje. Prie antrinių antikūnų konjuguotai krienų peroksidazei reaguojant su substratu išspinduliuojama šviesa, kuri registruojama *ChemiDoc™ XRS+* vaizdinimo sistemoje, o vaizdų analizei naudojama *ImageLab* programa.

2.2.9. Chromatino imunoišsodinimas (ChIP)

Baltymų ir DNR sąveikai tirti naudojamas **chromatino imunoišsodinimas (ChIP)**. Šis metodas leidžia iš viso ląstelės chromatino išskirti tik su tiksliniu baltymu sąveikaujančią DNR. Toliau išgaautos DNR sekos tiriamos kPGR metodu. ChIP atliktas su *Zymo Research Zymo-Spin ChIP Kit* rinkiniu.

Ląstelių flakonėliuose kultivuotos kultūros veikiamos 1 % formaldehido tirpalu ir inkubuojamos 37 °C 10 min. DNR ir baltymų sąveikų fiksavimas sustabdomas pridedant glicino iki galutinės 0,125 M koncentracijos ir inkubuojama 5 min KT ant vartyklės. Ląstelės plaunamos du kartus PBS su proteazių inhibitoriais 1 X PIC, 1 mM PMCF ir 10 mM natrio butirato (NaBut). Tuomet ląstelės perkeliama į naują 1,5 ml mėgintuvėlį.

Tolimesniuose žingsniuose naudojami buferiai, mėgintuvėliai laikomi šaltai ant ledo. Mėgintuvėliai su ląstelėmis centrifuguojami 3000 x g 1 min 4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos resuspenduojamos PBS su 1 X PIC, 1 mM PMCF, 1 mM natrio butirato (NaBut). Centrifuguojama 3000 x g 1 min +4 °C temperatūroje, supernatantas pašalinamas. Plovimo žingsnis kartojamas.

Ląstelių nuosėdos resuspenduojamos branduolių paruošimo buferyje su 1 X PIC, 1 mM PMCF, 1 mM natrio butirato (NaBut). Lengvai papurtoma ir inkubuojama ant ledo 5 min. Mėginiai centrifuguojami 3000 x g 1 min +4 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas ir nuosėdos resuspenduojamos atšaldytame chromatino smulkinimo buferyje su 1 X PIC, 1 mM PMCF, 1 mM natrio butirato (NaBut), inkubuojama ant ledo 5 min. Mėginiai perkeliama į sonifikavimo mėgintuvėlius DNR fragmentacijai. Sonifikuojama Diagenode aparatu, atliekami 4 sonifikavimo ciklai: 30 s įjungta, 30 sek išjungta. Tuomet centrifuguojama 12000 x g 5 min ir supernatantas su smulkintu chromatinu perkeliama į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį. ChIP reakcijos mėginių sudėtis pateikiama **2.6 lentelėje**.

2.6 lentelė. ChIP reakcijos mėginiai

Smulkintas chromatinas	100 µl
Antikūnas prieš acetilintą H4 (o NK atveju – antikūnai prieš triušio IgG)	5 µl (NK – 2 µl)
Chromatino skiedimo buferis	865 µl (NK – 868 µl)
100 X PIC	10 µl
0,1 M PMSF	10 µl
NaBut	10 µl
Galutinis tūris	1 ml

ChIP mėginiais naudojamas antikūnas prieš žmogaus H4hiperAc, o neigiamoms kontrolėms (NK) nespecifiškai besijungiantis triušio imunoglobulinas G (IgG) (Advansta). Į švarius 1,5 ml mėgintuvėlius atsidedama po 10 µl smulkinto chromatino, kuris bus naudojamas kaip bendro DNR

kiekio kontrolė (toliau vadinama ChIP DNR Input). ChIP reakcijos mėginiai inkubuojami per naktį (apie 16 val.) vartant, 4 °C temperatūroje. Į ChIP mėginius pridedama *ZymoMag* baltymo A magnetinių dalelių ir inkubuojama 1 val. vartant, 4 °C temperatūroje. Poto mėginiai dedami ant magnetinio stovo. Supernatantas pašalinamas, taip mėginyje lieka tik baltymo A / Anti–Acetyl–H4 arba IgG / chromatinio kompleksai. Toliau magnetinės dalelės plaunamos chromatinio plovimo buferiais (I, II ir III). Su kiekvienu buferiu inkubuojama 4 min ant vartyklės, +4 °C temperatūroje. Po kiekvienos inkubacijos mėginiai dedami ant magnetinio stovo, atsargiai pašalinamas supernatantas. Tuomet magnetinės dalelės resuspenduojamos DNR eliacijos buferyje ir mėgintuvėlio turinys perkeliamas į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį. Mėgintuvėliai vėl pastatomi ant magnetinio stovo, pašalinamas supernatantas.

5 X chromatinio eliacijos buferis skiedžiamas iki 1 X koncentracijos ir užpilama ant magnetinių dalelių. Į ChIP DNR Input kontroles taip pat įpilama 1 X chromatinio eliacijos buferio, kad mėginių tūriai būtų vienodi. Į mėginius pridedama 5 M NaCl ir inkubuojama 5 min 75 °C temperatūroje, poto centrifuguojama 10000 x g 30 s KT. Mėgintuvėliai statomi ant magnetinio stovo ir magnetinėms dalelėms susikaupus eliuatas (ChIP DNR) perkeliamas į švarius 1,5 ml mėgintuvėlius. Inkubuojama +65 °C temperatūroje 30 min. Siekiant iš mėginio pašalinti baltymus pridedama proteinazės K ir inkubuojama +65 °C temperatūroje 90 min.

Į ChIP DNR ar ChIP DNR Input mėginius įpilama ChIP DNR prisijungimo buferio santykiu 5:1. Turinys perkeliamas į Zymo–Spin IC kolonėlę, patalpintą į naują surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguojama 10000 x g 30 s KT, centrifugatas nupilamas. Į kolonėlę įpilama DNR plovimo buferio, centrifuguojama 10000 x g 30 s KT. Plovimo žingsnis kartojamas. Tada kolonėlė perkeliama į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį ir ant membranos užlašinama DNR eliacijos buferio. Mėgintuvėlis 1 min palaikomas KT ir centrifuguojamas 10000 x g 30 s. Eliacijos žingsnis kartojamas. Mėginiai saugomi –20 °C temperatūroje.

2.2.10. Metilintos DNR imunoišsodinimas (MeDIP)

Siekiant nustatyti kaip enSL *in vitro* decidualizacijos metu kinta DNR sekų metilinimas, atliekamas metilintos **DNR imunoišsodinimas (MeDIP)** su antikūnu prieš 5–mC.

DNR išskiriama iš kontrolinių ir decidualinių enSL naudojant *Quick-DNA/RNA Miniprep* (Zymo Research). Pirmiausia ląstelės lizuojamos užpilant DNR/RNR lizės buferio. Ląstelės perkeliama į kolonėlę su *Spin–Away*TM filtru, įstatytu į naują surinkimo mėgintuvėlį. Ant kolonėlės užpilama 400 µl DNR/RNR paruošimo buferio ir centrifuguojama 10000 x g 30 s, centrifugatas nupilamas. Toliau atliekamas plovimas su DNR/RNR plovimo buferiu ir centrifuguojama 10000 x g 30 s, centrifugatas nupilamas. Plovimo žingsnis kartojamas, centrifuguojama 10000 x g 2 min. Kolonėlė perkeliama į

švarų 1,5 ml mėgintuvėlį, ant filtro užlašinama 100 µl vandens be nukleazių. Mėgintuvėlis 2 min palaikomas KT ir centrifuguojamas 10000 x g 30 s. Mėginiai naudojami iškart arba saugomi –20 °C temperatūroje.

