

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

X kromosoomi inaktivatsioon imetajatel

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Mariann Männistu

Juhendajad
Julia Bokajeva, MSc
prof. Ants Kurg, PhD

TARTU 2017

INFOLEHT

X kromosoomi inaktivatsioon imetajatel

X kromosoomi inaktivatsioon on protsess, mille käigus inaktiveeritakse emastel imetajatel üks X kromosoom, võimaldades X-liiteliste geenide doosikompensatsiooni sugude vahel. Selle tulemusena avalduvad X-liitelised geenid võrdses koguses nii emastel kui isastel. Inaktivatsiooni protsess on suhteliselt universaalne kõigis imetajates, ent teatavad erinevused liigiti eksisteerivad. Kõik geenid X kromosoomil ei allu vaigistamisele, mõned neist pääsevad sellest kas oma omaduste või asukoha tõttu X kromosoomil. Mittejuhuslikku X kromosoomi inaktivatsiooni nimetatakse kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniks ning sel juhul on rakkudes üht päritolu X kromosoomi inaktiveerimine eelistatud. Seda võivad põhjustada vanus, pärilikkus või mõned muud geneetilised faktorid ja/või nende koosmõju.

Märksõnad: geenidoosi kompensatsioon, X kromosoomi inaktivatsioon, kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon

CERCS B220 Geneetika, tsütogeneetika

X chromosome inactivation in mammals

X chromosome inactivation is a process that enables dosage compensation of X-linked genes between sexes in mammals by inactivating one X chromosome in females. As a result X-linked genes are expressed at the same amount in both males and females. The process of inactivation is relatively universal in all mammals, though some differences exist between species. Not all genes on X chromosome are influenced by inactivation, some manage to escape either due to their characteristics or location on X chromosome. Non-random X chromosome inactivation is called skewed X chromosome inactivation which means that cells prefer inactivating one X chromosome over the other. That can be caused by age, heredity or other genetic factors and/or their coefficient.

Keywords: gene dosage compensation, X chromosome inactivation, skewed X chromosome inactivation

CERCS B220 Genetics, cytogenetics

Sisukord

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. X kromosoomi inaktivatsioon.....	6
1.1. Inaktivatsiooni algatamine.....	7
1.1.1. Kromosoomide loendamine ja valik.....	12
1.2. Inaktivatsiooni levik.....	14
1.3. Inaktivatsiooni säilitamine.....	16
1.4. X inaktivatsiooni cis- ja trans- regulatsioon.....	17
1.4.1. Cis-regulatsioon.....	18
1.4.2. Trans-regulatsioon.....	20
1.5. Pääsevad geenid.....	21
2. X kromosoomi inaktivatsiooni kallutus.....	25
2.1. Kallutuse tekkemehhanismid.....	26
2.2. Kallutuse seos vanusega.....	27
2.3. Kallutuse seos X-liiteliste haigustega.....	28
2.4. Kallutuse seos aberratsioonidega.....	29
3. Meetodid.....	30
3.1. X inaktivatsiooni taseme määramine kudedes.....	31
ARUTELU.....	32
KOKKUVÕTE.....	35
RESÜMEE.....	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED

AR	<i>androgen receptor</i>	androgeeni retseptor
HUMARA	<i>human androgen receptor gene assay</i>	inimese androgeeni retseptori geeni analüüs
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>	pikad insertsioonilised hajuskorduselemendid
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>	pikk mittekodeeriv RNA
RNAi	<i>RNA interference</i>	RNA interferents
TAD	<i>topologically associating domain</i>	topoloogiliselt seonduv domeen
Xa	<i>active X chromosome</i>	aktiivne X kromosoom
XCI	<i>X chromosome inactivation</i>	X kromosoomi inaktivatsioon
Xi	<i>inactive X chromosome</i>	inaktiivne X kromosoom
Xic	<i>X inactivation centre</i>	X inaktivatsiooni keskus
XIR	<i>X inactivation ratio</i>	X inaktivatsiooni suhe
Xist	<i>X-inactive specific transcript</i>	inaktiivse X spetsiifiline transkript
Xm	<i>maternal X chromosome</i>	emalt päritud X kromosoom
Xp	<i>paternal X chromosome</i>	isalt päritud X kromosoom

SISSEJUHATUS

X kromosoomi inaktivatsioon on rangelt reguleeritud protsess emastel imetajatel, mille tulemusena vaigistatakse transkriptsiooniliselt üks X kromosoom ehk inaktiveeritakse see; teine X kromosoom jääb aktiivseks. Protsess toimub varases embrüonaalses arengus, mille eesmärgiks on tagada võrdne X-liiteliste geenide avaldumine nii XX emastel kui XY isastel imetajatel. Inaktivatsiooni tulemusena tagatakse suhteliselt võrdne rakkude jaotus, mille tagajärjel on nii emalt kui isalt pärit inaktiivne X kromosoom võrdse suhtega kogu organismis. X kromosoomi inaktivatsioon on sõltuv mittekodeerivast Xist RNA-st, mida ekspresseeritakse tulevaselt inaktiivselt X kromosoomilt kattes seda ja värvates erinevaid vaigistamiseks vajaminevaid faktoreid ning mõjutades seejuures kromosoomi kromatiinset seisundit.

X kromosoomi inaktivatsioon on üldjuhul universaalne protsess, mis toimub kõikidel emastel imetajatel. Inaktiveeritaval X kromosoomil on alati teatud hulk geene, mis inaktivatsioonist pääsevad, kuid millised täpsemalt, sõltub suuresti loomaliigist ja koetüübist. Mõningatel juhtudel võivad rakud hakata ühte päritolu X kromosoomi inaktiveerimist teisele eelistama – sellist tendentsi nimetatakse kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniks. Kallutatust võivad mõjutada nii pärilikkus kui vanus ning sellega on seotud mitmed X-liitelised haigused ja X kromosoomi aberratsioonid.

Käesolev bakalaureusetöö annab kirjandusel põhineva ülevaate imetajate X kromosoomi inaktivatsioonist ning selles protsessis osalevatest faktoritest. Kuna tegemist on väga varases embrüonaalses arengus toimuva protsessiga, on seda inimestel mitmetel, eelkõige eetilistel, põhjustel keeruline uurida. Seetõttu on antud töös olevad andmed peamiselt hiirtel põhinevatel uuringutel saadud. Erinevuste korral on protsessi mehhanisme võrreldud inimese või mõne teise imetajaga.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. X kromosoomi inaktivatsioon

Naistel on kaks X kromosoomi, meestel aga ainult üks. See tähendab, et naistel on samu X-liitelisi geene kahes koopias. Enamik neist geenidest ei ole soospetsiifilised ning vajavad seetõttu võrdset ekspressiooni nii meestel kui naistel (Brooks, 2010). Vältimaks loote surma, väärarengut või edaspidiseid postnataalseid tüsistusi on vaja XX diploidises rakus üks X kromosoom inaktiveerida. Selle tagab X kromosoomi inaktivatsioon (XCI, *X chromosome inactivation*). XCI on kõige efektsam näide epigeneetilisest vaigistamisest eukarüootidel. See on molekulaarne doosikompensatsiooni mehhanism, mis kindlustab võrdse X-liiteliste geenide ekspressiooni XX emaste ja XY isaste imetajate vahel vaigistades emastel ühe X kromosoomi (Carrel ja Willard, 2005; Chan *et al.*, 2011). XCI peab olema reguleeritud, et tagada vaid ühe X kromosoomi inaktivatsioon XX diploidsetes emasrakkudes ja inaktivatsiooni puudumine XY diploidsetes isasrakkudes (Vacca *et al.*, 2016). Kuigi taoline doosikompensatsioon esineb kõigil imetajatel, erinevad seda keerulist protsessi reguleerivad mehhanismid liigiti, koeti ja arengustaadiumiti. Mehhanismid ei hõlma vaid inaktivatsiooni tasemete erinevusi, vaid ka selle loomust – mis võib olla oma loomult juhuslik või vanemlikku päritolu mõjutatud (Couldrey *et al.*, 2017).

X kromosoomi inaktivatsiooni avastas hiirtel 1961. aastal inglise geneetik Mary Frances Lyon. Varasemalt oli näidatud, et üks kromosoom erinevates rakkudes oli heteropüknootiline – seda peeti X kromosoomiks, kuid ei teatud, kumba päritolu X kromosoomiga tegemist oli. Sellele tõi lahenduse Mary Lyon, kes pakkus välja kaks varianti: 1) heteropüknootiline X kromosoom võib olla nii isalt kui emalt pärinev; 2) vastav X kromosoom on geneetiliselt inaktiivne. Nimelt näitasid XO emaste hiirte normaalsed fenotüübid, et normaalseks arenguks, sealhulgas ka seksuaalseks arenguks, piisab vaid ühest X kromosoomist. Teiseks, suguliitelised mutandid mõjutasid ka karvkatet, omades kas täpulist või laigulist fenotüüpi – laigud kas normaalset või mutantset värvi. Sellise mosaiikse fenotüübi põhjuseks peeti ühe või teise X kromosoomi inaktivatsiooni varases embrüonaalses arengus. Seega hõlmas hüpotees kõiki hiire suguliitelisi geene, mille puhul on heterosügootide fenotüüp mosaiikne lokaliseeritud geniaktiivsuse tõttu ning et samasugune efekt on ka siis, kui autosomaalsed geenid translokeeruvad X kromosoomi (Lyon, 1961).

Hiirtel on X kromosoomi inaktivatsioonil kaks vormi: juhuslik XCI ja imprintitud XCI (van den Berg *et al.*, 2009). Inimestel ja küülikutel on XCI algus veidi hilisem ning rakud valivad juhuslikult, millist päritolu X kromosoom inaktiveeritakse. Samas toimub küülikutel XCI kahe

lainena nagu hiirtelgi. Esimese laine puhul pole küll tegemist otseselt imprintinguga, ent mingisugust vanemlikku kallutatust on küülikutel täheldatud (Okamoto *et al.*, 2011). Nii emalt kui isalt pärit X kromosoomi juhuslik inaktivatsioon toimub kõigis pärisimetajate somaatilistes rakuliinides alates gastrulatsioonist. Juhuslik inaktivatsioon ei eelista üht päritolu X kromosoomi inaktiveerimist teisele. Täiesti vastupidine on aga protsessi imprinted vorm, mille puhul inaktiveeritakse eelistatult isalt päritud X kromosoom ning see toimub hiire platsenta kudedes. Senini on olnud valdav arusaam, et nii X kromosoomi inaktivatsioon kui ka doosikompensatsioon algab ainult pärast platsenta prekursorirakkude diferentseerumist. Samas on aga ka leitud, et isalt pärit X kromosoomi inaktivatsioon eksisteerib kõigis preimplanteerunud hiire embrüotes juba alates 4-raku staadiumist (van den Berg *et al.*, 2009).

Imetaja somaatilised rakud suudavad kindlaks teha, kui palju X kromosooime parasjagu rakus on ja transkriptsiooniliselt vaigistada kõik peale ühe (Chadwick ja Willard, 2003; Vacca *et al.*, 2016). Kuna inaktivatsioon toimub juhuslikult, siis teoreetiliselt peaksid 50% rakkudest omama aktiivset emalt päritud X kromosoomi (X_m , *maternal X chromosome*) ning 50% rakkudest isalt pärit X-i (X_p , *paternal X chromosome*) (Jobanputra *et al.*, 2012).. Võimetus luua või säilitada X kromosoomi inaktivatsiooni võib viia mitmesuguste patoloogiliste seisunditeni. Näiteks naistel väikese X rõngaskromosoomiga, kus üks X kromosoom on purunenud kahest kohast ja moodustanud rõnga, võivad antud rõngaskromosoomil puududa võtmegeenid XCI jaoks. Seetõttu üleekspressioonitakse mitmeid geene nii rõngaskromosoomilt kui aktiivselt X kromosoomilt (X_a , *active X chromosome*) (Migeon, 2007; Brooks, 2010).

Pärast XCI toimumist pärandatakse inaktiivne X kromosoom (X_i , *inactive X chromosome*) mitoosi käigus tütarakkudele edasi (Jobanputra *et al.*, 2012). X_i omandab heterokromatiinsed omadused, mis on tüüpilised transkriptsiooniliselt vaigistatud või geenivaestele kromosomaalsetele regioonidele nagu hiline replikatsioon ja hüpermetüleeritud CpG saarekesed (Van den Veyver, 2001; Cotton *et al.*, 2015).

1.1. Inaktivatsiooni algatamine

X kromosoomi inaktivatsioon jaguneb oma olemuselt kolmeks suuremaks etapiks: (a) algatamine, mis kulmineerub aktiivse X kromosoomi eristamisega; (b) levik, mille jooksul kaetakse kogu X *cis*-regulatsiooni käigus ning (c) säilitamine rakutsükli ja rakujagunemise vältel (Clemson *et al.*, 1996). XCI algatamine toimub embrüogeneesis väga piiratud aja jooksul – varases embrüonaalses arengus on niinimetatud „võimaluse aken“, mis on ajaliselt suhteliselt piiratud ehk selle aja jooksul protsess saab alata ning on kontrollitud kompleksse piirkonna

poolt, mida nimetatakse X-inaktivatsiooni keskuseks (*Xic*, *X inactivation centre*) (Rougeulle ja Avner, 2003). Inimestel avastati XIC regioon nende patsientide rakuliinide analüüsimisel, kellel olid X kromosoomi ebanormaalsused. Hiirte puhul on püütud vastavat regiooni kindlaks määrata nii looduses elavatel kui laboris kasvatatud hiirtel, ent üksmeelele, milline see piirkond täpselt on, pole seni jõutud (Horvath *et al.*, 2011). Tsütoloogiliselt defineerituna on inimesel *Xic* ligikaudu 1 Mb (*megabase*, miljon ehk 10^6 aluspaari) pikkune regioon, mis sisaldab vähemalt nelja geeni (Avner ja Heard, 2001). See tähendab, et inaktivatsiooni protsessi algatamine on sõltuv teatud kindla järjestuse olemasolust X kromosoomil. Hiirel on *Xic* regioon umbes 714 kb ja veisel 233 kb pikkune (Chureau *et al.*, 2002). Üks *Xic* imekspandavatest omadustest on mittekodeerivate RNA-de rohkus – selliseid lookuseid on 700 kb pikkuses *Xic* regioonis leitud viis (Chureau *et al.*, 2002). Lisaks sisaldab *Xic* veel suhteliselt palju korduvaid DNA järjestusi, ent vähe valke kodeerivaid geene (Migeon, 2014). Nii hiirel, inimesel kui veisel on X inaktivatsiooni keskus suhteliselt GC vaene, vastavalt 42%, 40% ja 39% (Chureau *et al.*, 2002). Inimestel on *Xic*-i asukohaks Xq13 ja hiirtel X kromosoomi D regioon (Migeon, 2014; Dixon-McDougall ja Brown, 2016).

Xic-i piirkonna keskmes on inaktiivse X spetsiifiline transkript ehk *Xist* (inimestel *XIST*), mis on 17-19 kb suurune pikk mittekodeeriv RNA (*lncRNA*, *long noncoding RNA*). Nimetus tuleneb tema ekspressioonist vaid inaktiivsel X kromosoomil ning lisaks on tema ainukeseks produktiks regulatoorne RNA transkript. Sarnaselt enamikele mRNA-dele on ka *Xist*-i transkriptid polüadenüleeritud ning suurem osa neist on splaissitud, samas erinevalt enamikest mRNA-dest *Xist*-i transkriptid ei kodeeri valke. *Xist* on leitud erinevatelt imetajatelt: inimene, hiir, lehm, küülik, hobune, mitmed leethiire perekonda kuuluvad liigid, kass, mutt, karihiir, koer, siga, merisiga, vöölane ja elevant. *Xist* tundub olevat omane vaid pärisimetajatele, sest detailed uuringud nii kukkurloomade kui ainupilulistega on andnud negatiivseid tulemusi vastava RNA olemasolust (Migeon, 2014). Samas on *Xist* RNA platsentaalide (lad k *Placentalia*, pärisimetajad) vahel suhteliselt halvasti konserveerunud, väljaarvatud mõned unikaalsed kordusregioonid – A-F kordused. Samas antud regioonide arv ja suurus varieerub liikide vahel suuresti. Hästi on sellised järjestused ära näidatud hiirel (joonis 1) (Nesterova *et al.*, 2001).