Išskirta genominė DNR sonifikuojama naudojant *Bioruptur® Pico* (Diagenode) sonifikavimo prietaisą. Sonifikavimui DNR skiedžiama iki 10 ng/µl TE buferyje. Atliekami 7 sonifikavimo ciklai: 15 s įjungta, 90 s išjungta. Fragmentuotos DNR ilgiai įvertinami atliekant elektroforezę. Gauti fragmentai pasiskirsto 200 – 500 bp intervale.

320 ng kiekvieno mėginio sonifikuotos DNR atidedama ir naudojama kaip genomines DNR kiekio kontrolė (MeDIP DNR Input). Likusi sonifikuota DNR panaudojama metilintų fragmentų imunoišsodinimui. Prieš inkubaciją su antikūnu, DNR denatūruojama +95 °C 10 min. Po denatūracijos DNR mėginiai pernešami ant ledo ir tolimesnės procedūros atliekamos šaltai. 320 ng sonifikuotos ir denatūruotos DNR inkubuojama su 0,8 µl 1 mg/1 ml antikūnu prieš 5–mC (Eurogentec) ir 15 µl *ZymoMag* baltymo A magnetinių dalelių, +37 °C 1 val. variant. Kaip neigiama MeDIP kontrolė naudojamas triušio IgG. Imunoišsodinta DNR surenkama naudojant magnetinį mėgintuvėlių stovėlį. Mėginiai inkubuojami +75 °C 10 min, kad antikūnas būtų inaktyvuotas ir DNR atsiskirtų nuo magnetinių dalelių. Magnetinės dalelės nusodinamos nusukant mėginius 2 min mini centrifugoje. Supernatantas su metilinta DNR perkeliamas į švarų 1,5 ml mėgintuvėlį. Mėginiai saugomi –20 °C temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

2.2.11. Kiekybinė PGR (kPGR)

Norint kiekybiškai įvertinti bendros DNR ir imunoišsodintos DNR kiekius, atliekama **kiekybinė PGR (kPGR)**, naudojant *Luna Universal qPCR Master Mix*. Tyrime naudojamos pradmenų sekos pateikiamos **2.7 lentelėje**.

2.7 lentelė. kPGR naudotų pradmenų sekos

Geno pavadinimas	Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo
<i>HAND2</i> promotorius	TACTAGCGGTTTTACGGGCG	GGCTGCGGGCTCAATTTATAG
<i>HAND2</i> egzonas	TGAGGAGGTAGCCAATCCTG	AGGGCCGCTCGGGTTAATA
<i>FOXO1</i> promotorius	GCTCTGCTGCTCCGTAGTAA	TCTCTCGCCTTCTCAGTGTT
<i>FOXO1</i> egzonas	TGGAGTACATTTCGCCCTCG	AGTAGAGGCCATCTTTGCGG
<i>HOXA10</i> promotorius	ATGTGGTCGTAAACCCGTCC	CAGCCCCTGCTATTGAGAT
<i>HOXA10</i> egzonas	AAGAGTGGTCGGAAGAAGCG	GACGCTGCGGCTAATCTCTA
<i>STAT5A</i> promotorius	GGGGCGCTGGCTAGTTTAT	AAACTCAACCCTGACGGAGG
<i>STAT5A</i> egzonas	CACCCGCAAGTAATTGTGCC	TGGATGCAAGGACAAAGCGG

2.7 lentelės tęsinys		
WNT4 promotorius	TCCTCCCAATCACAGCGTCT	GTGGGAATCCGAAACCTCGC
WNT4 egzonas	AACTGCTCCACACTCGACTC	TGCTCACGAGCGTCTCATTT
ACTB promotorius	CCTCCAAGAGCTCCTTCTGC	TGTGGACATCTCTTGGGCAC

Visi reagentai ir mėgintuvėliai laikomi šaldomame stovelyje. ChIP mėginiai ir ChIP DNR Input kontrolės skiedžiamos 5,5 karto pridedant vandens be nukleazijų. MeDIP ir MeDIP DNR Input mėginiai skiedžiami pridedant vandens be nukleazijų iki 75 µl. Paruošiamas bendras reakcijos mišinys, į kurį įeina 5 µl *Luna® Universal qPCR Master Mix*, 3,5 µl vandens be nukleazijų, po 0,25 µl specifinių tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (**2.7 lentelė**). Mišinys išpilstomas po 9 µl į kPRG mėgintuvėlius ir į juos įpilama po 1 µl skiestos DNR. Į PGR taršos kontrolinius mėginius (NK – PGR) įpilamas 1 µl vandens be nukleazijų. Kiekvienam mėginiui atliekami du pakartojimai. kPGR reakcija vykdoma *Rotor-Gene™ 6000* termocikleryje, pagal programą, pateikiamą **2.8 lentelėje**. Pasibaigus reakcijai produktai kaitinami +60 °C – 95 °C temperatūroje, norint išsiaiškinti jų lydymosi temperatūrą.

2.8 lentelė. kPGR naudota programa

	Temperatūra	Trukmė	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija, polimerazės aktyvinimas	95 °C	60 s	1
Denatūracija	95 °C	15 s	40
Pradmenų prikibimas ir DNR grandinės ilginimas	60 °C	30 s	
Lydymosi temperatūros nustatymas	60-95 °C	įvairi	1

Gauti rezultatai analizuojami *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* programa. Matuojamos mėginių Ct reikšmės – PGR ciklų, reikalingų fluorescenciniam signalui pasiekti slenkstinį lygį vertės. Kuo daugiau DNR yra mėginyje, tuo mažesnė Ct reikšmė, nes prireikia mažiau ciklų slenkstinei vertei pasiekti. Rezultatų normalizavimui kaip referentinis genas naudojamas *GAPDH*. ChIP analizei reikalingos trys Ct reikšmės: 10 % ChIP DNR Input kontrolės, ChIP mėginio su Anti-acetyl-H4 antikūnu ir ChIP mėginio su IgG. MeDIP analizei taip pat reikalingos trys Ct reikšmės: 100 % MeDIP DNR Input kontrolė, MeDIP mėginys su Anti-5-mC antikūnu ir MeDIP mėginys su IgG. ChIP DNR Input Ct vertę reikia normalizuoti, kadangi ChIP DNR Input mėginyje esantis DNR kiekis yra 10 kartų mažesnis nei ChIP mėginyje. Pirmiausia paskaičiuojama ΔCt (**4 formulė**), parodanti skirtumą tarp DNR Input kontrolės ir tikslinio mėginio. Tas pats atliekama ir su NK mėginiais. Toliau apskaičiuojama kokią procentą nuo DNR Input sudaro ChIP / MeDIP mėginiai (**5 formulė**). Tada apskaičiuojama kokią procentą nuo DNR Input sudaro ChIP / MeDIP mėginys (**6 formulė**).

$$4) \Delta Ct = Ct (100 \% \text{ ChIP DNR Input} / \text{MeDIP DNR Input}) - Ct (\text{ChIP} / \text{MeDIP m\acute{e}ginio})$$

$$5) \text{ Imunoi\ss{dintos DNR kiekis, \%} = 100 \times 2^{-\Delta Ct}$$

$$6) Ct (100 \% \text{ DNR Input}) = Ct (\text{DNR Input}) - \log_2 10$$

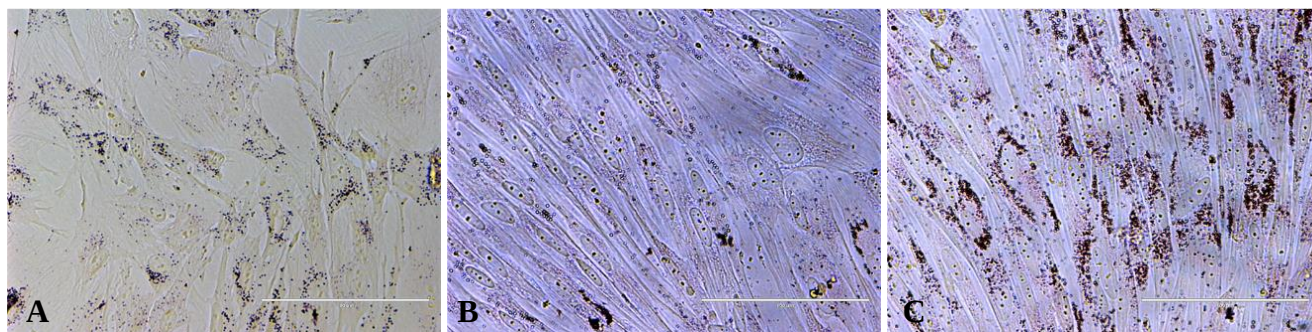
Statistinė duomenų analizė atliekama su programine įranga *GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc)*. Naudojamas neparametrinis Mano – Vitnio testas, įvertinamas skirtumų tarp analizuotų grupių medianų patikimumas. Reikšmingumo lygmuo (angl. *α value*) 0,05.

3. REZULTATAI

3.1. Endometriumo stromos ląstelių diferenciacija

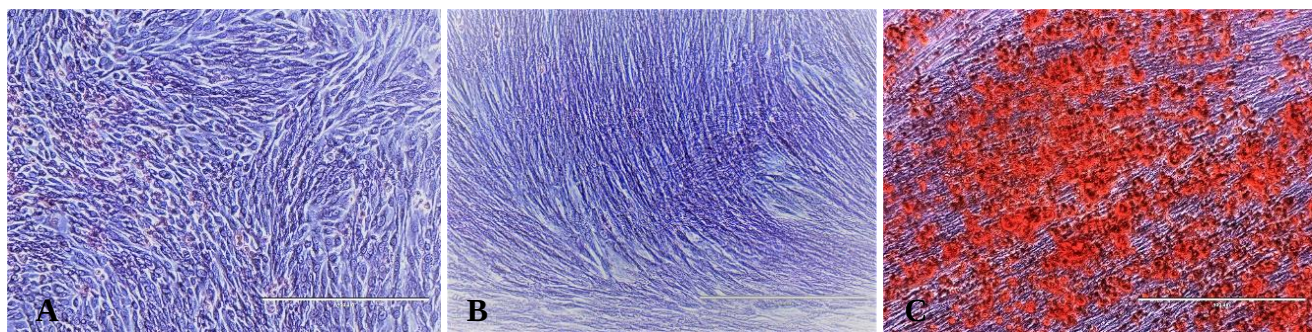
EnSL diferenciacijos plastiškumas vertintas indukuojant jas **adipogeninės, osteogeninės, miogeninės, neurogeninės ir chondrogeninės diferenciacijos** kryptimis. Diferenciacijos sukeltos auginant ląsteles skirtingose terpėse, turinčiose specifinių diferenciacijos induktorių. Visos diferenciacijos truko 15 dienų, išskyrus neurogeninę, kuri truko 10 dienų. Diferenciacijos efektyvumas kokybiškai įvertintas dažant ląsteles specifiniais dažais.

Adipogeninei diferenciacijai sukelti naudoti deksametazonas, IBMX ir indometacinas. Ląstelės dažytos *Oil Red O* dažais. Diferencijuotos ląstelės tapo apvalesnės, jose aiškiai matyti daug raudonai nusidažusių lipidinių vakuolių (**3.1 pav.**).



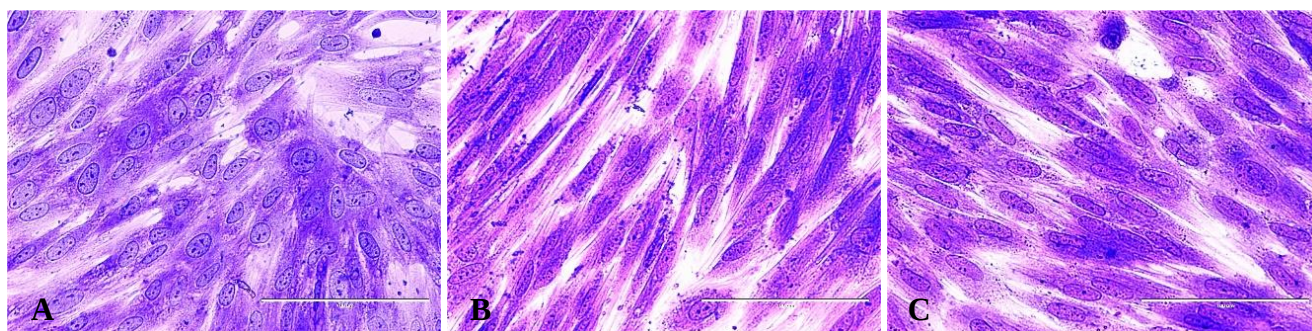
3.1 pav. Adipogeninės diferenciacijos kokybinis įvertinimas. A – Kontrolė. B – Adipogeninės diferenciacijos ląstelės po 5 d. C – Adipogeninės diferenciacijos ląstelės po 15 d. Mastelis 100 μm .

Kaip pagrindiniai **osteogeninės diferenciacijos** induktoriai naudoti deksametazonas, askorbo rūgštis ir β -glicerofosfatas. Ląstelės dažytos *Alizarin Red S* dažais. Po indukcijos stebimi raudona spalva nusidažę kalcifikatai, rodantys vykstančią mineralizaciją (**3.2 pav.**).



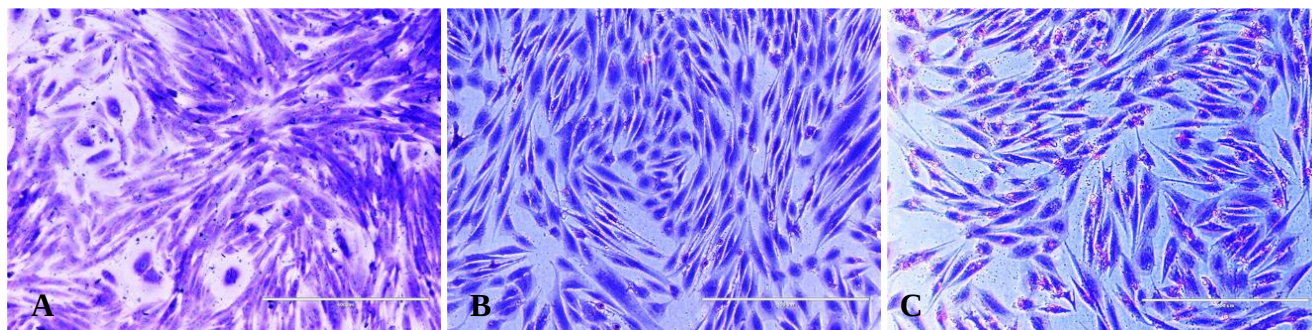
3.2 pav. Osteogeninės diferenciacijos kokybinis įvertinimas. A – Kontrolė. B – Osteogeninės diferenciacijos ląstelės po 5 d. C – Osteogeninės diferenciacijos ląstelės po 15 d. Mastelis 400 μm .