Joonis 1. Hiire Xist RNA struktuur ja funktsioonid. (da Rocha ja Heard, 2017) järgi. Unikaalsed kordusjärjestused A, B, C, D, E, F on konserveerunud kõigil platsentaalidel ning nad on joonisel värviliselt tähistatud. A-kordusregioon on kõige rohkem konserveerunud ning osaleb X-liiteliste geenide vaigistamises. Teised regioonid kas aitavad *Xist*-il kromosoomi katta (jooned vastavate piirkondade peal) või värvata mitmesuguseid komplekse, näiteks PRC2 kompleksi.

XCI nõuab Xist olemasolu. (Dixon-McDougall ja Brown, 2016; Gayen *et al.*, 2016). Inimese XIST regioon asub X kromosoomi pikas õlas positsioonil Xp13.2 (Brown *et al.*, 1992). Algselt transkribeeritakse Xist-i kõikidelt X kromosoomidelt, ent kui ühel kromosoomil toimub inaktivatsioon, siis edasine *Xist* ekspressioon toimub vaid Xi-lt, Xa-l on see välja lülitatud (Carrel ja Willard, 1998).

Xist vahendatud geenivaigistamise kolm peamist valku arvatakse olevat SPEN (*split ends*) (tuntud ka kui SHARP või MINT), LBR (*lamin B-receptor*) ja SAF-A (*scaffold attachment factor A*). LBR on valk, mis on ankurdunud sisemisse tuumamembraani ning interakteerub seal mitmete repressiivsete kromatiini regulaatorvalkudega ja lamiin B-ga. SAF-A valku on vaja X kromosoomi inaktivatsiooni alguses *Xist* ja vaigistamise jaoks vajaminevate valkude lokaliseerimiseks X kromosoomil. SPEN, LBR ja SAF-A valkude allasurumine (ingl k *knockdown*) põhjustab geenide vaigistamise leviku peatamise kohe pärast seda, kui *Xist* on X kromosoomilt hakatud ekspresseerima (McHugh *et al.*, 2015). SPEN on 400 kDa suurune valk, mis hõlmab mitmeid N-terminaalseid RRM (*RNA recognition motif*) valke ning oma C terminuses konserveerunud transkriptsiooniliselt repressiivset SPOC (*SPEN paralogue and orthologue C-terminal*) valku (Ariyoshi ja Schwabe, 2003). SPEN osaleb RNA-vahendatud transkriptsiooni regulatsioonis tuuma retseptorradades (Shi *et al.*, 2001; Arieti *et al.*, 2014). SPOC domeen interakteerub mitmete üldlevinud transkriptsiooniliste korepressoritega nagu SMART/NCOR2 ja NCOR1, ning värbab histooni deatsetülaase (Shi *et al.*, 2001; Ariyoshi ja Schwabe, 2003; You *et al.*, 2013). SPEN-*Xist* interaktsioon on teadaolevalt A-kordusregiooni seoseline, mistõttu on SPEN-il selge mõju X-liiteliste geenide mahasurumisele (Chu *et al.*, 2015). SPEN interakteerub SMRT korepressori deatsetülaasi kompleksiga, mis sisaldab peamise katalüütilise ühikuna HDAC3 (histooni deatsetülaas 3) (Shi *et al.*, 2001; You *et al.*, 2013). SPEN on vajalik ka RNA polümeraas II eemaldamiseks inaktiivselt X kromosoomilt. Välja on pakutud mudel, kus SPEN värbab SMRT-HDAC3 kompleksi, mis viib X-liiteliste

geenide transkriptsioonilise vaigistamiseni (McHugh *et al.*, 2015). Samas on *Spn* geeni nokaut embrüonaalsetes tüvirakkudes *Xist*-kaetud kromosoomil suhteliselt vähe atsetüleeritud H4, mis võib tähendada, et SPEN roll X kromosoomi inaktivatsioonis ei pruugi olla piiratud tema seondumisega deatsetülaasimehhanismiga. Kuna tegemist on niivõrd suure valguga, siis võib SPEN olla kui platvorm värbamiseks vaigistamiseks ja repressiooniks lisafaktoreid *Xist*-kaetud kromosoomile (Monfort *et al.*, 2015). *Spn* geeni homosügootne nokaut hiires on surmav alates 12.5 embrüonaalsest päevast (Kuroda *et al.*, 2003). *Spn* täpne roll X kromosoomi inaktivatsioonis on veel uurimise all.

Emaste hiirete embrüod, mis pärivad isase *Xist* deletsiooni, surevad üsna ruttu pärast implantatsiooni doosi ebavõrdsuse tulemusena ekstraembrüonaalses koes. Võrdlusena need embrüod, kes aga pärivad emalt *Xist* deletsiooni, arenevad normaalsena ja seda kahel põhjusel: 1) emase *Xist* alleeli ei ekspresseerita normaalses varases embrüonaalses arengus; 2) embrüos muutub juhuslik XCI alati mittejhuslikuks nii, et terve *Xist* koopiaga X kromosoom muutub inaktiivseks (Yang *et al.*, 2016).

Enne XCI inaktivatsiooni hoitakse *Xist* ekspressioon madalatel tasemetel erinevate geneetiliste elementide ja transkriptsioonifaktorite poolt. Parim väljakujunenud *Xist* negatiivne regulaator on *Tsix*. Sarnaselt *Xist*-ile on ka *Tsix* mittekodeeriv geen, ta kattub *Xist*-iga ning on tema transkribeeritud antisense RNA järjestus (Shibata ja Lee, 2004; Sado *et al.*, 2006). Hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes on nähtud, et inaktiivseks muutuvad need X kromosoomid, mis kannavad *Tsix* mutatsioone, sest sel juhul saab *Xist* vabalt X kromosoomi katta ning teda seeläbi inaktiveerida (Goodrich *et al.*, 2016). *Tsix*-il puudub esmane roll nii kromosoomi loendamises kui valikus. *Tsix* on vajalik nii-öelda ohutuks mehhanismiks, mis väldib *Xist* avaldumist valel ajal ja laseb inaktivatsioonil toimuda vaid juhul, kui inaktivatsiooniprotsess on alanud normaalselt. Seega on *Tsix* vajalik juhusliku X inaktivatsiooni mustri säilitamiseks. Pluripotentsetes tüvirakkudes on *Tsix* vajalik vaid rakkude diferentseerumise ajal *Xist*-i mahasurumiseks (Gayen *et al.*, 2015). *Tsix*-i transkriptsiooni reguleerib transkribeeritud DXPas34-kordusregioon, mis asetseb 750 bp *Tsix* promootorist allavoolu (ingl k *downstream*). DXPas34 sisaldab endas kahesuunalist promootori aktiivsust, tootes nii edaspidiseid kui ka vastupidiseid kattuvaid transkripte. X kromosoomi inaktivatsioon alguses stimuleerib DXPas34 *Tsix* ekspressiooni läbi selle enhanseraktiivsuse. Kui XCI on aga saavutatud, muutub DXPas34 repressiivseks ja stabiilselt vaigistab *Tsix*-i (Cohen *et al.*, 2007).

Inaktiivselt X kromosoomilt ekspresseeritakse ka teinegi *Xist* antisense RNA – *XistAR* (*Xist Activating RNA*), mis on pikk mittekodeeriv RNA ning mida on tõenäoliselt vaja tugevaks *Xist* RNA ekspressiooniks. *XistAR* käitub ilmselt kui enhanser RNA (*eRNA*) indutseerimaks *Xist*-

i. eRNA-d on enhanseritelt laialdaselt transkribeeritud ning võivad nende funktsioonidele kaasa aidata. Nii XistAR kui eRNA-de 5' cap on tihtilugu splaissimata või polüadenüleerimata ning nende poolestusaeg on mRNA-dega võrreldes lühike. *Xist* ekspressiooni suurendamiseks on piisav pigem XistAR-i transkript kui RNA ise. Kuna XistAR transkribeeritakse Xist 5' otsa lähedal, siis võib selle transkriptsioon muuta jagatud kromatiini ning märkida selle transkriptsiooniliselt sobivaks, aidates nii kaasa *Xist* ekspressioonile. Nii hiirtel kui inimestel võivad Xist transkriptid alata kahest erinevast stardisaidist. Igat transkripti „juhivad“ oma promootor – P1 või P2. P2 transkript algab 1503 bp P1-juhitud transkriptist allavoolu. XistAR mõjutab mõlema Xist transkripti algatamist (Sarkar *et al.*, 2015).

Kuigi nii Tsix kui ka XistAR transkribeeritakse Xist-ile antisense orientatsioonis, omavad nad vastupidiseid mõjusid Xist-i ekspressioonile – Tsix inhibeerib Xist ekspressiooni, samas kui XistAR tundub seda indutseerivat. Kahe RNA erinevad mõjud võivad tuleneda nende 3' otsade erinevustest. Tsix transkribeeritakse üle Xist 5' otsa ja läbi Xist promootori, XistAR transkript lõpeb aga täpselt Xist 5' otsa lähedal. Xist-i inhibeerimine nõuab antisense-i transkriptsiooni ulatumist üle Xist P1 promootori. Seepärast suudabki Xist-i ekspressiooni maha suruda Tsix, mitte XistAR (Sarkar *et al.*, 2015).

Hiirte varases embrüogeneesis toimub X inaktivatsioon kahe lainena. Kõigepealt läbivad blastotsüsti trofektodermi ja primitiivse endodermi päritolu rakud imprinditud XCI, mille tulemusena vaigistatakse vaid isalt pärinev X kromosoom (Sheardown *et al.*, 1997). Sisemises rakumassis (ingl k *inner cell mass*), mis moodustab õige embrüo, vastav X kromosoom aga reaktiveeritakse (van den Berg *et al.*, 2009). Järgnevalt 5,5-6,5 päeva pärast vahetada läbivad epiblasti rakud juhusliku X kromosoomi inaktivatsiooni, kus on võrdne tõenäosus nii emalt kui isalt pärineva X kromosoomi vaigistamiseks (Sheardown *et al.*, 1997). Endiselt on ebaselge, kuidas täpselt selline varajane imprinditud XCI isalt pärit rakuliinide poolt on programmeeritud. On leitud tõendeid, et emalt pärineval X kromosoomil on mingisugune marker, mis võimaldab tal jääda aktiivseks. Teisalt on ka teada isalt pärineva X kromosoomi eelistatud inaktiveerimine Xist vahendusel. Samas ei pea need kaks mehhanismi olema teineteist välistavad (van den Berg *et al.*, 2009).

Xist-i avaldumismustrite uurimine on näidanud, et lehmadel toimub XCI erinevates kudedes erinevate mehhanismide alusel. Näiteks ekstraembrüonaalses koes toimub inaktivatsiooniprotsess vastavalt sellele, millist päritolu on X kromosoom, samas kui embrüos endas on see täiesti juhuslik. Nii arenevas veise embrüos, lootes kui täiskasvanud kudedes XCI ajalise toimumise ja mehhanismide kohta puuduvad seni veel üdini kindlad ja usutavad tõendid (Couldrey *et al.*, 2017).

Arengustaadium, millal erinevatel imetajatel embrüonaalne genoom aktiveerub, erineb suuresti: hiirtel 1-2-rakustaadium, lehmadel ja inimestel 4-8-rakustaadium, lammaste ja küülikutel 8-16-rakustaadium. Seega vajadus XCI poolt põhjustatud doosikompensatsiooni järele algab tõenäoliselt samal ajal genoomi aktiveerumisega – umbes 2-rakustaadium hiirtel ning 8-rakustaadium inimestel. Fluorestseeruva Xist RNA *in situ* hübridisatsiooniga (RNA FISH, *fluorescent in situ hybridization*) on Xist-i väike täpik tuvastatav juba 2-rakustaadiumis 67% emaste hiirte rakkudes, täielik X-seoseline Xist kuhjumine toimub umbes 8-rakustaadiumis. Inimeste embrüote puhul märgati XIST signaali 65% rakkudest 8-rakustaadiumis. Varasemate rakustaadiumitega embrüod pole uuringuteks olnud kättesaadavad ja seetõttu ei ole võimalik öelda, kui vara võib XIST signaali inimestel leida. Kuna aga inimeste XIST-i signaali protsent 8-rakustaadiumis on suhteliselt sama, mis hiirte 2-rakustaadiumis, võib järeldada, et antud 8-rakustaadium võibki olla inimese XIST ekspressiooni alguseks (van den Berg *et al.*, 2009).

Kokkuvõtvalt on inimese XIST-il järgmised omadused (Migeon, 2014):

- 1) suur mittekodeeriv RNA;
- 2) kodeeritud geeni poolt, mis paikneb *Xic* regioonis asukohaga Xq13.2;
- 3) transkribeeritakse vaid Xi-lt; represseeritakse Xa-l;
- 4) transkriptid säilivad tuumas sünteesikoha läheduses;
- 5) RNA kuhjub ja ümbritseb inaktiivset X kromosoomi;
- 6) vajalik ja piisav *cis*-inaktivatsiooniks;
- 7) funktsioneerib embrüonaalses arengus vaid väga lühikese ajavahemiku jooksul; võib omada rolli vaigistamise säilitamises;
- 8) kui transkribeerida küllaldaselt, käitub kui vaigistaja, isegi kui ektoopiliselt sisestada autosoomi;
- 9) vaigistab kromosoomi indutseerides modifikatsioone muutmaks kromatiini transkriptsiooniliselt ebakompetentseks;
- 10) DNA järjestus ei ole evolutsiooni jooksul hästi säilinud, ent promotorelemendid on;
- 11) inimese geen on funktsioneeriv ka hiires.

1.1.1. Kromosoomide loendamine ja valik

X kromosoomide loendamine ja valik on kaks esimest sammu inaktivatsiooni protsessis ja kuuluvad initsiatsiooni ehk algatamise alla (Rougeulle ja Avner, 2003). Kuna Xist ei suuda indutseerida endogeense X kromosoomi inaktivatsiooni, siis peab *Xic*-i loendamisfunktsioon olema kodeeritud *Xist*-ist väljaspool asuvate elementide poolt (Avner ja Heard, 2001).

Loendamine on XCI protsessis äärmiselt oluline, sest rakk, milles on kaks X kromosoomi ja ühel neist puudub *Xic*, käitub justkui oleks tal vaid üks X kromosoom ja ei initsieeri inaktivatsiooni (Rougeulle ja Avner, 2003).

XCI algatamine sisaldab äratundmise etappi, mille käigus loendatakse ära X kromosoomide arv rakus võrreldes raku ploidsusega nii, et vaid üks X kromosoom oleks funktsionaalne diploidses täiskasvanud rakus. Kromosoomi valik antud protsessis tähendab, et üks kahest X kromosoomist võidakse eelistatult suunata inaktivatsiooni (Avner ja Heard, 2001). Tihtilugu aga ei inaktiveeri rakud ainult ühte X kromosoomi. Näiteks mitme X kromosoomiga rakud üritavad leida mingisugust kompromissi inaktivatsiooni protsessis ning jätavad rohkem kui ühe X_a (Wu ja Sun, 2016).

Valik, milline X kromosoom inaktiveeritakse, on liigiti erinev. Kui hiirtel on *Xist* juhusliku XCI ajal kindlalt monoalleelselt reguleeritud, siis nii küülikutel kui inimestel toimub see *Xist* ülesregulatsioonist allavoolu ehk 3' suunas. Üheks erinevuse põhjuseks võib olla antisense *Tsix* olemasolu hiirtel, mis on kriitilise tähtsusega juhuslikus, monoalleelses *Xist* ekspressioonis, ent on halvasti konserveerunud või puudub teistel imetajatel üleüldse (Okamoto *et al.*, 2011).

Kromosoomide loendamise blokeerimise hüpotees pakub välja, et piiratud kogus blokeerimisfaktoreid seondub diploidses rakus ühe X kromosoomi *Xic*-ile kaitstes teda inaktivatsiooni eest. Teisel kromosoomil olev *Xic* jääb kaitseta ja inaktiveeritakse. Hüpotees ennustab ka, et kui rakus on vaid üks X kromosoom, siis see blokeeritakse alati ja on seetõttu inaktivatsiooni eest kaitstud. Blokeerimisfaktor võib olla nii lahustuv molekul kui ka mingisugune unikaalne tuumakompartiment või seondumissait, näiteks tuumamembraan (Avner ja Heard, 2001). Erinevad deletsioonid *Xist* geeni 3' otsas põhjustavad X kromosoomi inaktivatsiooni isaste imetajate rakkudes, viidates blokeerimisfaktorite seondumissaitide asukohale (Monkhorst *et al.*, 2008).