Miogeninei diferenciacijai indukuoti naudotas arklio serumas. Dažyta kristalo violeto tirpalu siekiant įvertinti ląstelių morfologinius pokyčius. Tarp miogenine kryptimi indukuotų ląstelių, po 15 d. diferenciacijos, matyti susiliejusių daugiabranduolių ląstelių, jos pasidarė pailgesnės (**3.3 pav.**).



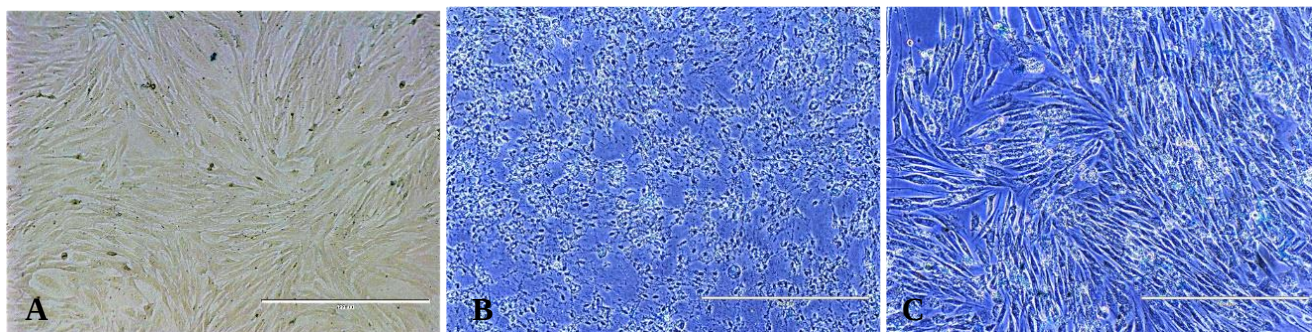
3.3 pav. Miogeninės diferenciacijos kokybinis įvertinimas. A – Kontrolė. B – Miogeninės diferenciacijos ląstelės po 5 d. C – Miogeninės diferenciacijos ląstelės 15 d. Mastelis 100 μm .

Neurogenine kryptimi ląstelės diferencijuotos su komerciniu N2 priedu ir RR. Kaip ir miogeninėje diferenciacijos atveju, diferencijuotos ir kontrolinės ląstelės dažytos kristalo violeto tirpalu. Jau po 5 d. indukcijos matyti pakitusi ląstelių morfologija. Ląstelės tapo panašesnės į neuronų tipo ląsteles, nes suformavo jiems būdingas pailgas citoplazmines ataugas (**3.4 pav.**).



3.4 pav. Neurogeninės diferenciacijos kokybinis įvertinimas. A – Kontrolė. B – Neurogeninės diferenciacijos ląstelės po 5 d. C – Neurogeninės diferenciacijos ląstelės po 10 d. Mastelis 400 μm .

Kaip pagrindinis **chondrogeninės diferenciacijos** induktorius naudotas TGF- β 3. Diferencijavusios ląstelės ėmė kaupti chondrocitams būdingus gliukozaminoglikanus, įeinančius į proteoglikanų sudėtį. Nudažius matyti mėlyni jų gumulėliai (**3.5 pav.**).



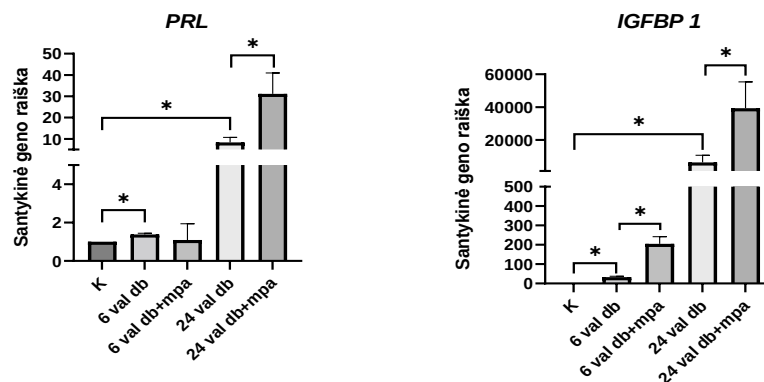
3.5 pav. Chondrogeninės diferenciacijos kokybinis įvertinimas. A – Kontrolė. B – Chondrogeninės diferenciacijos ląstelės po 5 d. C – Chondrogeninės diferenciacijos ląstelės po 15 d. Mastelis 400 μ m.

3.2. Endometriumo stromos ląstelių decidualizacija

EnSL decidualizacijos metu pakinta daugelio genų raiška, todėl kiekybiškai decidualizacija įvertinta matuojant santykinį pagrindinių decidualizacijos genų raiškos pokytį. Ląstelės indukuotos decidualizacinėje terpėje su **db-cAMP** ir (arba be) **MPA**. RNR skirta po 6 ir 24 val., tuomet susintetinta kDNR. EnSL decidualizacijos žymenų **PRL** ir **IGFBP1** raiška ištirta RL-kPGR metodu.

Po 6 val. diferencijavimo su db-cAMP **PRL** raiška nedaug, tačiau statistiškai reikšmingai išaugo, o po 24 val. stebėta dešimtį kartų didesnė nei kontrolinėse enSL **PRL** raiška (**3.6 pav.**). Veikiant su db-cAMP bei MPA, **PRL** raiškos pokytis po 6 val. nebuvo statistiškai reikšminga, tačiau praėjus 24 val. nuo decidualizacijos indukcijos **PRL** santykinė raiška buvo tris kartus didesnė nei indukuojant tik su db-cAMP.

IGFBP1 geno raiška jau po 6 val. padidėjo šimtus kartų lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, daug aktyvesnė ji buvo naudojant decidualizacijos protokolą, kurį sudaro db-cAMP ir MPA (**3.6 pav.**). Po 24 val. diferenciacijos pastebima dar didesnė, tūkstančius kartų besiskirianti nuo kontrolės, **IGFBP1** geno raiška. Vėlgi, didesnė raiška tuomet kai enSL buvo veikiamos su db-cAMP ir MPA, kur raiška po 24 val. padidėjo apie 4 kartus daugiau, nei veikiant tik su db-cAMP.



3.6 pav. Santykiniai *PRL* ir *IGFBP1* genų raiškos pokyčiai enSL *in vitro* decidualizacijos metu. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis. Genų raiška lyginama su kontrole, mėginiai tiriami po 6 ir 24 val. diferencijavimo. K – Kontrolė, db – dibutiril-cAMP, mpa – medroksiprogesterono acetatas, $n = 4$, * $p < 0,05$ (pagal Mano-Vitnio testą).

3.3 Western Blot analizė

Western Blot analizės metu ištirta, kaip veikiant decidualizacijos induktoriais kinta enSL bendras H4hiperAc modifikacijos lygis. Baltymai išskirti iš enSL indukuotų 6 val., 24 val., 3 d. su db-cAMP ir (arba be) MPA. Gauti rezultatai palyginti su kontrolinių ląstelių rezultatais.

Rezultatai rodo, kad jau po 6 val. enSL *in vitro* decidualizacijos su db-cAMP stebimas bendras H4hiperAc modifikacijos lygio padidėjimas, kuris nesiskyrė papildomai veikiant su MPA (3.7 pav). Praėjus 24 val. H4hiperAc lygis daugiau išaugo mėginyje su db-cAMP ir MPA. Po 3 d. H4hiperAc modifikacijos lygis dar labiau padidėjo, nežymiai daugiau indukuojant su db-cAMP ir MPA.

	K	6 val db	6 val db+mpa	24 val db	24 val db+mpa	3 d. db	3 d. db+mpa
H4 HiperAc							
H4 HiperAc kiekis	1	1,5	1,5	1,8	2,1	2,8	2,9
H4							

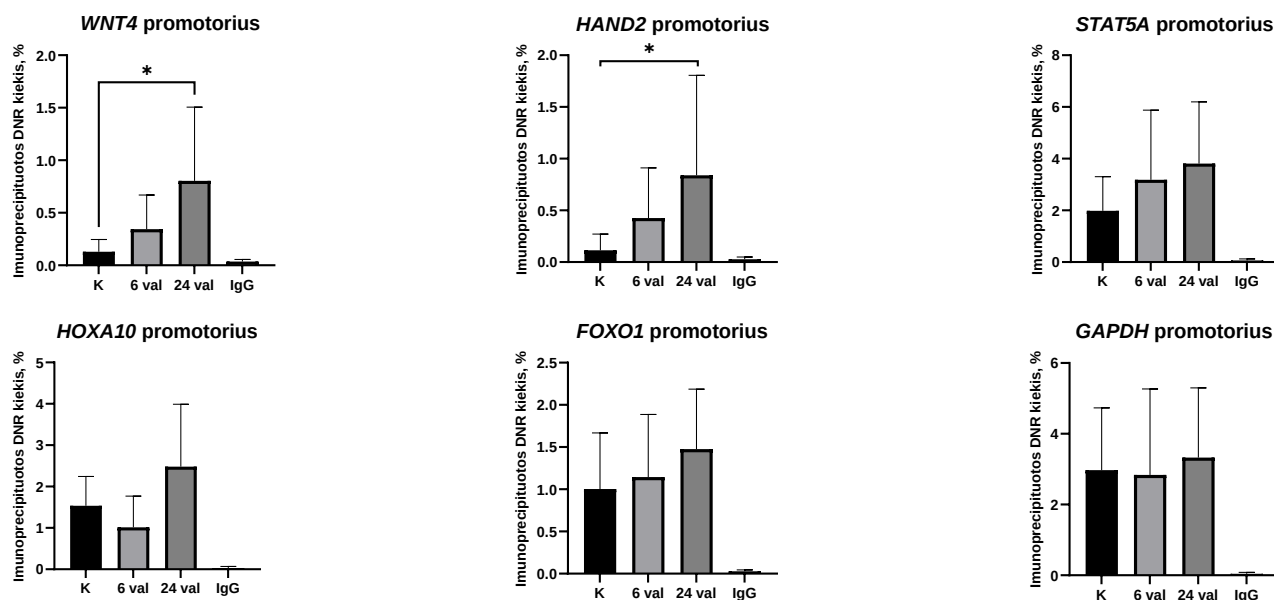
3.7 pav. H4hiperAc kiekis endometriumo stromos ląstelėse po *in vitro* decidualizacijos. K – Kontrolė; db – dibutiril-cAMP; mpa – medroksiprogesterono acetatas. Santykinis hiperacetilinto histono H4 raiškos pokytis (H4 HiperAc kiekis) apskaičiuotas normalizavus po chemoiluminescencinės detekcijos gautų H4hiperAc baltymų juostelių intensyvumo reikšmes su neacetilinto histono H4 juostelių intensyvumo reikšmėmis.

3.4 Chromatino imunoišsodinimas

H4hiperAc modifikacijos lygio pokyčiai specifinių decidualizacijos procese dalyvaujančių genų promotorių srityse enSL decidualizacijos metu vertinti ChIP – kPGR metodu. Analizuoti keturi

nepriklausomų CHIP bandymų rezultatai su skirtingų pacientų enSL. Pasirinkta analizuoti 5 genų promotorius: *WNT4*, *HAND2*, *STAT5A*, *HOXA10*, *FOXO1*. Papildomai kaip referentinis genas naudotas *GAPDH* promotorius, kadangi *GAPDH* yra „namų ruošos“ genas, nuolatos gausiai reiškiamas ląstelėse.

ChIP rezultatai pateikiami kaip procentinė dalis nuo bendro DNR kiekio, kuri buvo gauta imunoišsodinant DNR su antikūnų prieš H4hiperAc. Statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) H4hiperAc modifikacijos lygio skirtumas enSL decidualizacijos metu nustatytas tik *WNT4* ir *HAND2* promotoriuose (3.8 pav.). Abiem atvejais nustatytas H4hiperAc modifikacijos lygio padidėjimas praėjus 24 val. po enSL decidualizacijos indukcijos pradžios. *STAT5A*, *HOXA10*, *FOXO1* promotorių srityse taip pat stebima H4hiperAc lygio didėjimo tendencija, tačiau ji statistiškai nereikšminga. H4hiperAc modifikacijos lygis *GAPDH* promotoriaus srityje enSL decidualizacijos metu nekito.



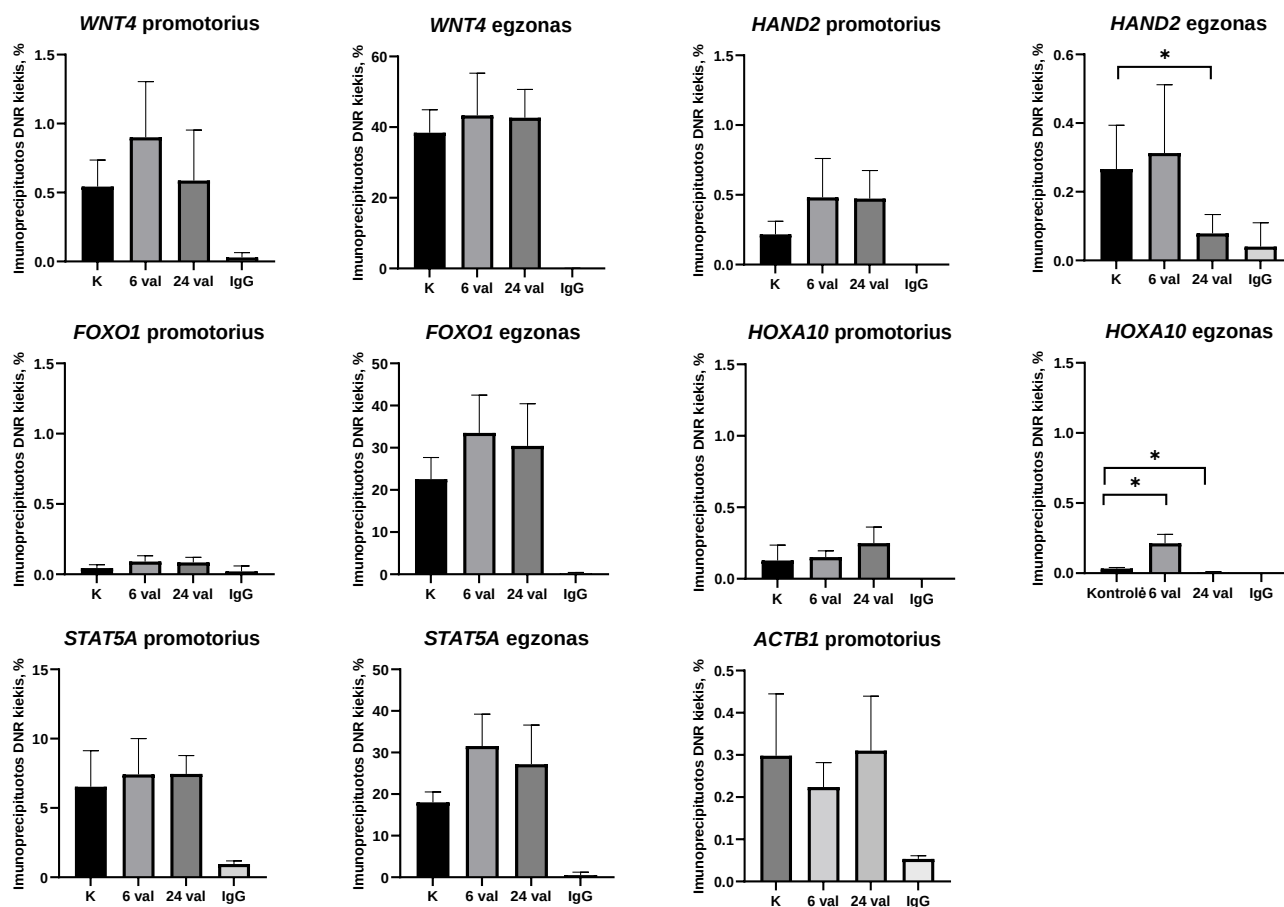
3.8 pav. Histono H4 hiperacetilavimo pokyčiai genų promotoriuose endometriumo stromos ląstelių *in vitro* decidualizacijos metu. K – kontrolė; 6 val/24 val – endometriumo stromos ląstelės po 6/24 val. poveikio dibutiril–cAMP ir medroksiprogesterono acetatu; IgG – imunoglobulinas G. Grafikuose pateikiamas imunoišsodintos DNR kiekis nuo visos ląstelės DNR. Stulpeliai vaizduoja vidurkius su standartine paklaida, $n = 4$, $* p < 0,05$ (pagal Mano – Vitnio testą).