Lisaks blokeerimisfaktorite mudelile on välja pakutud ka teisi mudeleid seletamaks XCI loendamist ja valikut. Näiteks ennustab üks mudel, et X kromosoomi saatus on kindlaks määratud enne XCI protsessi algust. Nii paraformaldehüüdiga kui metanooliga fikseeritud rakuproovid on näidanud, et vaja on teatud kromatiini struktuuri või tuuma organiseeritust, et replitseeritud alleelid esineksid FISH singletina erineva sagedusega nii tulevasel X_{i-1} kui X_{a-1} . Üks võimalik seletus võib olla tütar-kromatiidide erinev omavaheline seondumine kahel X kromosoomil. Olenemata täpsetest FISH signaalide põhjustest, näitavad need, et X kromosoomid erinevad vahetult enne X inaktivatsiooni viisil, mis võib ennustada kromosoomi edaspidise oleku (Mlynarczyk-Evans *et al.*, 2006). Teistsugune mudel seletab jällegi loendamist ja valikut X kromosoomide vahelise põgusa ristsuhtlemisega. Seda toetab ka kaks

erinevat uuringut, mis on näidanud XCI algusfaasis X kromosoomide lühiajalist liikumist teineteisele lähemale (Monkhorst *et al.*, 2008).

Üldiselt on kromosoomi loendamine ja inaktiveeritava kromosoomi valik suhteliselt vähe uuritud protsessid, mille kohta on tulevikus loodetavasti rohkem teadmisi ja informatsiooni.

1.2. Inaktivatsiooni levik

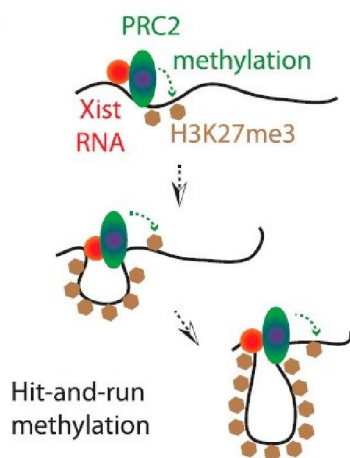
Xist avastati algselt inimestel kriitilise faktorina XCI jaoks ning selle unikaalne ekspressioonimuster on täiesti naisspetsiifiline täiskasvanud somaatilistes rakkudes. *Xist* katab inaktiivse X kromosoomi *cis* regulatsiooni käigus (Clemson *et al.*, 1996). *Cis* X inaktivatsioon on protsess, mis mõjutab kromosoomi kui tervikut, mitte üksnes selle osasid. Xist katab vaid selle kromosoomi, millel ta asub (Migeon, 2014). Omaduse tõttu katta tervet X kromosoomi, on pakutud, et Xist käitub kui struktureaalne RNA. Struktureaalne RNA võib olla igasugune RNA järjestus, mis moodustab funktsionaalse tähtsusega struktuuri. X inaktivatsioonile eelnevalt ekspresseeritakse Xist väga madalatel tasemetel mõlemalt X kromosoomilt (Rougeulle ja Avner, 2003).

XCI võib levida X:autosoom translokatsioonide puhul ka autosoomidele. Mitmed uuringud on näidanud, et autosomaalsetel järjestustel on inaktivatsioon limiteeritud ning neil ei säili see nii efektiivselt kui X kromosoomil. Seetõttu on pakutud, et X kromosoomil võib olla mitmeid vahepeatusid, mis aitavad vaigistamise levikule Xi-1 kaasa – teatud aja tagant korduvad ühesugused järjestused, mis annavad signaali, et inaktivatsiooni on vaja edasi viia (Gartler ja Riggs, 1983). Nendeks järjestusteks on LINE-1 (*long interspersed nuclear elements*) elemendid, sest neid on X kromosoomil tunduvalt rohkem võrreldes autosoomidega ning nende tihedus on korrelatsioonis XCI leviku efektiivsusega autosomaalsetesse regioonidesse nii X:autosoom translokatsioonides kui Xic transgeeni kontekstis (Chow *et al.*, 2010).

LINE elemendid on autonoomsed imetajaspetsiifilised transposoonid, millel puuduvad pikad terminaalised kordused. Kuigi suurem osa LINE-1 koopiatest imetajate genoomis on oma 5' otsadest kärbitud ning selle tulemusena on nad transkriptsiooniliselt ja retrotranspositsiooniliselt ebakompetentsed, siis mõned noored, täispikad LINE elemendid eksisteerivad nii hiire kui inimese genoomides. LINE-d on rangelt kontrollitud, eriti just iduliinides DNA metülatsiooni ja RNA interferents (*RNAi*, *RNA interference*) mehhanismidega (Chow *et al.*, 2010; Bala Tannan *et al.*, 2014). LINE elementide rohkust on eriti märgatud just X inaktivatsiooni keskuse piirkonnas, samas kui need regioonid, mis sisaldavad endas XCI-st pääsevaid geene, omavad märgatavalt madalamat LINE elementide sisaldust võrreldes

ülejäanud X kromosoomiga. LINE L1 elementides sisalduvad motiivid esinevad väga erinevate tihedustega võrreldes XCI sihtmärgiks olevaid geene ja sellest pääsevaid geene. Üleenoomsed motiivide kaardistamised on näidanud, et need inaktiivsete autosomaalsete geenidega seotud motiivid omavad selgelt eristatavaid omadusi, mis näitavad nende rolli XCI protsessis: a) neid on X kromosoomis oluliselt rohkem kui autosoomides, b) neid on oluliselt rohkem nende geenide ümbruses, mis on XCI sihtmärgiks võrreldes inaktivatsioonist pääsevate geenidega, c) nad kuuluvad L1 elementide hulka – evolutsiooniliselt nooremate L1P ja L1HS alamperekondadesse (Bala Tannan *et al.*, 2014).

Kuidas täpselt Xist RNA mööda X kromosoomi levib, on endiselt välja selgitamisel (Simon *et al.*, 2013). Üheks võimaluseks on Xist RNA seondumine eelistatud lookustesse hüpleval viisil ja levimine piiratud arv värbamislookustest (Pinter *et al.*, 2012). Kõrgresolutsioonilised mikroskoopilised uuringud üksikutest rakkudest näitavad vähem Xist RNA molekule inaktiivsel X kromosoomil kui seni arvatud, viidates „löö ja jookse“ (ingl k *hit and run*) mudelile – Xist-PRC2 (*polycomb repressive complex*) kompleksid on kinnitunud sekundaarsetesse saitidesse ja perioodiliselt metüleerivad nukleosoomi liikudes mööda Xi-d samal ajal tehes kromatiinist silmuseid (joonis 2) (Sunwoo *et al.*, 2015). *Cis*-regulatsioonis XIST/Xist RNA leviku kaudu vaigistamine võib värvata vaigistamisfaktoreid ka autosomaalsetelt segmentidelt, mis on liitunud inaktiivse X kromosoomiga translokatsiooni või insertiooni tagajärjel. Autosomaalsete regioonide puhul on vaigistamine vähemefektiivne, viidates spetsiifiliste elementide olemasolule X kromosoomil, mis aitavad kaasa inaktivatsiooni levikule ja säilitamisele (Sharp *et al.*, 2002). Paraku on antud teema kohta suhteliselt vähe infot ning pidevad uuringud selle protsessi detailsemaks mõistmiseks jätkuvad.



Joonis 2. „Löö ja jookse“ mudel. (Sunwoo *et al.*, 2015) järgi. Xist-PRC2 kompleksid on ankurdunud sekundaarsetesse saitidesse ja metüleerivad perioodiliselt nukleosoomi ning liikudes inaktiivsel X kromosoomil moodustavad kromatiinist väljaulatuvaid silmuseid.

1.3. Inaktivatsiooni säilitamine

Kui X kromosoomi inaktivatsioon on kord saavutatud, säilitatakse see mitmete rakupõlvkondade jooksul. Kui XCI algatamise kohta on infot suhteliselt palju, siis protsessi säilitamise kohta on endiselt suhteliselt vähe infot. Tsütogeneetilised uuringud viitavad mitmetele rikastatud epigeneetilistele markeritele Xi-l, üheks selliseks näiteks on Xist. Mitmed eukromatiiniga seotud histoonimarkerid nagu H3K9ac, H3K4me ja H3K4me3 kaovad Xi katmise järel, samas mitmed repressiivsed markerid nagu H3K27me3, H3K9me2-3, H4K20me1, H2AK119ub ja H2Aub1 hakkavad inaktiivsel X-il ilmuma. Hiire Xi puhul on täheldatud, et PRC2 poolt katalüüsitud H3K27me3 katab suurt osa hiire inaktiivsest X kromosoomist. Mutatsioonid ainult PRC2-s või *Xist* geenis omavad väga väikest mõju Xi geenide vaigistamisele pärast selle alustamist, mis tähendab, et need faktorid ei ole inaktivatsiooni säilitamisel vajalikud. Hiire Xi vaigistamisel osaleb 94 geeni ning 32 valku (Chan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015).

Xi suletakse „Xist RNA pilve“ abil heterokromatiinsesse konfiguratsiooni, mis hõlmab endas valkude PRC1 ja PRC2 värbamist, lüsiinide 9 ja 27 hüpermetülatsiooni H3 histoonil, deatsetülatsiooni H4 histoonil ning hilise replikatsiooni ajastamist (Zhang *et al.*, 2007). Hilist replikatsiooni peetakse üheks inaktivatsiooni säilitamise oluliseks tunnuseks. Inaktiivset X kromosoomi on interfaasi ajal võimalik tuumas näha kui tihedat massi, mida nimetatakse Barri kehakeseks ning see paikneb tihtilugu tuuma perifeerias (Chadwick ja Willard, 2003; van den Berg *et al.*, 2009). Inaktiivse X kromosoomi lähedus tuumakesele võib olla vahendatud spetsiifiliste elementide poolt nagu geenid *Firre* ja *Dxz4*, mis seondavad CTCF (CCCTC-seondumiskasvaja) spetsiifiliselt inaktiivsele X kromosoomile. *Firre* mahasurumine põhjustab repressiivse markeri H3K27me3 kadumise aktiivsel X kromosoomilt, millel on tõenäoliselt oluline osa seoses positsioneerimisega heterokromatiini säilitamisel (Yang *et al.*, 2015). Barri kehakese moodustumine on mitmeastmeline protsess sisaldades mitmeid radasid seoses repressiivse heterokromatiini moodustumisega. Mõningateks tähelepanuväärsemateks näideteks on spetsiifiliste histooni saba modifikatsioonide omandamine või kadumine; kromatiini rikastumine mitmete histoonidega või hoopis nende kahanemine; DNA metülatsioon CpG saarekeste X-liitelises promotoris ning laiaulatuslik kromatiinikiudude topoloogiline ümberkorraldamine. Kuidas täpselt need erinevad rajad on seotud Xist RNA kuhjumisega ja üksteisega, on suhteliselt vähe mõistetud (Moindrot *et al.*, 2015).

Raskusi on tekitanud peamiste faktorite tuvastamine, mis algatavad vaigistamiskaskaadi varases arengus. Arvatavasti sisaldavad need faktorid ühte või mitut RNA-d seondavat valku (*RBP*, *RNA binding protein*). Peamiseks selliseks faktoriks on pakutud juba eelpool mainitud

PRC2, mis vahendab H3K27 metülatsiooni ning mis seondub otseselt Xist RNA-le. PRC2 ja Xist RNA on ruumiliselt teineteisest eraldatud ning PRC2 värbamist vahendab transkripti regioon, mis on arvestatava tähtsusega A-kordusregioonist eraldi. Kaheks teiseks faktoriks on pakutud tuumamaatriksi valk SATB1 (*special AT-rich DNA-binding protein 1*) ja RBP SAF-A/hnRNPU. SATB1-l arvatakse olevat kaudne roll võimaldades varase arengu „võimaluse aknas“ Xist vaigistamist. SAF-A/hnRNPU seondub aga Xist RNA-le otseselt oma RRM domeeni kaudu ning aitab kaasa Xist RNA paiknemisele (Moindrot *et al.*, 2015).

X-liiteliste geenide promootorite CpG saarekeste DNA metülatsioon on molekulaarne võtmeomadus, mis lukustab vaigistamise. XCI säilitamine on kindlustatud ka histoonide modifitseerimisega, mida lisatakse progressiivselt kogu varajase arengu käigus. Erinevad geenid vaigistatakse erinevatel aegadel olles vastavuses epigeneetiliste muutustega (Csankovszki *et al.*, 2001). Hilisemad uuringud kasutades erinevaid inhibiitorite kombinatsioone histoonide deatsetülaaside ja DNA metüültransferaaside vastu ning mutatsioonid Xist-il näitavad, et XCI säilitamine nõuab Xist-i, histoonide hüpoatsetülatsiooni ja DNA metülatsiooni sünergiat (Csankovszki *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2011).

On näidatud, et metülatsiooni näol on tegemist olulise protsessiga säilitamaks XCI (Venolia *et al.*, 1982). X kromosoomil olevad geenid, mis on alid XCI-le, omavad CpG saarekesi, mis meestel on metüleerimata, ent naistel on nähtud osalist metülatsiooni; kajastades seda, et promootorite CpG saarekesed on Xa-l samamoodi metüleerimata nagu autosomaalsed CpG saarekeste promootorid. Xi puhul on aga vastavad promootorid metüleeritud (Cotton *et al.*, 2011). Xi kromatiini äärmiselt stabiilne olek inaktivatsiooni säilitamise ajal viitab mitmetele kattuvatele funktsionaalsetele vaigistatismehhanismidele, mis turvaliselt lukustavad Xi transkriptsioonilise inaktiivsuse (Chadwick ja Willard, 2003).

1.4. X inaktivatsiooni *cis*- ja *trans*- regulatsioon

Xic sisaldab valke kodeerivaid geene, mittekodeerivaid geene ja nende *cis*-regulaatorseid elemente, mis kindlustavad korrektse initsiatsiooni ja unikaalse ühe X kromosoomi inaktivatsiooni igas naisorganismi rakus (van Bemmelen *et al.*, 2016).

Faktorid, mis reguleerivad *Xist* ja *Tsix* regulatsiooni ning seeläbi ka X kromosoomi inaktivatsiooni, klassifitseeritakse kahte kategooriasse: *cis*-regulaatorne võrgustik ja *trans*-regulaatorne võrgustik. *Cis*-regulaatorne võrgustik on justkui X kromosoomi sisse ehitatud esindades klassikalist *Xic*-i, ning on moodustunud peamiselt ja ilmselt ka ainukesena mitmetest geneetilistest faktoritest, mis käituvad *cis*-regulatsioonis DNA interaktsioonide vahendusel.

Trans-regulaatorid on aga difuused ja seega võivad mõjuda ka eemalt ning olla kas autosomaalselt kodeeritud või X-liitelised (van Bemmél *et al.*, 2016).