3.5. Metilintos DNR imunoišsodinimas

Šio darbo metu taip pat buvo tirti enSL *in vitro* decidualizacijos metu vykstantys decidualizacijoje dalyvaujančių genų promotorinių ir egzoninių sričių **DNR metilinimo** pokyčiai. Modifikacija tirta atliekant MeDIP metodą. Tam atlikti buvo naudojami antikūnai prieš 5–mC. Atlikti keturi nepriklausomi MeDIP analizės pakartojimai su skirtingų pacientų enSL. Kaip ir CHIP–kPGR atveju, pasirinkti analizuoti 5 genai: *WNT4*, *HAND2*, *FOXO1*, *HOXA10*, *STAT5A*.

Papildomai kaip referentinis genas naudotas hipometilintas β -aktino (*ACTB*) geno promotorius. Šio geno promotorius yra hipometilintas, kadangi *ACTB* priklauso „namų ruošos“ genams, kurie nuolatos reiškiami ląstelėse. MeDIP rezultatai pateikiami kaip procentinė dalis nuo bendro DNR kiekio, kuri buvo gauta imunoišsodinant bendrą DNR kiekį su antikūnu prieš 5-mC.

Rezultatai parodė, jog visų analizuotų genų promotorių sritys pasižymėjo žemu DNR metilinio lygiu dar prieš indukuojant enSL *in vitro* decidualizacijai. DNR metilinimas promotorių ir egzonų regionuose reikšmingai nepakito ir per pirmąsias 24 decidualizacijos indukcijos valandas. Be to, patvirtinta, kad *WNT4*, *FOXO1* ir *STAT5A* genų promotorių sritys daug mažiau metilintos nei egzoninės sritys (3.9 pav.). Tiesa, *HAND2* ir *HOXA10* genų metilintos DNR lygis tiek promotorių, tiek egzonų srityse buvo mažas ir nustatyti statistškai reikšmingi pokyčiai. DNR metilinio lygis *ACTB* promotoriaus srityje buvo mažas ir nekintantis.



3.9 paveikslas. DNR metilinio pokyčiai genų promotoriuose ir egzonuose enSL *in vitro* decidualizacijos metu. Grafikuose pateikiamas imunoišsodintos DNR kiekis nuo visos ląstelės DNR. K – kontrolė; 6 val/24 val – enSL po 6/24 val. poveikio dibutiril-cAMP ir medroksiprogesterono acetatu; IgG – imunoglobulinas G, neigiama kontrolė. Stulpeliai vaizduoja vidurkius su standartine paklauda, n = 4, * p < 0,05 (pagal Mano – Vitnio testą).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe nustatyta, kad decidualizacijos metu endometriumo stromos ląstelėse decidualizacijai svarbių **genų promotorių srityse didėja H4 hiperacetilinio lygis**, tuo tarpu **DNR lygis promotorių srityse yra mažas** dar prieš indukciją ir **nekinta decidualizacijos eigoje**. Veikdamos kartu šios epigenetinės modifikacijos užtikrina tinkamą decidualizacijos eigą, kadangi didelis H4 acetilinimas bei mažas DNR metilinimo lygis genų promotorių srityse leidžia prie DNR jungtis specifiniams transkripcijos faktoriams. Tai aktyvina decidualizacijoje dalyvaujančių genų raišką. Šių epigenetinių pokyčių svarbą patvirtina ir A. M. Retis – Resendiz tyrimas, kuriame teigiama, jog DNR metilinimas ir histonų acetilinimas atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant su decidualizacija susijusių genų aktyvumą bei kitas endometriumo funkcijas (Retis – Resendiz *et al.*, 2021).

Svarbu pastebėti, kad didesni pokyčiai decidualizacijos metu nustatyti H4hiperAc modifikacijos lygyje. R. Maekawa tyrimo rezultatai rodo, kad DNR yra hipometilinta *PRL* ir *IGFBP1* genų promotoriuose prieš ir po enSL *in vitro* decidualizaciją, tuo tarpu histonų acetilinimas šiose sekose reikšmingai išauga (Maekawa *et al.*, 2019). Bendro H4hiperAc lygio augimo tendenciją enSL decidualizacijos metu patvirtina ir kiti tyrėjai (Cohen *et al.*, 2011; Sugino *et al.*, 2016). Tuo tarpu atliktame darbe pademonstruotas H4hiperAc lygio padidėjimas decidualizacijai svarbių genų promotorių srityse, kas leidžia patvirtinti, kad ši modifikacija yra būdinga decidualizacijos metu aktyvuojamiems genams. Taip pat įdomu, kad sergančių endometrioze moterų endometriume stebimas H4 hipoacetilinimas, palyginus su kontrolinėmis grupėmis. Todėl manoma, kad sutrikę H4 acetilinimo mechanizmai gali signalizuoti apie reprodukcinės sistemos sutrikimus (Xiaomeng *et al.*, 2013).

Beje, tyrimo rezultatai parodė, jog decidualizacijos procese dalyvaujančių genų egzonų sričių DNR metilinimo lygis didesnis nei promotorių, tačiau reikšmingai nekinta per 24 *in vitro* decidualizacijos valandas. D. Aran ir kolegų tyrimas taip pat patvirtina, jog **aktyvių genų egzonų sritims būdingas hipermetilinimas** (Aran *et al.*, 2011). Didesnis DNR metilinimas genų koduojančiose sekose padidina transkripcijos efektyvumą, kadangi apsaugo nuo transkripcijos iniciacijos neteisingoje vietoje. Tai naudinga transkriptų splaisingui, kadangi staigus metilinimo pokytis tarp sekų keičia chromatino konformaciją ir taip palengvinamas egzonų - intronų sandūros atpažinimas (Laurent *et al.*, 2010). Tiesa, *HAND2* ir *HOXA10* genų egzoninėse srityse nustatytas mažas DNR metilinimo lygis. Tokie rezultatai galėjo būti gauti dėl to, kad tyrime naudoti pradmenys yra nukreipti ne į CpG regionus ar egzonus, todėl pasirinktos sekos nėra įtraukiamos į baigtinį iRNR produktą po splaisingo (angl. *skipped exons*). Taigi nėra aišku, ar nustatyti reikšmingi skirtumai *HAND2* ir *HOXA10* genų egzonuose iš tiesų turi reguliacinę reikšmę ląstelėse.

Taip pat darbe parodyta, jog **db-cAMP kartu su MPA geba indukuoti enSL *in vitro* decidualizaciją**. Db-cAMP kaip pagrindinio decidualizacijos induktoriaus vaidmenį patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimai (James-Allan *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2020). Tiesa, Y. Xiong ir kolegų tyrime kaip ir šiame darbe nustatyta, jog pavienio cAMP poveikis yra gerokai silpnesnis nei naudojant cAMP kartu su MPA. To priežastis yra ta, kad progesteronas reikalingas aktyvuoti ir palaikyti morfologinius ir biocheminius procesus decidualizacijos metu, o cAMP didina ląstelių jautrumą progesteronui. Todėl šių dviejų induktorių sąveika palengvina sąlygas progesterono veikimui ir spartesnei *in vitro* decidualizacijos eigai (Xiong *et al.*, 2020).

Be EnSL savybės virsti decidualinėmis ląstelėmis, parodytos ir kitos jų **diferenciacijos kryptys**. Kokybiškai vertinant enSL diferenciacijos plastiškumą pastebėti kiekvienam ląstelių tipui būdingi morfologiniai pokyčiai, kaupiami specifiniai audiniams produktai. Dėka savo **įvairiagališkumo** enSL ne tik prisideda prie endometriumo funkcinio sluoksnio atkūrimo kiekvieno mėnesinių ciklo metu, bet gali būti panaudotos ir kitų audinių regeneracijai (Darzi *et al.*, 2016).

Apibendrinant, vykstant *in vitro* decidualizacijai enSL patiria daug morfologinių ir biocheminių pokyčių, prie kurių prisideda ir DNR metilinimas bei H4 histonų hiperacetilimas. Tinkamas šių epigenetinių modifikacijų valdymas yra kritiškai svarbus, nes nuo jo priklauso decidualizacijoje dalyvaujančių genų raiška ir ankstyvojo nėštumo eiga. Be to, enSL gebėjimas virsti į kelių skirtingų audinių ląsteles įrodo jų platų diferenciacijos potencialą ir pritaikymo mediciniuose tyrimuose galimybes.

IŠVADOS

1. Endometriumo stromos ląstelės pasižymi įvairiagalėmis ląstelėms būdingu plastiškumu ir geba diferencijuoti adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine ir chondrogenine kryptimis.
2. Dibutiril–cAMP aktyvuoja decidualizacijos procesus endometriumo stromos ląstelėse, o kombinuotas poveikis kartu su medroksiprogesterono acetatu žymiai sustiprina ir reikšmingai padidina decidualizacijai būdingų žymenų *PRL* ir *IGFBP1* raišką.
3. Bendras histono H4 hiperacetilavimo modifikacijos lygio kiekis endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos metu didėja.
4. *WNT4* ir *HAND2* genų promotorių srityse histono H4 hiperacetilavimo kiekis endometriumo stromos ląstelių decidualizacijos metu didėja, o DNR metilinimo lygis decidualizacijoje dalyvaujančių genų (*WNT4*, *HAND2*, *FOXO1*, *HOXA10*, *STAT5A*) promotorių ir egzonų srityse nekinta.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Akvilė Žlibinaitė
Bakalauro baigiamasis darbas

**ENDOMETRIUMO STROMOS LĄSTELIŲ DIFERENCIACIJOS IR EPIGENETINIŲ
POKYČIŲ TYRIMAS**

SANTRAUKA

Endometriumo stromos ląstelės sudaro didžiausią gimdos vidinio sluoksnio, vadinamo endometriumu, dalį. Jos yra atsakingos už audinio proliferaciją, regeneraciją, atsidalijimą mėnesinių metu ir gimdos pasiruošimą nėštumui. Į fibroblastus panašių stromos ląstelių diferencijavimas į sekrecines decidualines ląsteles yra vienas iš pagrindinių sėkmingo nėštumo etapų.

Šio tyrimo tikslas – įvertinti endometriumo stromos ląstelių diferenciacijos potencialą ir plačiau ištirti decidualizacijos metu vykstančius epigenetinius pokyčius. Endometriumo stromos ląstelės naudojant specifines diferenciacijos terpes indukuotos diferenciacijoms į keletą ląstelių tipų. Jų plastiškumas ir decidualinių stromos ląstelių genų raiška įvertinti naudojant atitinkamus ląstelių dažus ir kiekybinę realaus laiko PGR. Taip pat darbe buvo naudojami *Western blot*, chromatino imunoišsodinimo (ChIP) ir metilintos DNR imunoišsodinimo (MeDIP) metodai, siekiant įvertinti histono H4 hiperacetilavimo ir DNR metilinimo pokyčius endometriumo stromos ląstelėse *in vitro* decidualizacijos metu.

Rezultatai parodė, kad endometriumo stromos ląstelės gali diferencijuoti adipogenine, osteogenine, miogenine, neurogenine ir chondrogenine kryptimis. Taip pat patvirtinta, kad db-cAMP sukelta decidualizacija gali būti pagreitinta naudojant MPA. Be to, buvo įrodyta, kad *in vitro* decidualizacijos metu DNR metilinimo lygis decidualinių genų promotoriuose nesikeičia ir išlieka žemas, o histono H4 hiperacetilavimas didėja.

Akvilė Žlibinaite
Bachelor thesis

EPIGENETIC MODIFICATIONS AND DIFFERENTIATION OF ENDOMETRIAL STROMAL CELLS

SUMMARY

Endometrial stromal cells make up the most significant part of the inner layer of the uterus, called the endometrium. They are responsible for tissue proliferation, regeneration, menstrual breakdown, and uterine preparation for pregnancy. *In vivo* they are responsible for forming temporary uterine tissue – decidua. The differentiation of fibroblast-like stromal cells into secretory decidual cells is one of the key steps for establishing a successful pregnancy.

The aim of this research was to determine the plasticity potential of endometrial stromal cells and investigate the epigenetic modifications that occur during the process of *in vitro* decidualization. Endometrial stromal cells were induced to differentiate into several cell types using specific differentiation media. Their plasticity and gene expression profile of decidualized stromal cells were assessed using precise cell dies and quantitative real-time PCR, respectively. Also, Western blot, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) methods were used to evaluate histone H4 hyperacetylation and DNA methylation changes in endometrial stromal cells during *in vitro* decidualization.

Results showed that endometrial stromal cells can differentiate into adipogenic, osteogenic, myogenic, neurogenic and chondrogenic lineages. As well, it was confirmed that decidualization induced by db-cAMP can be accelerated with MPA. Finally, it was shown that during *in vitro* decidualization DNA methylation statuses in decidual gene promoters do not change and remain low, while histone H4 hyperacetylation increases.