1.4.1. *Cis*-regulatsioon

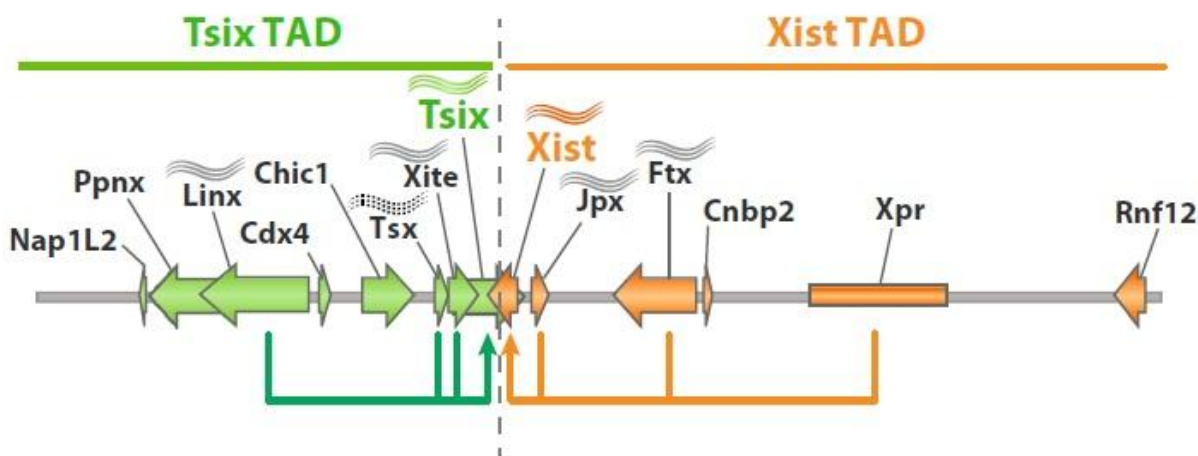
Uurides selliseid rakuliine, mis sisaldavad endas X kromosomaalseid deletsioone ja X:autosoom translokatsioone, on leitud, et X kromosoomi inaktivatsiooni *cis*-regulatsiooni võtmeelemendid paiknevad *Xic*-is. Nendes uuringutes leiti XCI jaoks vajalik *Xist* ning selle läheduses ka mitmeid teisi mittekodeerivaid RNA geene, millest paljud on seotud kas positiivse või negatiivse XCI regulatsiooniga. Enamike kohta on endiselt ebaselge, kas nad reguleerivad *Xist* või *Tsix* ekspressiooni RNA tasemel nende transkriptide kaudu või DNA tasemel läbi neis sisalduvate regulaatorsete elementide (Rastan ja Robertson, 1985; Heard *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996).

Mittekodeerivatest RNA geenidest kaks – *Jpx* (*just proximal to Xist*) ja *Ftx* (*five prime to Xist*) asuvad *Xist*-il ülesvoolu ehk 5' suunas (ingl k *upstream*) (joonis 3). Mõlema geeni puhul on näidatud, et nad pääsevad X kromosoomi inaktivatsioonist ehk neid ekspresseeritakse *Xist*-iga samaaegselt (Chureau *et al.*, 2011). *Jpx* heterosügootne deletsioon emaste embrüonaalsetes tüvirakkudes teadaolevalt vähendab *Xist* ülesregulatsiooni (ingl k *upregulation*) mõlemalt alleelilt, viidates *Jpx* osalemisele *trans*-regulatsioonis. Selliseid rakke võiks päästa autosomaalse transgeeniga (Tian *et al.*, 2010). Samas mitmed *Jpx*- ja *Ftx*-sisaldavad transgeenide uuringud ei tuvastanud mingisugust ektoopilist *Xist*-i ülesregulatsiooni ning heterosügootne *Jpx*-i ja *Ftx*-i sisaldavate regioonide deletsioon emaste hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes ei mõjutanud *Xist* ülesregulatsiooni. Need tulemused viitavad, et *Jpx* ja *Ftx* aktiveerivad *Xist*-i peamiselt *cis*-vahendatud mehhanismide kaudu (van Bemmél *et al.*, 2016).

Sarnaselt *Xist*-i *cis*-regulaatoritele, mis asuvad *Xist* geenil ülesvoolu, paiknevad ka *Tsix* positiivsed regulaatorid *Tsix* promootoril ülesvoolu. Nendeks on RNA *Tsx* (*testes-specific-X-linked*) ja enhanser *Xite* (*X inactivation intergenic transcription element*) ning hiljuti avastatud *Linx* (*long intergenic transcript in Xic*) ja *Chic1-s* (*cysteine rich hydrophobic domain 1*) sisalduvad eeldatavalt regulaatorsed elemendid, mis avastati nende kaugemale ulatuvate *cis*-interaktsioonide tõttu nii *Tsix* promootoriga kui enhanseriga *Xite* (Nora *et al.*, 2012; van Bemmél *et al.*, 2016). *Xite* käitub *cis*-regulatsioonis kui *Tsix* enhanser olles samal ajal ka ise transkribeeritav (Ogawa ja Lee, 2003).

Seega jaguneb *cis*-regulaatorne keskkond kaheks regiooniks (joonis 3) – üks katab *Tsix* regulaatorseid elemente ja teine *Xist*-i omi. 5C uuring, mis kaardistab kromatiini interaktsioonide sagedust ja/või kalduvust leidis, et *Xic* ei ole eraldatud mitte ainult

funktsionaalselt vaid ka ruumiliselt. Kromosoomi interaktsioonide kaart X inaktivatsiooni keskusest näitab struktuuralselt organiseerunud regiooni, mis on jagunenud ruumiliselt kaheks domeeniks – niinimetatud topoloogiliselt seonduvaks domeeniks (TAD, *topologically associating domains*) (Nora *et al.*, 2012). Kahe TAD-i piir paikneb täpselt *Xist*-i ja *Tsix*-i promootorite vahel, eraldades seeläbi *Xist*-i promootori ja selle aktivaatorid *Tsix*-i promootorist ja selle vastavatest regulaatoritest (van Bemmelen *et al.*, 2016).



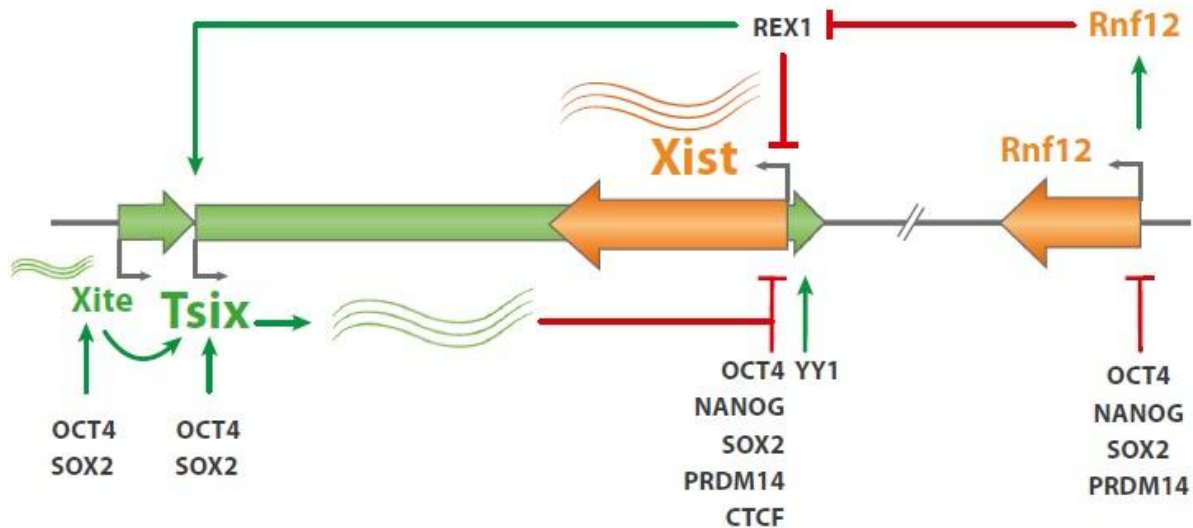
Joonis 3. Cis-regulaatorne keskkond ja selle ruumiline jaotus. (van Bemmelen *et al.*, 2016) järgi. (Laineline sümbol geeni üleval viitab mittekodeerivale geenile; *Tsx* omab nii kodeerivat kui mittekodeerivat funktsiooni).

TAD domeeni organiseeritus on oluline korrektseks transkriptsiooniliseks regulatsiooniks. On teada, et kogu hiire ja inimese genoom on organiseeritud TAD domeenidesse ja „piirid“ nende vahel on liikide vahel konserveerunud, mis tähendab, et antud organiseeritus on funktsionaalse tähtsusega. Samuti võib TAD domeene pidada geeniregulatsiooni diskreetseteks ühikuteks, kuna samasse TAD domeeni kuuluvate geenide transkriptsiooniline regulatsioon toimub kooskõlastatud viisil (Dixon *et al.*, 2012; Le Dily *et al.*, 2014). 58 kb suurune *Xist* ja *Tsix* TAD „piiri“ deletsioon põhjustab vähenenud ruumilist eraldatust kahe domeeni vahel (Nora *et al.*, 2012). Struktuuriülelised analüüsid on näidanud, et TAD domeeni „piirid“ on rikastatud mitmete genoomsete elementidega, viidates nende olulisusele „piiride“ moodustamises – eriti just arhitektuurilised valgud CTCF, kohesiin ja mediaator tunduvad olevat olulised allikad topoloogilise domeeni struktuuri moodustumisel (Dixon *et al.*, 2012; van Bemmelen *et al.*, 2016). Küll aga on veel väljaselgitamisel täpsed mehhanismid TAD domeeni kujunemisel ning „piiride“ tekkimisel (van Bemmelen *et al.*, 2016).

1.4.2. *Trans*-regulatsioon

X inaktivatsiooni keskuse *trans*-regulatsioon viitab seal paiknevate geenide regulatsioonile difusiivsete faktorite kaudu ning see võib olla nii inhibeeriv kui aktiveeriv. Mitmed uuringud on viidanud OCT2, NANOG, SOX2, REX1 ja PRDM14 käitumisele XCI inhibiitoritena kas otseselt represserides *Xist*-i, aktiveerides *Tsix*-i või kaudselt represserides XCI aktivaatoreid (joonis 4) (Donohoe *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2011; Gontan *et al.*, 2012; Payer *et al.*, 2013). Isastest embrüonaalsetest tüvirakkudest OCT4 eemaldamise tulemuseks on *Xist*-i diferentseerumine ja ülesregulatsioon samale tasemele diferentseeruvate emaste embrüonaalsete tüvirakkudega, samas kui OCT4 eemaldamine emastest embrüonaalsetest tüvirakkudest põhjustab *Xist* bialleelset ülesregulatsiooni (Navarro *et al.*, 2008; Donohoe *et al.*, 2009). OCT4, NANOG, SOX2 ja PRDM14 seonduvad tugevalt *Xist* esimesele intronile, mis võib tähendada, et antud piirkond vahendab nende represserivat tegevust *Xist*-ile (van Bemmelen *et al.*, 2016). OCT4, NANOG, SOX2 ja PRDM14 represserivad XCI-d ka kaudselt inhibeerides *Rnf12* ekspressiooni (joonis 4). OCT4, NANOG, SOX2 ja PRDM14 seonduvad *Rnf12* promootori lähedale ning NANOG või OCT4 vähenemine põhjustab *Rnf12* vähenenud ekspressiooni (Navarro *et al.*, 2011).

Rnf12 on valku kodeeriv geen ning XCI aktivaator kodeerides E3-ubikvitiinligaasi RNF12, mis on seotud REX1 doos-sõltuva degradatsiooniga (Navarro *et al.*, 2011). Pluripotentsusfaktor REX1 on X kromosoomi inaktivatsiooni mehhanismi käigus RNF12 põhiliseks sihtmärgiks. RNF12 põhjustab REX1 ubikviniatsiooni ehk ubikvitiinvalk seondub REX1-ga ning proteasomaalset lagundamist. *Rnf12* nokaut embrüonaalsed tüvirakud näitasid suurenenud REX1 taset. REX1 seandumiskohad on leitud nii *Xist* kui *Tsix* reguloorsetest regioonidest. Naiste embrüonaalsetes tüvirakkudes inhibeerib REX1 üleekspressioon nii *Xist* transkriptsiooni kui X kromosoomi inaktivatsiooni (Gontan *et al.*, 2012). *Rnf12* asub 500 kb *Xist*-ist ülesvoolu. *Rnf12* ekspressioon on hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes madal, ent ülesreguleeritakse pärast diferentseerumist. Sellele aitavad kaasa vähenenud pluripotentsete faktorite tasemed, mis represserivad *Rnf12* ekspressiooni pluripotentses staadiumis. *Rnf12*^{+/-} rakud on RNF12 koguse mõttes nagu mehe rakud, seega peavad olema veel mingisugused lisafaktorid, mis aktiveerivad X kromosoomi inaktivatsiooni naiste diferentseeruvates embrüonaalsetes tüvirakkudes. Lisaks on aktiivse X kromosoomi *Rnf12* ekspressioon vajalik Xi saavutamisel, pakkudes tugevat tagasisidemehhanismi kindlustamiseks vaid ühe X kromosoomi XCI (van Bemmelen *et al.*, 2016).



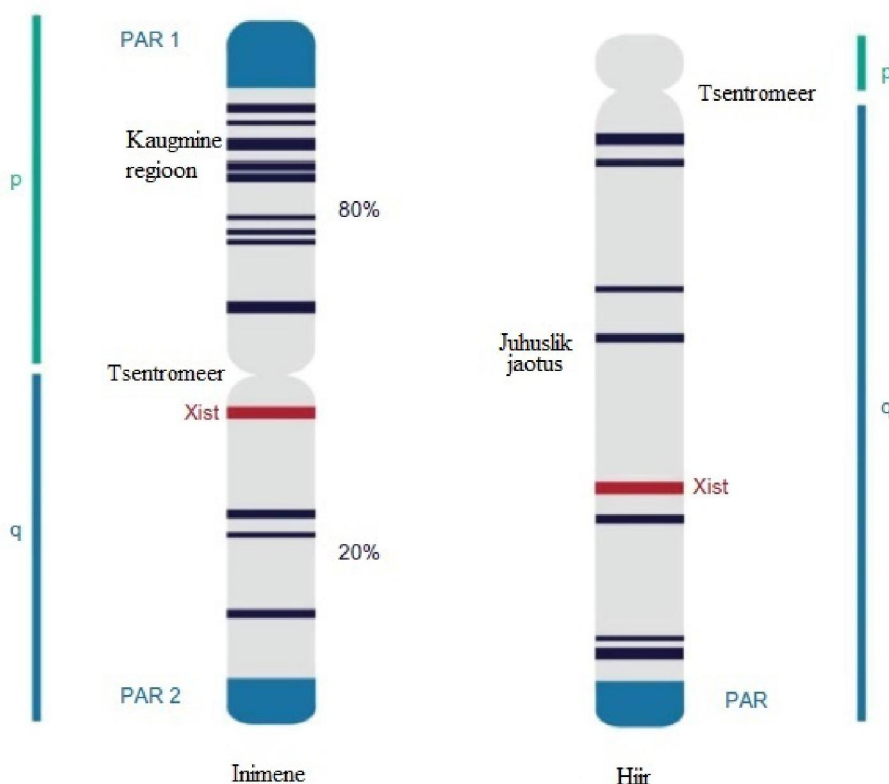
Joonis 4. Xic trans-regulatsioon on mõjutatud mitmetest difusiivsetest faktoritest. (van Bommel *et al.*, 2016) järgi. Autosomaalselt kodeeritud pluripotentsuse faktorite võrgustik represserib kas otseselt *Xist* aktivatsiooni või läbi *Xist* ja *Tsix* repressorite aktivatsiooni. OCT4, SOX2, NANOG ja PRDM14 represserivad samuti XCI aktivaatorit Rnf12. XCI aktivatsioon hõlmab endas REX1 doos-sõltuvat lagundamist RNF12 poolt. REX1 represserib *Xist*-i ja aktiveerib *Tsix*-i. Autosomaalselt kodeeritud YY1 aktiveerib *Xist* transkriptsiooni konkureerides REX1-ga seondumaks *Xist* regulatoorsele elementidele.

1.5. Pääsevad geenid

Kuigi võiks eeldada, et X kromosoomi inaktivatsiooni käigus vaigistatakse kogu kromosoom oma geenidega, on kõigil imetajatel gene, mis sellest pääsevad. Sellistel geenidel puuduvad tavaliselt vaigistamisega seotud *Xist* RNA katmine ja repressiivsed histooni modifikatsioonid. Pääsevatel geenidel on ka täheldatud spetsiifilisi DNA metülatsiooni jälgi. Praegu on veel ebaselge, kas spetsiifilised kromatiini elemendid nagu CTCF on samuti protsessi kaasatud. Lisaks on suhteliselt vähe teada XCI-st pääsevate geenide jagunemisest erinevates kudedes *in vivo* ning mehhanismidest, mis kontrollivad koespetsiifilisi erinevusi (Berletch *et al.*, 2015).

Inimesel pääsevad inaktiivsel X kromosoomil umbes 15% X-liitelistest geenidest inaktivatsioonist, nad on tugevama puhastava valiku all kui teised X-liitelised geenid ning vastavad geenid on üle X kromosoomi jagunenud klastritesse (Carrel *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2010; Marks *et al.*, 2015). Hiirtel on aga pääsevad geenid kinnitunud vaigistatud kromatiini erinevatesse regioonidesse ning nad on mööda kromosoomi laiali (Berletch *et al.*, 2010). On ka täheldatud, et inaktivatsioonist pääsevad geenid on suhteliselt LINE-1 elementide vaesed (Chow *et al.*, 2010). Uurides kultuuris kasvatatud inimese/hiire hübriidrakke ja kallutatud XCI-ga inimeste rakke on leitud, et pääsemise tase varieerub 10-13% geenidest ning veel omakorda 10-20% geenidest erinevad rakuliinide ja inimeste vahel (Berletch *et al.*, 2015). Hiirel on

selliseid gene umbes 15, ent pääsemine võib koeti erineda, jäädes siiski vahemikku 3-7% kõigist geenidest, üldjuhul siiski 3% (joonis 5) (Berletch *et al.*, 2015; Marks *et al.*, 2015).



Joonis 5. Pääsevad geenid vastavalt inimese ja hiire X kromosoomil. (Valencia ja Wutz, 2015) järgi. Geenid on märgistatud tumedate triipudena. PAR – pseudoautosomaalne regioon; homoloogilised piirkonnad, kus toimub homoloogiline rekombinatsioon; inimesel on mõlemas kromosoomi otsas üks PAR, hiirel vaid kromosoomi pikas õlas.

Inaktivatsiooni levikut ja seejuures ka geenide pääsemist inaktivatsioonist võib mõjutada ka X inaktivatsiooni keskuse asukoht tsentromeeri suhtes. Joonisel 5 on näha, et inimesel ja hiirel on Xist ja tsentromeeri vaheline kaugus väga erinevad. Hiirel asub tsentromeer kromosoomi ühes otspunktis ja seega ei mõjuta see eriti kromosoomi vaigistamise levimist pikal õlal. Inimesel on aga tsentromeer kromosoomi keskosas, eraldades lühikese õla pikast õlast, kus asub ka Xic regioon, milles omakorda paikneb Xist (Berletch *et al.*, 2010). Seega võib tsentromeer takistada Xist-i levikut lühikesele õlale ning ta ei suuda seal efektiivselt kõiki gene vaigistada.

Teatud kudedes, näiteks trofoblasti hiidrakudes, on X-liiteliste geenide pääsemise tase kõrge. Sellistes rakkudes ei moodusta Xist RNA täielikku vaigistamiskompartimenti ning nii heterokromatiini kui eukromatiini märgised eksisteerivad koos (Galupa ja Heard, 2015). Samuti on teada, et CpG saarekestega geenid, mis pääsevad XCI-st, on metüleerimata nii Xa-1 kui Xi-1 (Cotton *et al.*, 2011). Teatav roll on geenide pääsemisel ka nende ekspresseeritavuse tasemel,

ent see ei tundu olevat ainus määrav jõud. Näiteks *Car5b* ekspressioonitase on munarakkudes kõrgem kui Patski rakkudes, ent inaktivatsioonist pääseb ta just Patski rakkudes (Berletch *et al.*, 2015).

Kui suures ulatuses geenid vaigistatud olekus püsivad varieerub suuresti nii koetüübist, arengustaadiumist, liigist kui ka indiviididest liikide vahel. Neid gene iseloomustab üks või mitu järgnevatest tunnustest:

- a) Omab funktsionaalset koopiat Y kromosoomil (Agulnik *et al.*, 1994)
- b) Asub X kromosoomi pseudoautosomaalses regioonis. Antud regioon on X ja Y kromosoomis homoloogilise järjestusega (suurus ja geenisisaldus varieerub liigiti) ning see võimendab korrektset sugukromosoomide bivalentide eraldumist meioosi käigus; selle tulemusena avalduvad kõik antud regiooni geenid nii X kui Y kromosoomil (Lahn ja Page, 1999)
- c) X kromosoomi koosseisu sattunud alles hiljuti ning ei ole veel vaigistamisprotsessi mõju all (Lahn ja Page, 1999)
- d) Embrüogeneesi käigus vaigistatud, ent avalduvad mõningal määral pärast sündi (Lingenfelter *et al.*, 1998).

Inimesel paiknevad enamik pääsevatest geenidest X kromosoomi lühikesel õlal (Orstavik, 2006; Zhang *et al.*, 2013). Antud gene ekspresseeritakse bialleelselt kogu organismi elu jooksul, mis on oluline naiste normaalse fenotüübi arenguks (Van den Veyver, 2001; Berletch *et al.*, 2015). Kuigi geen võib inaktivatsioonist pääseda, on näidatud, et XCI-st pääseval geenil on ekspressioonitase tunduvalt madalam võrreldes tema teise alleeliga aktiivsel X kromosoomil (Nguyen ja Disteche, 2006). Vastav ekspressioonitase Xi-l on kõigest 10% aktiivsel X kromosoomil olevast alleelist. Hinnanguliselt 35% Xp ja 5% Xq geenidest ekspresseeritakse mõningase määraneni (Carrel ja Willard, 2005).

Hiirte puhul on näidatud, et geeni *Kdm5c* pääsemisele inaktivatsioonist eelneb tema vaigistamine juba varases embrüonaalses arengus. Enamike pääsevate geenide puhul on aga teadmata, kas nad on algselt vaigistatud ja siis reaktiveeritud või pole nad kunagi XCI sihtmärgiks (Marks *et al.*, 2015). Väikesel hulgal geenidest on X kromosoomi inaktivatsioonist pääsemine üldlevinud ja oluline omadus. Sinna hulka kuuluvad näiteks geenid *Ddx3x*, *Kdm6a*, *Eif2s3x* ja *Kdm5c* – kõigil on sarnaste funktsioonidega konserveerunud Y-liiteline paraloog. Taolised X/Y geenid mängivad transkriptsiooni ja translatsiooniregulatsioonis olulist rolli ning on väga doositundlikud, mis võib seletada nende järjepidevat XCI põgenemist kõigis kudedes (Berletch *et al.*, 2015).

X kromosoomi inaktivatsioonist pääsevaid gene peetakse inimestel Turneri (XO) ja Klinefelteri (XXY) sündroomide üheks põhjuseks, sest neil juhtudel on geenidoos vastavalt kas madalam või kõrgem kui normaalse kromosoomistikuga rakus (Vacca *et al.*, 2016). Võrreldes 46, XX kromosoomistikuga naistega puuduvad Turneri sündroomiga naistel (45, X) bialleelselt ekspresseeritud X-liitelised geenid, mistõttu avaldub neil selgelt erinev fenotüüp – enneaegne munasarjade puudulikkus ja lühike kasv. See viitab pääsevate geenide funktsioonide ja täpse geenidoosi tähtsusele, sest enamik Y homoloogiga X-liitelisi gene pääsevad XCI-st (Park *et al.*, 2010).

Hiirte puhul on sugukromosoomide aneuploidsusest tingitud fenotüübid reeglina kergemad kui inimestel. Emastel hiirtel, kellel on üks X kromosoom (39, X) on üldjuhul suhteliselt normaalsed ja viljakad, kuigi võrrelduna normaalse kromosoomistikuga (40, XX) emaste hiiretega on viljakustase siiski madalam (Burgoyne ja Baker, 1985). Kuna hiirtel on XCI-st pääsevaid gene võrreldes kõigi X kromosoomi geenidega oluliselt vähem kui inimestel, üldjuhul vaid 3%, siis tõenäoliselt ongi see põhjuseks, miks X monosoomia puhul ei ole fenotüübilised muutused või erisused nii rasked.

Bioinformaatilised analüüsid, kus on võrreldud pääsevate geenide genomset ümbrust XCI sihtmärgiks olevate geenidega viitavad sellele, et inaktiivsel X kromosoomil paiknevate spetsiifiliste regioonide või geenide XCI potentsiaal võib olla vahendatud mitmesuguste järjestuselementide poolt, mõned neist inaktivatsioonile kaasa aidates, teised hõlbustades geenide inaktivatsioonist pääsemist. Näiteks pääsev geen *Jarid1c* omab selgelt väljakujunenud järjestusi, mis aitavad tal inaktivatsioonist hoiduda olenemata tema X-kromosomaalsest asukohast (Chow *et al.*, 2010). Mõningatel juhtudel võib pääsemine olla põhjustatud ka puudulikest inaktivatsiooni vahendavatest järjestustest ja/või lähedal asuvate pääsevate geenide mõjutustest. CTCF-seondumissaidid paiknevad pääsevate geenide ja inaktiveeritud regioonide vahel, millest võib järeldada, et ehk on neil oluline roll inaktivatsioonist pääsemise vahendamisel blokeerides inaktivatsiooni levikut (Filippova *et al.*, 2005).

Mõned pääsevad geenid on ka koespetsiifilised, s.t. geenid, mis ühes kindlas koes pääsevad X kromosoomi inaktivatsioonist, ent teistes kudedes vaigistatakse. Sellised geenid annavad võimaluse võrrelda sugudevahelisi funktsionaalseid mehhanisme vastavates kudedes. Kuus geeni – *Gpm6b*, *Gprasp1*, *Syp*, *Gdi1*, *Plp1* ja *Tmem47* paiknevad hiirte ajus ning neid XCI käigus ei vaigistata. Nendest kuuest geenist kolm – *GPM6B*, *SYP* ja *PLP1* pääsevad XCI-st ka inimestel, mis tähendab, et neid ekspresseeritakse naistel suuremas kontsentratsioonis kui meestel. Põrnaspetsiifilistest geenidest kolm – *Vsig4*, *Cfp* ja *Bgn* on seostatud autoimmuunhaigustega nii hiirel kui inimesel (Berletch *et al.*, 2015).

Üheks pääsevaks geeniks nii hiirtel kui inimestel on lncRNA *FIRRE/Firre*, mis kujutab endast markosatelliitset kordust paiknedes X inaktivatsiooni keskusest suhteliselt kaugel. *Firre* seondab valku hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U) ning toimib kui platvorm transkromosomaalsetes ühendustes, mis on seotud pluripotentsete radade regulatsiooniga isaste embrüonaalsetes tüvirakkudes. Samas ei ole *Firre* rolli seoses XCI-ga veel uuritud (Yang *et al.*, 2015).

Hetkel puudub terviklik arusaam, kuidas pääsevad geenid vaigistatud X kromosoomil XCI-st (Horvath *et al.*, 2013). Endiselt on väljaselgitamisel, miks mõned geenid ilma Y kooipiata pääsevad, miks inimesel pääseb rohkem gene inaktivatsioonist kui hiirel või miks erineb geenide pääsemine kudede ja indiviidide vahel nii palju (Migeon, 2016).

2. X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatatus

Kuna inaktivatsiooni protsess toimub juhuslikult kahe kromosoomi vahel, omavad teoreetiliselt 50% rakkudest aktiivset emalt pärinevat ja teised 50% aktiivset isalt pärinevat X kromosoomi (Jobanputra *et al.*, 2012). Märkimisväärset kõrvalekallet sellisest 1:1 suhtest nimetatakse kallutatuseks (Bolduc *et al.*, 2008). Informatsiooni X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusest on peamiselt saadud inimestel tehtud uuringutest.

Kallutatud XCI defineeritakse kui tendentsi inaktiveerida eelistatult kas emalt või isalt pärit X kromosoom. Raku „huvi“ ühe või teise X kromosoomi inaktiveerimise eelistamiseks võib tuleneda ühest või mitmest X-il paiknevast vigasest geenist, mis võib omakorda viia mittefunktsionaalse geenini, geeniekspressiooni häiringuteni või muutunud funktsiooniga valguni (Bolduc *et al.*, 2008). Kallutatud või äärmiselt kallutatud XCI on üldjuhul defineeritud kui ühte päritolu (kas emalt või isalt) X kromosoomi inaktivatsioon vastavalt kas vähemalt 75-80% või 90-95% rakkudes (Vacca *et al.*, 2016). Kallutatatus kas emalt või isalt päritud X kromosoomi kasuks on täiskasvanud naiste seas suhteliselt tavaline, umbes 35% kõikidest indiviididest omavad rohkem kui 20% kallutatust kummaski suunas (Wong *et al.*, 2011).

Erinevalt näiteks hiirtest ei ole inimese somaatilistest rakkudest tõendeid XCI imprintingu kohta (Kristiansen *et al.*, 2005). Teatud gene ekspressioonitakse kas emalt või isalt pärit genomilt geneetilise imprintingu tulemusena (Keverne *et al.*, 1996). Imprintingu mõistet kasutatakse kõikidel juhtudel, kui geenidel on erinev ekspressioonitase sõltuvalt sellest, kummalt vanemalt on geen päritud. Kui isalt päritud alleel on aktiivne, siis vaigistatakse vastav alleel emalt päritud kromosoomis ja vastupidi (Moore ja Haig, 1991).

Piimalehmade puhul ekspresseeritakse populatsiooni tasemel piimanäärmetes nii emalt kui isalt päritud X kromosoomi võrdselt ehk toimub juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon. Samas on isalt päritud X kromosoomi keskmine avaldumisprotsent 10...90% olenevalt konkreetsest loomast. Seega kas piimanääre saab alguse ühest või kahest tüvirakust või kallutab XCI-d mingisugune mittegeneetiline mehhanism (Couldrey *et al.*, 2017).

2.1. Kallutatuse tekkemehhanismid

X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus võib oma tekkelt olla kas primaarne või sekundaarne ehk omandatud (joonis 5) (Kristiansen *et al.*, 2005; Bolduc *et al.*, 2008; Minks *et al.*, 2008). Primaarne kallutatus võib olla tingitud kas juhusest või faktoritest, mis mõjutavad X inaktivatsiooni varases embrüonaalses arengus (Kristiansen *et al.*, 2005). Juhus seisneb selles, et suurem osa rakkudest võib inaktiveerida sama päritoluga X kromosoomi. Mida väiksem on rakupopulatsioon, kus inaktivatsiooni protsess parasjagu toimub, seda suurem on sellise juhuslikult tekkiva primaarse XCI kallutatuse tõenäosus (de Hoon *et al.*, 2015).

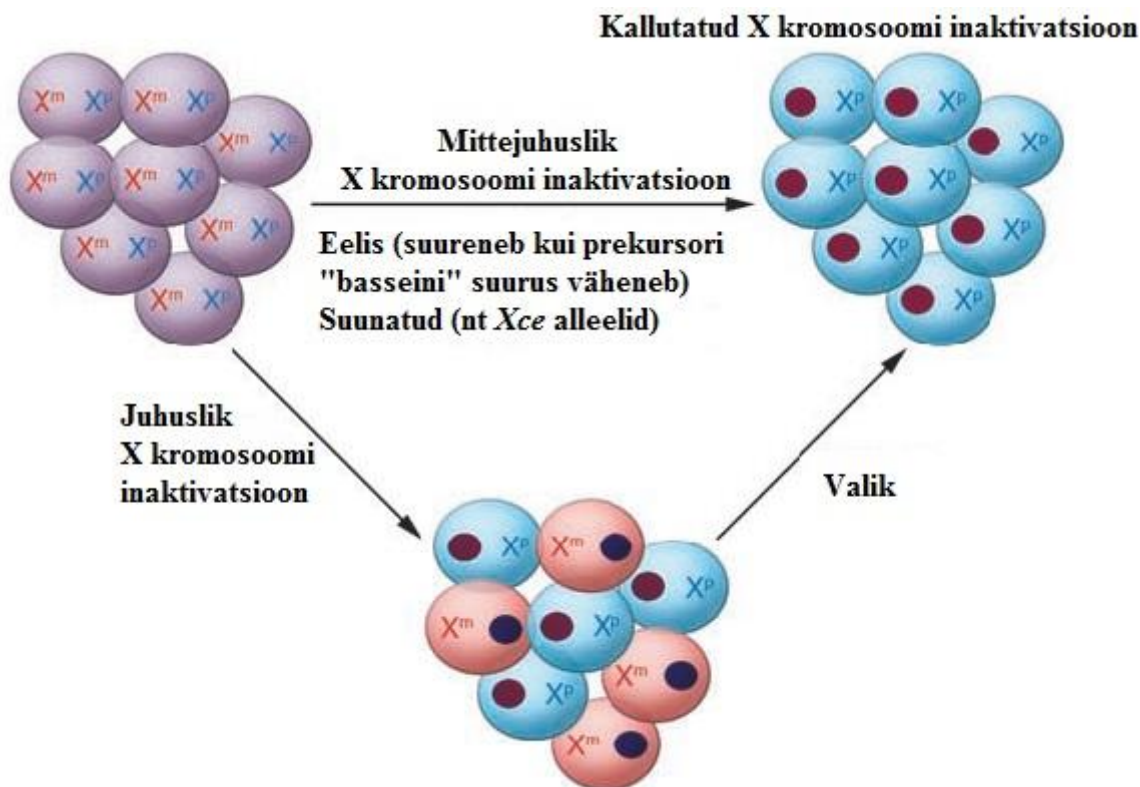
Primaarset mittejuhuslikku inaktivatsiooni võivad põhjustada ka mitmesugused kontrollivad elemendid. Näiteks hiirtel on lookus nimega X kromosoomi kontrolliv element (*Xce*, *X chromosome controlling element*), mis erineb liinisti ning põhjustab loomade ristamisel primaarset inaktivatsiooni kallutatust. Hetkel ei ole teada, et inimese XCI kallutatuses osaleks mõni sarnane lookus (Minks *et al.*, 2008; Peeters *et al.*, 2016). Hiire *Xce* on 176 kb suurune ning asub *Xist* geenist umbes 500 kb proksimaalselt (X tsentromeeri suunas). *Xce* mõjutab inaktiveeritava X kromosoomi valikut. *Xce* kuulub *cis*-elementide alla ning tal on neli erinevat alleeli: Xce^a , Xce^b , Xce^c ja Xce^d , mis püsivad aktiivsena erineva tendentsiga ($Xce^a > Xce^b > Xce^c > Xce^d$). Kui kahel kromosoomil on parasjagu erinevad *Xce* alleelid, siis toimub primaarne mittejuhuslik XCI (Calaway *et al.*, 2013).