Literatūros sąrašas

1. Bao, L., Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Li, F., Buzzio, O. L., Callegari, E. A., Horseman, N. D., & Gibori, G. (2007). Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy, *Endocrinology*, 148(5), 2326–2334. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1643>
2. Bean, A. C., & Tuan, R. S. (2015). Fiber diameter and seeding density influence chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells seeded on electrospun poly(ε-caprolactone) scaffolds, *Biomedical materials* (Bristol, England), 10(1), 015018. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015018>
3. Bozorgmehr, M., Gurung, S., Darzi, S., Nikoo, S., Kazemnejad, S., Zarnani, A. H., & Gargett, C. E. (2020). Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application, *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 497. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00497>
4. Cai, A., Hardt, M., Schneider, P., Schmid, R., Lange, C., Dippold, D., Schubert, D. W., Boos, A. M., Weigand, A., Arkudas, A., Horsch, R. E., & Beier, J. P. (2018). Myogenic differentiation of primary myoblasts and mesenchymal stromal cells under serum-free conditions on PCL-collagen I-nanoscaffolds, *BMC biotechnology*, 18(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0482-6>
5. Cohen, I., Poręba, E., Kamieniarz, K., & Schneider, R. (2011). Histone modifiers in cancer: friends or foes?, *Genes & cancer*, 2(6), 631–647. <https://doi.org/10.1177/1947601911417176>
6. Critchley, H., Maybin, J. A., Armstrong, G. M., & Williams, A. (2020). Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation, *Physiological reviews*, 100(3), 1149–1179. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2019>
7. Darzi, S., Werkmeister, J. A., Deane, J. A., & Gargett, C. E. (2016). Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy, *Stem cells translational medicine*, 5(9), 1127–1132. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0190>
8. Deryabin, P., Griukova, A., Nikolsky, N., & Borodkina, A. (2020). The link between endometrial stromal cell senescence and decidualization in female fertility: the art of balance, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(7), 1357–1370. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03374-0>
9. Draizen, E. J., Shaytan, A. K., Mariño-Ramírez, L., Talbert, P. B., Landsman, D., & Panchenko, A. R. (2016). HistoneDB 2.0: a histone database with variants--an integrated resource to explore histones and their variants, *Database : the journal of biological databases and curation*, 2016, baw014. <https://doi.org/10.1093/database/baw014>
10. Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure, *Endocrine reviews*, 35(6), 851–905. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1045>
11. Henriët, P., Gaide Chevronnay, H. P., & Marbaix, E. (2012). The endocrine and paracrine control of menstruation, *Molecular and cellular endocrinology*, 358(2), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.042>
12. James-Allan, L. B., Whitley, G. S., Leslie, K., Wallace, A. E., & Cartwright, J. E. (2018). Decidual cell regulation of trophoblast is altered in pregnancies at risk of pre-eclampsia, *Journal of molecular endocrinology*, 60(3), 239–246. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0243>
13. Janesick, A., Wu, S. C., & Blumberg, B. (2015). Retinoic acid signaling and neuronal differentiation, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72(8), 1559–1576. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1815-9>

14. Kajihara, T., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2013). The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy, *Medical molecular morphology*, 46(2), 61–68. <https://doi.org/10.1007/s00795-013-0018-z>
15. Kajihara, T., Tanaka, K., Oguro, T., Tochigi, H., Prechapanich, J., Uchino, S., Itakura, A., Sućurović, S., Murakami, K., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2014). Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro, *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif.), 21(3), 372–380. <https://doi.org/10.1177/1933719113497280>
16. Keating A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell*, 10(6), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
17. Ko, D. S., Lee, D. R., Song, H., Kim, J. H., & Lim, C. K. (2019). Octylphenol and nonylphenol affect decidualization of human endometrial stromal cells, *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 89, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.06.003>
18. Krüger, J. P., Machens, I., Lahner, M., Endres, M., & Kaps, C. (2014). Initial boost release of transforming growth factor- β 3 and chondrogenesis by freeze-dried bioactive polymer scaffolds, *Annals of biomedical engineering*, 42(12), 2562–2576. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1099-0>
19. Kyurkchiev, S., Shterev, A., & Dimitrov, R. (2010). Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua, *Reproductive biomedicine online*, 20(3), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.011>
20. Li, Q., Kannan, A., Das, A., Demayo, F. J., Hornsby, P. J., Young, S. L., Taylor, R. N., Bagchi, M. K., & Bagchi, I. C. (2013). WNT4 acts downstream of BMP2 and functions via β -catenin signaling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation, *Endocrinology*, 154(1), 446–457. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1585>
21. Logan, P. C., Ponnampalam, A. P., Steiner, M., & Mitchell, M. D. (2013). Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells, *Molecular human reproduction*, 19(5), 302–312. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas062>
22. Lu, Z., Hardt, J., & Kim, J. J. (2008). Global analysis of genes regulated by HOXA10 in decidualization reveals a role in cell proliferation, *Molecular human reproduction*, 14(6), 357–366. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan023>
23. Maekawa, R., Tamura, I., Shinagawa, M., Mihara, Y., Sato, S., Okada, M., Taketani, T., Tamura, H., & Sugino, N. (2019). Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells, *BMC genomics*, 20(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5695-0>
24. Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: a cryo-electron microscopy study, *Journal of structural biology*, 174(3), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.014>
25. Mak, I. Y., Brosens, J. J., Christian, M., Hills, F. A., Chamley, L., Regan, L., & White, J. O. (2002). Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(6), 2581–2588. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8576>
26. Makieva, S., Giacomini, E., Ottolina, J., Sanchez, A. M., Papaleo, E., & Viganò, P. (2018). Inside the Endometrial Cell Signaling Subway: Mind the Gap(s), *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2477. <https://doi.org/10.3390/ijms19092477>
27. Matsumoto, H., Sakai, K., & Iwashita, M. (2008). Insulin-like growth factor binding protein-1 induces decidualization of human endometrial stromal cells via α 5 β 1 integrin, *Molecular human reproduction*, 14(8), 485–489. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan038>

28. McRae, N., Forgan, L., McNeill, B., Addinsall, A., McCulloch, D., Van der Poel, C., & Stupka, N. (2017). Glucocorticoids Improve Myogenic Differentiation In Vitro by Suppressing the Synthesis of Versican, a Transitional Matrix Protein Overexpressed in Dystrophic Skeletal Muscles, *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2629. <https://doi.org/10.3390/ijms18122629>
29. Mori, M., Bogdan, A., Balassa, T., Csabai, T., & Szekeres-Bartho, J. (2016). The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy, *Seminars in immunopathology*, 38(6), 635–649. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0574-0>
30. Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium, *Reproductive medicine and biology*, 17(3), 220–227. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12088>
31. Retis-Resendiz, A. M., González-García, I. N., León-Juárez, M., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M., & Vázquez-Martínez, E. R. (2021). The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium, *Clinical epigenetics*, 13(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01103-8>
32. Samadieh, Y., Favaedi, R., Ramezanali, F., Afsharian, P., Aflatoonian, R., & Shahhoseini, M. (2019). Epigenetic Dynamics of HOXA10 Gene in Infertile Women With Endometriosis, *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif.), 26(1), 88–96. <https://doi.org/10.1177/1933719118766255>
33. Sangeeta Devi, Y., & Halperin, J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms, *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.016>
34. Shen, Y., Wei, W., & Zhou, D. X. (2015). Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression, *Trends in plant science*, 20(10), 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.005>
35. Sonderegger, S., Pollheimer, J., & Knöfler, M. (2010). Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation – review, *Placenta*, 31(10), 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.07.011>
36. Tang, Q. Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte, *Annual review of biochemistry*, 81, 715–736. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718>
37. Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective, *Bioscience reports*, 35(2), e00191. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
38. Wu, C. J., Sundararajan, V., Sheu, B. C., Huang, R. Y., & Wei, L. H. (2019). Activation of STAT3 and STAT5 Signaling in Epithelial Ovarian Cancer Progression: Mechanism and Therapeutic Opportunity, *Cancers*, 12(1), 24. <https://doi.org/10.3390/cancers12010024>
39. Xiaomeng, X., Ming, Z., Jiezhi, M., & Xiaoling, F. (2013). Aberrant histone acetylation and methylation levels in woman with endometriosis, *Archives of gynecology and obstetrics*, 287(3), 487–494. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2591-0>
40. Xiong, Y., Wen, X., Liu, H., Zhang, M., & Zhang, Y. (2020). Bisphenol a affects endometrial stromal cells decidualization, involvement of epigenetic regulation, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 200, 105640. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105640>