Sekundaarne on põhjustatud selektsioonist kas spetsiifilise genotüübiga rakkude kasuks või vastu (Kristiansen *et al.*, 2005). See on inaktivatsioonijärgse rakuvaliku tulemus, mis toimub siis, kui rakkudes on mingisugune selektiivne surve heterosügootsele X-liitelisele geenile. Selline valik võib toimuda igas vanuses, koes või olla ka koespetsiifiline. Sekundaarne kallutatus võib olla ka elu jooksul väheneva tüvirakkude kogumi tulemus, suurendades võimalust, et enamik tüvirakke omavad sama Xi-d (de Hoon *et al.*, 2015).

XCI kallutatus tundub olevat päritav tunnus, mis lubab aimata, et rohkem kui üks X-liiteline geen võib mõjutada XCI mustrit (Vacca *et al.*, 2016). Kallutatud XCI võivad põhjustada stohhastilised efektid, perekondlik kalduvus X inaktivatsiooni kallutatusele või kasvueelis

nendele rakkudele, mis kannavad kas muteerunud geeni defektset või metsiktüüpi alleeli oma aktiivsel X kromosoomil (Van den Veyver, 2001).

On teada hulk perekondi, kus mitmel naisel on kallutatud XCI mustrid; tavaliselt on äärmiselt kallutatud mustrid (90% või enam) need, mis tunduvad olevat X-liiteliselt päritavad. Tõenäoliselt on tegemist mutatsiooniga X kromosoomil, mis mõjutab Xi valikut (Van den Veyver, 2001).



Joonis 5. Kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon naistel. (Minks *et al.*, 2008) järgi. (Tumeda ovaalina on kujutatud heterokromatiinne Xi; roosa rakk – emalt pärit X kromosoom, sinine rakk – isalt pärit X kromosoom). Kallutatud XCI võib olla põhjustatud nii primaarsest mittejuhuslikust inaktivatsioonist kui ka sekundaarsest ehk omandatud mittejuhuslikust inaktivatsioonist. Naise embrüos on kaks aktiivset X kromosoomi, kumbki mõlemalt vanemalt (emalt - X^m , isalt X^p). Inaktivatsiooni käigus võtab üks X kromosoom heterokromatiinse struktuuri. Järgnev stohhastiline või valikuline rakupopulatsiooni kasv viib inaktivatsiooni kallutatuseeni. Kui aga algne inaktivatsioon oli mõjutatud mõnest alleelist (nt hiire *Xce*), siis võib inaktivatsioon toimuda ühe alleeli suunas.

2.2. Kallutatuse seos vanusega

XCI protsessi peetakse igas rakus juhuslikuks ja klonaalselt säilitatuks, kui kord saavutatud. Uuringud sellel teemal aga viitavad asjaolule, et XCI ei ole mitte alati juhuslik ning kallutatud inaktivatsioon võib rohkem ilmneda vanusega. Kuigi XCI mustrid püsivad aja möödudes suhteliselt stabiilsed, on siiski vanemates naistes märkimisväärne kallutatuse kasvav levimus (Wong *et al.*, 2011). Mitmed teadlased on leidnud seose äärmise XCI kallutatuse ja naiste

vanuse vahel varieerudes 7% alla 25-aastastel naistel kuni 16% üle 60-aastastel naistel (Sharp *et al.*, 2000). Kui XCI peaks eeldatavasti olema kõigi rakkude järglastes püsiv, muutub X-inaktivatsiooni muster vanusega. Vanuse mõju X-inaktivatsiooni muustrile võib olla juhuslik protsess hematopoeetiliste tüvirakkude varu kahanemisega vanematel naistel (Orstavik, 2006).

Kallutatud XCI kasv tundub olevat ilmekam pärast 30. eluaastat kui nooremas eas. See trend toetab vanusega seotud kallutatuse kasvu suurenemise mudelit, mida põhjustab hematopoeetiliste tüvirakkude vananemine. Teine võimalus on, et aja jooksul toimub alleelspetsiifiline metülatsiooni kadumine ning tagajärjeks on suurenenud XCI kallutatuse ilmnemine metülatsioonipõhiseid analüüse kasutades (Hatakeyama *et al.*, 2004).

Vanematel naistel (antud artiklis naised vanuses ≥ 55 aastat) on kallutatud XCI sagedus perifeersete vererakkude müeloidsetes rakuliinides palju kõrgem võrreldes nooremate naistega. Selline vanusest sõltuv XCI kallutus võib olla hematopoeetiliste rakkude klonaalse stohhastilise kao tulemus või on eelis hematopoeetilistel tüvirakkudel, kellel spetsiifiline genotüüp X-liiteliste geenidega. Vanusega seotud kallutus ei ole vaid stohhastiline protsess ja võib olla tingitud keerulistest mehhanismidest, mis sisaldavad endas nii stohhastilisi kui geneetilisi sündmusi (Kristiansen *et al.*, 2005).

Samas ei pruugi ainult ühte tüüpi rakkudel, näiteks vererakkudel, põhinev uuring olla kõige objektiivsem, sest need võivad seoses vananemisega olla erinevalt mõjutatud. Perekondlikud XCI uuringud nendes vanemates naistes, kelle DNA on pärit erinevatest rakkudest, võimaldaksid suurendada teadmiste hulka geneetiliste faktorite mõjudest vanusega seotud kallutatusele (Kristiansen *et al.*, 2005).

2.3. Kallutatuse seos X-liiteliste haigustega

Kallutatud XCI võib olla põhjustatud nii rakkude positiivse kui negatiivse selektsiooni mehhanismist. See omakorda võib reguleerida X-liiteliste retsessiivsete haiguste ilminguid naistel (Van den Veyver, 2001). XCI tulemusena on heterosügootsed naised X-liiteliste geenide ekspressiooni suhtes mosaiigid, sest ühel osal rakkudest toimub geeniekspressioon Xp-lt ja teisel osal Xm-ilt (Plenge *et al.*, 2002; Dixon-McDougall ja Brown, 2016). Selline rakkudest moodustunud mosaiik tähendab, et somaatilised rakud jagunevad neis sisalduvate alleelide suhtes kaheks – aktiivne on kas metsiktüüpi või mutantne alleel (Van den Veyver, 2001).

Ülevaateartiklis (Franco ja Ballabio, 2006) on kirjutatud, et X-liitelist haigust kirjeldatakse kui dominantset juhul, kui ta on avaldunud heterosügootses organismis. Inaktiveerides valdavalt kas terveid või mutantseid allele, võib XCI kallutus mõjutada X-liitelise haiguse raskusastet

(de Hoon *et al.*, 2015). Kui normaalse alleeliga X kromosoom on enamikes rakkudes välja lülitatud (XCI poolt vaigistatud), muutub X-liiteline retsessiivne tunnus dominantseks ning võivad avalduda haigused, mille olemasolust konkreetne inimene või tema perekond teadlikud ei ole (Vacca *et al.*, 2016). Samas mõningate haiguste puhul võib mutatsiooni kandev naine olla fenotüübiliselt täiesti mõjutamata, sest tal on täielikult kallutatud XCI, kus mutantsed alleelid on vaigistatud ega avaldu (de Hoon *et al.*, 2015).

Huvitaval kombel on palju raskeid kliinilisi haigusi, mille puhul pole ühtegi haigust esilekutsuvat X-liitelist lookust tuvastatud, kuid neid on seostatud kallutatud XCI-ga. Selline seos on tuvastatud näiteks autoimmuunsel türeoidiidil. Naistel äärmiselt kallutatud X inaktivatsiooni suhtega (XIR, *X inactivation ratio*) võib välja areneda autoimmuunsus oma antigeenidele, mis on kodeeritud sellise X kromosoomi poolt, mis on enamikes rakkudes inaktiivne (de Hoon *et al.*, 2015). Antud haigust põdevatel naistel on leitud kallutatud XCI kõrgem tase (Brix *et al.*, 2005).

Autoimmuunhaigused on naiste seas rohkem levinud kui meestel. Üheks väljapakutud seletuseks on X-liiteliste geenide mõju (Chitnis *et al.*, 2000). Samas on nii autoimmuunhaiguste kui üleüldiselt X-liiteliste haiguste diagnoosimine suhteliselt raske ja keeruline, sest kliinilised fenotüübid on tihtilugu erinevad olenevalt XCI kallutatuse levikust ja astmest ning puudus on sarnastest patsientidest, kellel sümptomeid võrrelda. Samuti on puudujääk suure tootlikkusega ekspresioonipõhistest meetoditest XCI hindamiseks (Szelinger *et al.*, 2014).

2.4. Kallutatuse seos aberratsioonidega

X kromosoom, mis kannab endas struktuuralseid muutuseid nagu deletsioonid või duplikatsioonid, on tihtipeale inaktiivne (Vacca *et al.*, 2016). X kromosoomi patogeensete geneetiliste variantide kandjatel võib inaktivatsioonimuster olla kallutatud erinevatel tasemetel kõikides 50:50 suhtest 0:100-ni või olla seal vahepeal. Naistel, kellel on tasakaalustatud X:autosoomi translokatsioonid, avaldub tavaliselt eelistatud inaktivatsioon normaalse X-kromosoomi suhtes (Di-Battista *et al.*, 2016). Samas nendel naistel, kellel on X kromosoomiga seotud muutused tasakaalust väljas, kas siis geneetilise materjali juurdelisamise või kadumise näol, on inaktivatsioonimuster kallutatud ebanormaalse Xi-ga rakkude kasuks (Disteche *et al.*, 1984). Seega võib Xp või Xq duplikatsioone seostada normaalse fenotüübiga ja ebanormaalsed fenotüübid on tavaliselt seostatud juhusliku X kromosoomi inaktivatsioonimustriga (Carrozzo *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 1999).

Kallutatud inaktivatsioonimuster on tavaliselt duplikatsioonidega kromosoomi kasuks, mille tulemuseks on dubleeritud segmendi disoomia ja mis võib viia raske fenotüübini. Pakutakse, et Xp11.23-p11.22 geneetilise materjali juurde lisamine võib mängida olulist rolli selliste rakkude positiivse selektsiooni mehhanismis, kus muudetud X kromosoom on arengu käigus aktiivne (Evers *et al.*, 2015). Äärmiselt kallutatud XCI esineb tihti struktuurselt ebanormaalse X kromosoomiga naistel, samal ajal säilitades normaalse X kromosoomi ja autosomaalse doosi (Jobanputra *et al.*, 2012). Seega detailne ümberkorralduste iseloomustus ja X kromosoomi inaktivatsioonimustri kindlakstegemine nii patsientides kui nende emades on olulisteks võtmeprotsessideks, et mõista sellist ebatavalist rakkude valiku molekulaarset mehhanismi, mis eelistab ebanormaalselt X kromosoomi (Di-Battista *et al.*, 2016).

3. Meetodid

X inaktivatsiooni analüüse kasutatakse Xi ja Xa eristamiseks ja määratlemaks, kas geenid on Xa-1 erinevalt avaldunud (Van den Veyver, 2001). Meetodid, mida kasutatakse XCI kvantitatiivseks hindamiseks, on püsinud ühesugused läbi aegade ning need põhinevad:

- a) X-alleelide metülatsiooni erinevustel. XCI tulemuseks on Xi ja Xa erinev markeerimine epigeneetiliste modifikatsioonidega, sealhulgas DNA metülatsioon. X kromosoomi inaktivatsioonile allutatud CpG saarekesi sisaldavad geenide promootorid on umbes 50% ulatuses naistel metüleeritud, samas kui meestel on need metüleerimata (Cotton *et al.*, 2011). Kõige rohkem tunnustust ja kasutust leidvamaks meetodiks DNA metülatsioonil põhinevate lähenemiste seas on inimese androgeeni retseptori (*AR*, *androgen receptor*) geeni analüüs ehk HUMARA (*human androgen receptor gene assay*). Tegemist on CpG-metülatsiooni tundliku restriksioon-endonukleaasil põhineva PCR meetodiga, mille sihtmärgiks on polümorfseid lühikesed korduvjärjestused Xq-liitelisel AR geenil ning mille käigus analüüsitakse polümorfseid (CAG)_n korduseid AR geeni esimeses eksonis (Orstavik, 2006; Vacca *et al.*, 2016).
- b) Ekspresseeritud polümorfismidel. Kuigi DNA-d on organismist lihtsam kätte saada ja see on RNA-st stabiilsem, annavad ka RNA-l põhinevad meetodid kallutatuse kohta sama head infot (Musalkova *et al.*, 2015). Alternatiiviks eelpool mainitud HUMARA meetodile võib XCI staatust määrata ka RNA tasemel kasutades informatiivsete X-liiteliste geenide avaldunud polümorfisme (näiteks XIST), mida on võimalik läbi andmebaasi otsingute tuvastada. Mida suurem on testitud geenide arv, seda parem XCI suhte hinnang saadakse (Vacca *et al.*, 2016).

- c) DNA replikatsiooni aja analüüsidel. Xi kromatiini üheks iseloomujooneks on selle hiline replikatsioon S-faasis, millel vastav meetod põhinebki (Chadwick ja Willard, 2003; Dixon-McDougall ja Brown, 2016). Meetod on kasulik vaid siis, kui saadaval on sekundaarne marker mis eristab kahte X kromosoomi, näiteks X:autosoomi translokatsioon, mille tulemusena mõlemad kromosoomid on selgesti eristatavad metafasis (Van den Veyver, 2001).

Tihti peale neid meetodeid kombineeritakse omavahel, ent metülatsioonil põhinevad uuringud on palju laiaulatuslikumad, kuna DNA on lihtsamini ligipääsetav ja stabiilsem kui RNA (Vacca *et al.*, 2016).

3.1. X inaktivatsiooni taseme määramine kudedes

Kuigi XCI uurimisel on mitmeid erinevaid meetodeid, on kõigil teatavad piirangud – ainult üht või mõnda spetsiifilist kude kasutatakse analüüsi läbiviimiseks (leukotsüüdid, naha fibroblastid, limaskestade rakud või kusepõie epiteelirakud). Samas on teada, et X inaktivatsiooni muustrid erinevad koeti (Van den Veyver, 2001). Kallutatud inaktivatsiooni uuritakse tavaliselt perifeersetes vererakkudes s.o. erütrotsüütides, lümfotsüütides ja trofoblastides. Saadud info võib olla informatiivne, samas see ei ütle, mis toimub teistes koetüüpides, mis võib olla märgatavalt olulisem (Knudsen *et al.*, 2007). Veel on võimalik inaktivatsiooni uurida lisaks vererakkudele ka lihtsasti ligipääsetavatest kudedest nagu põseepiteelist ja juuksefolliikulist. Sellistes kudedes olevat X inaktivatsiooni suhet saab võrrelda eelpoolnimetatud raskesti ligipääsetavate kudede suhetega seoste leidmiseks (de Hoon *et al.*, 2015).

ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev ülevaade imetajate X kromosoomi inaktivatsioonist kui protsessist, selle mehhanismidest ning osalevatest molekulidest, valkudest ja geenidest.

X kromosoomi inaktivatsioon on protsess, mis esineb kõigil imetajatel, ent siiani on seda uuritud peamiselt inimestel ja hiirtel – kõige rohkem hiirtel, sest neid on lihtne uurida ja laboritingimustes kasvatada; inimeste puhul tuleb mängu eetilisus, sest inaktivatsiooni protsessi tuleb uurida embrüotel. Samas on inimese embrüotega seotud uuringud väga rangelt reguleeritud. Imetajaliike on aga tunduvalt rohkem ja terviklikuma pildi saamiseks tuleks uurida ka teisi imetajaid. Kuigi protsess on üleüldises plaanis imetajatel universaalne, on genoomi ülesehitus kohati erinev, mis võib mõjutada X kromosoomi inaktivatsiooni – näiteks hiirtele omale Xce lookus, mida ei inimesel ega veisel pole leitud (Minks *et al.*, 2008). Muid imetajaid peale väiksemate näriliste nagu hiir, rott või hamster, pole võimalik sellisel viisil laboris kasvatada ning teadusliku uurimise eesmärgil elusaid embrüoid ja looteid surmata ei oleks samuti eetiline, mis ongi ilmselt põhjusteks, miks teiste imetajate peal antud protsessi väga uuritud ei ole. Samuti elavad paljud imetajad vabalt looduses, embrüoid on väga raske kätte saada. Mõningaid andmeid leiab ka veiste X kromosoomi inaktivatsioonist ning piimalehmade piimanäärmetes toimuvast geenivaigistamisest (Couldrey *et al.*, 2017). Head lahendust välja pakkuda ei ole. Uurimismeetodite ja tehnoloogiliste võimaluste arengut on küll raske ennustada, aga ilmselt jääb X kromosoomi inaktivatsiooni uurimine pikaks ajaks vaid inimeste ja hiirte pärusmaaks.

Kuigi X kromosoomi inaktivatsiooni on uuritud juba rohkem kui pool sajandit, ei ole kõiki protsessi mehhanisme suudetud kindlaks teha, samuti käib vaidlus Xic regiooni täpse suuruse üle. Tegemist on XCI kõige tähtsama regiooniga, ent sellegipoolest ei suudeta selle pikkust kindlaks teha, mis näitab, kuivõrd keerulise protsessiga tegemist on (Horvath *et al.*, 2011). Tõenäoliselt on osa uuringuid jäänud ebapädevate või puuduvate tehnoloogiliste võimaluste taha, mis ei võimalda väga täpselt tuvastada niivõrd väikeseid molekulidevahelisi interaktsioone ja seoseid. Näiteks on antud juhul tegemist uuringuga, mille puhul on materjali väga vähe, sest embrüos on vähe rakke ning sellised uurimismeetodid on alles arengujärgus. Teiseks, X kromosoomi inaktivatsiooni puhul räägime me küll X kromosoomist, ent peame arvestama kogu genoomi konteksti. Taolised ülegenoomsed uurimismeetodid (teise põlvkonna sekveneerimine või RNA-sekveneerimine) on saanud võimalikuks alles viimase 10 aasta jooksul. Tehnoloogia on aga kiiresti arenev ning tõenäoliselt lähima kümnendi jooksul võiks toimuda areng ka biotehnoloogia vallas võimaldades seni lahendamata küsimustele vastuseid

saada – näiteks on seni lõplikult tuvastamata, milliseid valke on ilmtingimata vaja ja millised valgud seonduvad otse *Xist* RNA-ga, et geenivaigistamine saaks toimuda (McHugh *et al.*, 2015).

X kromosoomi inaktivatsiooni uurimine on vajalik ka meditsiinis. Väga paljud haigused on X-liitelised, mistõttu nende avaldumine sõltub sellest, kas ekspresseeritud on terve või mutantne alleel (de Hoon *et al.*, 2015). Kuna aga rakud ei ole kunagi võrdselt jaotunud selle järgi, millist päritolu X kromosoom on neis inaktiivne ehk emalt ja isalt päritud X kromosoomid ei ole kunagi inaktiveeritud 1:1 suhtes, siis võib X-liitelist haigust põdevatel inimestel fenotüüp väga suuresti erineda. See aga tähendab, et kui inimesel on kerged kõrvalekalded normaalsest fenotüübist, ei pruugi ta iial diagnoosi saada, sest haigust lihtsalt ei märgata. Meeste puhul on asi lihtsam, sest neil on vaid ühte päritolu X kromosoom ning neil ei teki haiguse suhtes sellist mosaiiksust nagu naistel, kellel kahte erinevat päritolu X kromosoomid, mistõttu avalduvad erinevad alleelid erineva sagedusega. See muudabki haigete inimeste (naiste) fenotüübid niivõrd erinevateks, sest igal naisel on nii emalt kui isalt päritud inaktiveeritud X kromosoomi suhe erinev. X kromosoomi inaktivatsiooni uurimine aitaks seeläbi paremini ja kiiremini haigust diagnoosida ja vajadusel leida ravi. Mis võiks olla lahenduseks? Ühest küljest tuleks leida võimalikult palju inimesi, kellel esinevad X-liitelised haigused ning nende genotüüpe uurida, eriti märke X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusest. Teisest küljest aga kui paljudel näiteks ei ole haigust diagnoositud, ei saa ka neid uurida, sest pole, keda uurida. Seega on tegemist suhteliselt keerulise teemaga. Üheks lahenduseks võiks olla juba sündides vastasündinult proovi võtmine ja sealt X-liiteliste haiguste uurimine. Inimesed, kellelt leitakse X-liiteline haigus, näiteks mõni autoimmuunhaigus, võiksid seejärel jääda jälgimise alla, et vaadata nende haiguse kulgu ja fenotüübi muutust. Majanduslikus plaanis see end ilmselt ära ei tasuks, ent meditsiinilises mõttes oleks suur edasiminekuks ja saaks erinevate X-liiteliste haiguste ja nende diagnoosimiste kohta palju uut infot.

Geenidoosi kompensatsioon ei toimu vaid imetajatel, seda esineb ka teistel loomadil ja lindudel, sest sugukromosoomid on neilgi sugude vahel erinevad. Näiteks on kanadel ZW ja kukkedel ZZ, mistõttu on kuked need, kes peavad oma geenidoosi kompenseerima kanadele vastavaks. On ka selliseid organisme, kelle puhul ei ole kindlat sugu määravat kromosoomi – näiteks varbuss (*Caenorhabditis elegans*) – kus XX kromosoomistikuga on hermafrodiit ning ühe X kromosoomiga on isane. Sel juhul toimub doosikompensatsioon nii, et XX kromosoomistikuga hermafrodiidil vähendatakse transkriptsiooni mõlemalt X kromosoomilt (Chuang *et al.*, 1996; Meyer, 2000). Seega on taoline protsess looduses levinud kõigil isenditel,

igalühel küll eri moodi, ent eesmärk on sama – hoida geenide ekspressiooni sugude vahel võrdsena, et tagada seeläbi normaalsete ja tervete isendite areng.

KOKKUVÕTE

Emastel imetajatel on kaks X kromosoomi, isastel ainult üks. Seetõttu peab emasorganism vaigistama ühel X kromosoomil paiknevad geenid tagamaks X-liiteliste geenide võrdse avaldumise sugude vahel. Sellist protsessi nimetatakse X kromosoomi inaktivatsiooniks, mille tulemusena valitakse rakkudes juhuslikult üks X kromosoom ning inaktiveeritakse see. Valiku juhuslikkuse tõttu sisaldavad osad rakud emalt pärinevat ja teised rakud isalt pärinevat inaktiivset X kromosoomi.

Pärisimetajatel on X kromosoomi inaktivatsioon sõltuv X inaktivatsiooni keskuses paiknevast pikast mittekodeerivast RNAst nimega *Xist*. Vastavat RNA-d hakatakse tugevamalt ekspresseerima sellelt X kromosoomilt, mida rakul on „plaanis“ inaktiveerida. Selle tulemusena katab *Xist* kogu kromosoomi ning geenid on vaigistatud. Paraku ei allu kõik geenid inaktivatsioonile ning olenevalt liigist pääseb vaigistamisest erinev hulk genee – inimesel umbes 15%, hiirel aga vaid 3-7% kõigist geenidest. Protsess jaguneb *cis*-ja *trans*-regulatsiooniks, kus erinevate repressorite ja aktivaatorite abil mõjutatakse nii *Xist*-i kui selle antisense RNA-d *Tsix*. Regulatsiooni täpsemad mehhanismid on endiselt väljaselgitamisel.

Mõningatel juhtudel võivad rakud hakata üht päritolu X kromosoomi inaktiveerimist teisele eelistama. Sel juhul on tegemist kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniga ehk rakkude 1:1 suhe on kallutatud. Kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon võib olla põhjustatud naise vanusest, pärilikkusest, muudest geneetilistest faktoritest või nende koosmõjudest. Selle tulemusena võivad indiviididel esineda fenotüübilised kõrvalekalded normaalsest ning ka mitmed haigused, näiteks autoimmuunhaigused on sagedasemad just naiste seas. Samas võib kallutatud inaktivatsioon olla ka kasulik, näiteks vaigistamise alla satuvad just mutatsioone sisaldavad geenid ning avalduvad vaid terved geenid ehk sümptomid ei avaldu.

Kuigi X kromosoomi inaktivatsiooni on uuritud juba aastakümneid, on endiselt teadmata, kuidas täpselt rakud inaktiveeritava X kromosoomi valivad, mis ajendab neid seda tegema; milliste mehhanismide abil toimub täpselt geenide vaigistamine, kuidas ja miks mõned neist sellest pääsevad. Uuringuid takistab ja aeglustab inaktivatsiooni toimumine nii varases embrüonaalses arengus, ent loodetavasti suudetakse uut informatsiooni lähiajal leida, mis võimaldaks paremini mõista niivõrd keerulist protsessi.

RESÜMEE

X chromosome inactivation in mammals

Mariann Männistu

Summary

Female mammals have two X chromosomes while males have only one. Therefore females have to silence genes on one of their X chromosomes in order to ensure equivalent expression of X-linked genes between sexes. This process is called X chromosome inactivation that results in random choice of one X chromosome and its inactivation. Due to its randomness some somatic cells have maternal inactive X while others have paternal inactive X chromosome.

In Eutherians, X chromosome inactivation is dependent on long non-coding RNA *Xist* that is located in X inactivation centre. Given RNA is about to be expressed from a “future” inactive X. As a result *Xist* coats an entire X chromosome and genes on it are silenced. However, not all genes are influenced and depending on species different amount of genes escape from inactivation – in humans about 15% and in mice 3-7% of all genes. X chromosome inactivation has two different regulation networks – *cis*- and *trans*-regulation, where different repressors and activators are used to influence both *Xist* and its antisense *Tsix*. Detailed mechanisms of its regulations still remain to be unclear.

In some cases somatic cells might favour the inactivation of either paternally or maternally inherited X chromosome. That is called skewed X chromosome which means that the ratio 1:1 is biased. Skewed X chromosome inactivation may be caused by age, heredity, other genetic factors or their interactions. This can result in phenotype differences between individuals and also many diseases, for example autoimmune diseases are more common in females. However, biased inactivation can also be beneficial when genes carrying mutations are under the influence of silencing, thus normal genes are expressed and symptoms do not appear.

Although X chromosome inactivation has been studied for decades there are still things that remain unclear: how exactly cells choose the “future” inactive X, what prompts them to do that; which mechanisms are involved in gene silencing, how and why some genes escape inactivation. Some studies are prohibited or slowed down because inactivation process takes place at an early embryonic stage but hopefully new information can be found in the near future and such a complicated process will be understood better.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Agulnik A. I., Mitchell M. J., Mattei M. G., Borsani G., Avner P. A., Lerner J. L. and Bishop C. E. (1994). A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum Mol Genet* 3(6): 879-884.
- Arieti F., Gabus C., Tambalo M., Huet T., Round A. and Thore S. (2014). The crystal structure of the Split End protein SHARP adds a new layer of complexity to proteins containing RNA recognition motifs. *Nucleic Acids Res* 42(10): 6742-6752.
- Ariyoshi M. and Schwabe J. W. (2003). A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev* 17(15): 1909-1920.
- Avner P. and Heard E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2(1): 59-67.
- Bala Tannan N., Brahmachary M., Garg P., Borel C., Alnefaie R., Watson C. T.,...Sharp A. J. (2014). DNA methylation profiling in X;autosome translocations supports a role for L1 repeats in the spread of X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 23(5): 1224-1236.
- Berletch J. B., Ma W., Yang F., Shendure J., Noble W. S., Disteche C. M. and Deng X. (2015). Escape from X inactivation varies in mouse tissues. *PLoS Genet* 11(3): e1005079.
- Berletch J. B., Ma W., Yang F., Shendure J., Noble W. S., Disteche C. M. and Deng X. (2015). Identification of genes escaping X inactivation by allelic expression analysis in a novel hybrid mouse model. *Data Brief* 5: 761-769.
- Berletch J. B., Yang F. and Disteche C. M. (2010). Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biol* 11(6): 213.
- Bolduc V., Chagnon P., Provost S., Dube M. P., Belisle C., Gingras M.,...Busque L. (2008). No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest* 118(1): 333-341.
- Brix T. H., Knudsen G. P., Kristiansen M., Kyvik K. O., Orstavik K. H. and Hegedus L. (2005). High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11): 5949-5953.
- Brooks W. H. (2010). X chromosome inactivation and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 39(1): 20-29.
- Brown C. J., Hendrich B. D., Rupert J. L., Lafreniere R. G., Xing Y., Lawrence J. and Willard H. F. (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that

- contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 71(3): 527-542.
- Burgoyne P. S. and Baker T. G. (1985). Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. *J Reprod Fertil* 75(2): 633-645.
- Calaway J. D., Lenarcic A. B., Didion J. P., Wang J. R., Searle J. B., McMillan L.,...Pardo-Manuel de Villena F. (2013). Genetic architecture of skewed X inactivation in the laboratory mouse. *PLoS Genet* 9(10): e1003853.
- Carrel L., Cottle A. A., Goglin K. C. and Willard H. F. (1999). A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14440-14444.
- Carrel L. and Willard H. F. (1998). Counting on Xist. *Nat Genet* 19(3): 211-212.
- Carrel L. and Willard H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434(7031): 400-404.
- Carrozzo R., Arrigo G., Rossi E., Bardoni B., Cammarata M., Gandullia P.,...Zuffardi O. (1997). Multiple congenital anomalies, brain hypomyelination, and ocular albinism in a female with dup(X) (pter-->q24::q21.32-->qter) and random X inactivation. *Am J Med Genet* 72(3): 329-334.
- Chadwick B. P. and Willard H. F. (2003). Barring gene expression after XIST: maintaining facultative heterochromatin on the inactive X. *Semin Cell Dev Biol* 14(6): 359-367.
- Chan K. M., Zhang H., Malureanu L., van Deursen J. and Zhang Z. (2011). Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40): 16699-16704.
- Chitnis S., Monteiro J., Glass D., Apatoff B., Salmon J., Concannon P. and Gregersen P. K. (2000). The role of X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Arthritis Res* 2(5): 399-406.
- Chow J. C., Ciaudo C., Fazzari M. J., Mise N., Servant N., Glass J. L.,...Heard E. (2010). LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell* 141(6): 956-969.
- Chu C., Zhang Q. C., da Rocha S. T., Flynn R. A., Bharadwaj M., Calabrese J. M.,...Chang H. Y. (2015). Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell* 161(2): 404-416.
- Chuang P. T., Lieb J. D. and Meyer B. J. (1996). Sex-specific assembly of a dosage compensation complex on the nematode X chromosome. *Science* 274(5293): 1736-1739.
- Chureau C., Chantalat S., Romito A., Galvani A., Duret L., Avner P. and Rougeulle C. (2011). Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Hum Mol Genet* 20(4): 705-718.

- Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L.,...Duret L. (2002). Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome Res* 12(6): 894-908.
- Clemson C. M., McNeil J. A., Willard H. F. and Lawrence J. B. (1996). XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 132(3): 259-275.
- Cohen D. E., Davidow L. S., Erwin J. A., Xu N., Warshawsky D. and Lee J. T. (2007). The DXPas34 repeat regulates random and imprinted X inactivation. *Dev Cell* 12(1): 57-71.
- Cotton A. M., Lam L., Affleck J. G., Wilson I. M., Penaherrera M. S., McFadden D. E.,...Brown C. J. (2011). Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum Genet* 130(2): 187-201.
- Cotton A. M., Price E. M., Jones M. J., Balaton B. P., Kobor M. S. and Brown C. J. (2015). Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 24(6): 1528-1539.
- Couldrey C., Johnson T., Lopdell T., Zhang I. L., Littlejohn M. D., Keehan M.,...Spelman R. J. (2017). Bovine mammary gland X chromosome inactivation. *J Dairy Sci* 100(7): 5491-5500.
- Csankovszki G., Nagy A. and Jaenisch R. (2001). Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153(4): 773-784.
- da Rocha S. T. and Heard E. (2017). Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. *Nat Struct Mol Biol* 24(3): 197-204.
- de Hoon B., Monkhorst K., Riegman P., Laven J. S. and Gribnau J. (2015). Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *J Med Genet* 52(11): 784-790.
- Di-Battista A., Meloni V. A., da Silva M. D., Moyses-Oliveira M. and Melaragno M. I. (2016). Unusual X-chromosome inactivation pattern in patients with Xp11.23-p11.22 duplication: Report and review. *Am J Med Genet A* 170(12): 3271-3275.
- Disteche C. M., Swisshelm K., Forbes S. and Pagon R. A. (1984). X-inactivation patterns in lymphocytes and skin fibroblasts of three cases of X-autosome translocations with abnormal phenotypes. *Hum Genet* 66(1): 71-76.
- Dixon-McDougall T. and Brown C. (2016). The making of a Barr body: the mosaic of factors that eXIST on the mammalian inactive X chromosome. *Biochem Cell Biol* 94(1): 56-70.

- Dixon J. R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y.,...Ren B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485(7398): 376-380.
- Donohoe M. E., Silva S. S., Pinter S. F., Xu N. and Lee J. T. (2009). The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature* 460(7251): 128-132.
- Evers C., Mitter D., Strobl-Wildemann G., Haug U., Hackmann K., Maas B.,...Moog U. (2015). Duplication Xp11.22-p14 in females: does X-inactivation help in assessing their significance? *Am J Med Genet A* 167A(3): 553-562.
- Filippova G. N., Cheng M. K., Moore J. M., Truong J. P., Hu Y. J., Nguyen D. K.,...Disteche C. M. (2005). Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 8(1): 31-42.
- Franco B. and Ballabio A. (2006). X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16(3): 254-259.
- Galupa R. and Heard E. (2015). X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Curr Opin Genet Dev* 31: 57-66.
- Gartler S. M. and Riggs A. D. (1983). Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* 17: 155-190.
- Gayen S., Maclary E., Buttigieg E., Hinten M. and Kalantry S. (2015). A Primary Role for the Tsix lncRNA in Maintaining Random X-Chromosome Inactivation. *Cell Rep* 11(8): 1251-1265.
- Gayen S., Maclary E., Hinten M. and Kalantry S. (2016). Sex-specific silencing of X-linked genes by Xist RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(3): E309-318.
- Gontan C., Achame E. M., Demmers J., Barakat T. S., Rentmeester E., van I. W.,...Gribnau J. (2012). RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature* 485(7398): 386-390.
- Goodrich L., Panning B. and Leung K. N. (2016). Activators and repressors: A balancing act for X-inactivation. *Semin Cell Dev Biol* 56: 3-8.
- Hatakeyama C., Anderson C. L., Beaver C. L., Penaherrera M. S., Brown C. J. and Robinson W. P. (2004). The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet* 66(4): 327-332.
- Heard E., Avner P. and Rothstein R. (1994). Creation of a deletion series of mouse YACs covering a 500 kb region around Xist. *Nucleic Acids Res* 22(10): 1830-1837.
- Horvath J. E., Sheedy C. B., Merrett S. L., Diallo A. B., Swofford D. L., Program N. C. S.,...Willard H. F. (2011). Comparative analysis of the primate X-inactivation center

- region and reconstruction of the ancestral primate XIST locus. *Genome Res* 21(6): 850-862.
- Horvath L. M., Li N. and Carrel L. (2013). Deletion of an X-inactivation boundary disrupts adjacent gene silencing. *PLoS Genet* 9(11): e1003952.
- Jobanputra V., Levy B., Kinney A., Brown S., Shirazi M., Yu C.,...Warburton D. (2012). Copy number changes on the X chromosome in women with and without highly skewed X-chromosome inactivation. *Cytogenet Genome Res* 136(4): 264-269.
- Keverne E. B., Fundele R., Narasimha M., Barton S. C. and Surani M. A. (1996). Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 92(1): 91-100.
- Knudsen G. P., Pedersen J., Klingenberg O., Lygren I. and Orstavik K. H. (2007). Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet Genome Res* 116(1-2): 24-28.
- Kristiansen M., Knudsen G. P., Bathum L., Naumova A. K., Sorensen T. I., Brix T. H.,...Orstavik K. H. (2005). Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. *Eur J Hum Genet* 13(5): 599-606.
- Kuroda K., Han H., Tani S., Tanigaki K., Tun T., Furukawa T.,...Honjo T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18(2): 301-312.
- Lahn B. T. and Page D. C. (1999). Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286(5441): 964-967.
- Le Dily F., Bau D., Pohl A., Vicent G. P., Serra F., Soronellas D.,...Beato M. (2014). Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation. *Genes Dev* 28(19): 2151-2162.
- Lee J. T., Strauss W. M., Dausman J. A. and Jaenisch R. (1996). A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* 86(1): 83-94.
- Lingenfelter P. A., Adler D. A., Poslinski D., Thomas S., Elliott R. W., Chapman V. M. and Disteche C. M. (1998). Escape from X inactivation of Smcx is preceded by silencing during mouse development. *Nat Genet* 18(3): 212-213.
- Lyon M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190: 372-373.
- Ma Z., Swigut T., Valouev A., Rada-Iglesias A. and Wysocka J. (2011). Sequence-specific regulator Prdm14 safeguards mouse ESCs from entering extraembryonic endoderm fates. *Nat Struct Mol Biol* 18(2): 120-127.

- Marks H., Kerstens H. H., Barakat T. S., Splinter E., Dirks R. A., van Mierlo G.,...Stunnenberg H. G. (2015). Dynamics of gene silencing during X inactivation using allele-specific RNA-seq. *Genome Biol* 16: 149.
- Matsuo M., Muroya K., Kosaki K., Ishii T., Fukushima Y., Anzo M. and Ogata T. (1999). Random X-inactivation in a girl with duplication Xp11.21-p21.3: report of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet* 86(1): 44-50.
- McHugh C. A., Chen C. K., Chow A., Surka C. F., Tran C., McDonel P.,...Guttman M. (2015). The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* 521(7551): 232-236.
- Meyer B. J. (2000). Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends Genet* 16(6): 247-253.
- Migeon B. R. (2007). Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. *Gend Med* 4(2): 97-105.
- Migeon B. R. (2014). *Females are mosaics : X inactivation and sex differences in disease.* Oxford, Oxford University Press.
- Migeon B. R. (2016). An overview of X inactivation based on species differences. *Semin Cell Dev Biol* 56: 111-116.
- Minks J., Robinson W. P. and Brown C. J. (2008). A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 118(1): 20-23.
- Mlynarczyk-Evans S., Royce-Tolland M., Alexander M. K., Andersen A. A., Kalantry S., Gribnau J. and Panning B. (2006). X chromosomes alternate between two states prior to random X-inactivation. *PLoS Biol* 4(6): e159.
- Moindrot B., Cerase A., Coker H., Masui O., Grijzenhout A., Pintacuda G.,...Brockdorff N. (2015). A Pooled shRNA Screen Identifies Rbm15, Spen, and Wtap as Factors Required for Xist RNA-Mediated Silencing. *Cell Rep* 12(4): 562-572.
- Monfort A., Di Minin G., Postlmayr A., Freimann R., Arieti F., Thore S. and Wutz A. (2015). Identification of Spen as a Crucial Factor for Xist Function through Forward Genetic Screening in Haploid Embryonic Stem Cells. *Cell Rep* 12(4): 554-561.
- Monkhorst K., Jonkers I., Rentmeester E., Grosveld F. and Gribnau J. (2008). X inactivation counting and choice is a stochastic process: evidence for involvement of an X-linked activator. *Cell* 132(3): 410-421.
- Moore T. and Haig D. (1991). Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 7(2): 45-49.

- Musalkova D., Minks J., Storkanova G., Dvorakova L. and Hrebicek M. (2015). Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol Dis* 54(2): 210-216.
- Navarro P., Chambers I., Karwacki-Neisius V., Chureau C., Morey C., Rougeulle C. and Avner P. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 321(5896): 1693-1695.
- Navarro P., Moffat M., Mullin N. P. and Chambers I. (2011). The X-inactivation trans-activator Rnf12 is negatively regulated by pluripotency factors in embryonic stem cells. *Hum Genet* 130(2): 255-264.
- Nesterova T. B., Slobodyanyuk S. Y., Elisaphenko E. A., Shevchenko A. I., Johnston C., Pavlova M. E.,...Zakian S. M. (2001). Characterization of the genomic Xist locus in rodents reveals conservation of overall gene structure and tandem repeats but rapid evolution of unique sequence. *Genome Res* 11(5): 833-849.
- Nguyen D. K. and Disteche C. M. (2006). Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nat Genet* 38(1): 47-53.
- Nora E. P., Lajoie B. R., Schulz E. G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N.,...Heard E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* 485(7398): 381-385.
- Ogawa Y. and Lee J. T. (2003). Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol Cell* 11(3): 731-743.
- Okamoto I., Patrat C., Thepot D., Peynot N., Fauque P., Daniel N.,...Heard E. (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472(7343): 370-374.
- Orstavik K. H. (2006). Skewed X inactivation in healthy individuals and in different diseases. *Acta Paediatr Suppl* 95(451): 24-29.
- Park C., Carrel L. and Makova K. D. (2010). Strong purifying selection at genes escaping X chromosome inactivation. *Mol Biol Evol* 27(11): 2446-2450.
- Payer B., Rosenberg M., Yamaji M., Yabuta Y., Koyanagi-Aoi M., Hayashi K.,...Lee J. T. (2013). Tsix RNA and the germline factor, PRDM14, link X reactivation and stem cell reprogramming. *Mol Cell* 52(6): 805-818.
- Peeters S. B., Yang C. and Brown C. J. (2016). Have humans lost control: The elusive X-controlling element. *Semin Cell Dev Biol* 56: 71-77.
- Pinter S. F., Sadreyev R. I., Yildirim E., Jeon Y., Ohsumi T. K., Borowsky M. and Lee J. T. (2012). Spreading of X chromosome inactivation via a hierarchy of defined Polycomb stations. *Genome Res* 22(10): 1864-1876.

- Plenge R. M., Stevenson R. A., Lubs H. A., Schwartz C. E. and Willard H. F. (2002). Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* 71(1): 168-173.
- Rastan S. and Robertson E. J. (1985). X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol* 90: 379-388.
- Rougeulle C. and Avner P. (2003). Controlling X-inactivation in mammals: what does the centre hold? *Semin Cell Dev Biol* 14(6): 331-340.
- Sado T., Hoki Y. and Sasaki H. (2006). Tsix defective in splicing is competent to establish Xist silencing. *Development* 133(24): 4925-4931.
- Sarkar M. K., Gayen S., Kumar S., Maclary E., Buttigieg E., Hinten M.,...Kalantry S. (2015). An Xist-activating antisense RNA required for X-chromosome inactivation. *Nat Commun* 6: 8564.
- Sharp A., Robinson D. and Jacobs P. (2000). Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 107(4): 343-349.
- Sharp A. J., Spotswood H. T., Robinson D. O., Turner B. M. and Jacobs P. A. (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet* 11(25): 3145-3156.
- Sheardown S. A., Duthie S. M., Johnston C. M., Newall A. E., Formstone E. J., Arkell R. M.,...Brockdorff N. (1997). Stabilization of Xist RNA mediates initiation of X chromosome inactivation. *Cell* 91(1): 99-107.
- Shi Y., Downes M., Xie W., Kao H. Y., Ordentlich P., Tsai C. C.,...Evans R. M. (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* 15(9): 1140-1151.
- Shibata S. and Lee J. T. (2004). Tsix transcription- versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice. *Curr Biol* 14(19): 1747-1754.
- Simon M. D., Pinter S. F., Fang R., Sarma K., Rutenberg-Schoenberg M., Bowman S. K.,...Lee J. T. (2013). High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 504(7480): 465-469.
- Szelinger S., Malenica I., Corneveaux J. J., Siniard A. L., Kurdoglu A. A., Ramsey K. M.,...Craig D. W. (2014). Characterization of X chromosome inactivation using integrated analysis of whole-exome and mRNA sequencing. *PLoS One* 9(12): e113036.
- Sunwoo H., Wu J. Y. and Lee J. T. (2015). The Xist RNA-PRC2 complex at 20-nm resolution reveals a low Xist stoichiometry and suggests a hit-and-run mechanism in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(31): E4216-4225.

- Zhang L. F., Huynh K. D. and Lee J. T. (2007). Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell* 129(4): 693-706.
- Zhang Y., Castillo-Morales A., Jiang M., Zhu Y., Hu L., Urrutia A. O.,...Hurst L. D. (2013). Genes that escape X-inactivation in humans have high intraspecific variability in expression, are associated with mental impairment but are not slow evolving. *Mol Biol Evol* 30(12): 2588-2601.
- Tian D., Sun S. and Lee J. T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 143(3): 390-403.
- Vacca M., Della Ragione F., Scalabri F. and D'Esposito M. (2016). X inactivation and reactivation in X-linked diseases. *Semin Cell Dev Biol* 56: 78-87.
- Valencia K. and Wutz A. (2015). Recent insights into the regulation of X-chromosome inactivation. *Adv Genomics Genet* 2015(5): 227-238.
- van Bemmelen J. G., Mira-Bontenbal H. and Gribnau J. (2016). Cis- and trans-regulation in X inactivation. *Chromosoma* 125(1): 41-50.
- van den Berg I. M., Laven J. S., Stevens M., Jonkers I., Galjaard R. J., Gribnau J. and van Doorninck J. H. (2009). X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 84(6): 771-779.
- Van den Veyver I. B. (2001). Skewed X inactivation in X-linked disorders. *Semin Reprod Med* 19(2): 183-191.
- Venolia L., Gartler S. M., Wassman E. R., Yen P., Mohandas T. and Shapiro L. J. (1982). Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(7): 2352-2354.
- Wong C. C., Caspi A., Williams B., Houts R., Craig I. W. and Mill J. (2011). A longitudinal twin study of skewed X chromosome-inactivation. *PLoS One* 6(3): e17873.
- Wu C. and Sun Z. (2016). X chromosome abnormal inactivation: a unique factor for women's diseases? *Epigenomics* 8(4): 447-450.
- Yang F., Babak T., Shendure J. and Disteche C. M. (2010). Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res* 20(5): 614-622.
- Yang F., Deng X., Ma W., Berletch J. B., Rabaia N., Wei G.,...Disteche C. M. (2015). The lncRNA Firre anchors the inactive X chromosome to the nucleolus by binding CTCF and maintains H3K27me3 methylation. *Genome Biol* 16: 52.
- Yang L., Kirby J. E., Sunwoo H. and Lee J. T. (2016). Female mice lacking Xist RNA show partial dosage compensation and survive to term. *Genes Dev* 30(15): 1747-1760.

You S. H., Lim H. W., Sun Z., Broache M., Won K. J. and Lazar M. A. (2013). Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 20(2): 182-187.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mariann Männistu
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 22.01.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

„X kromosoomi inaktivatsioon imetajatel“

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Julia Bokajeva, Ants Kurg,

(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus/Tallinnas/Narvas/Pärnus/Viljandis, 21.08.2017 (*kuupäev*)