



LINE1 تقسیم‌بندی هسته‌ای را برای سرکوب حالت ۸ سلولی در سلول‌های بنیادی جنینی ترویج می‌کند

سمیرا جلالی پور^{۱*}

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، ایران. dr.samira.jalalipour761@gmail.com

خلاصه

خانواده عناصر قابل جابجایی LINE1 در ژنوم پستانداران تحت گسترش وسیعی قرار گرفته است. در حالی که این عناصر به‌طور سنتی به‌عنوان عناصری خودخواه و جهش‌زا در نظر گرفته می‌شدند، مطالعات اخیر به نقش‌های LINE1 در رشد اولیه موش، سکون سلول‌های T و نوروزن اشاره دارند. در این مطالعه نشان داده شده که RNA انسانی LINE1 برای خودنوسازی و هویت سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) ضروری است. خاموش کردن LINE1 با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس یا تداخل CRISPR در سلول‌های بنیادی ساده (naïve hESCs) منجر به القای قوی سلول‌های شبه ۸ (8CLCs) می‌شود. مشخص شد که ژن‌هایی که با خاموش شدن LINE1 فعال می‌شوند، به‌طور یکنواخت در ژنوم توزیع نشده‌اند و غنی‌سازی در کروموزوم ۱۹، که شامل نشانگرهای کلیدی حالت ۸ مانند TPRX1 است، مشاهده شده است. خاموش شدن TPRX1، اما نه سایر تنظیم‌کننده‌های احتمالی ۸ مانند p53 یا H3.XY، القای برنامه ۸ C را در سلول‌های بنیادی انسانی LINE1 KD سرکوب می‌کند.

LINE1 RNA به‌طور ترجیحی در لامینا و حاشیه هسته سلول‌های بنیادی انسانی قرار دارد. توالی یابی دامنه‌های مرتبط با لامینا (LADs) و دامنه‌های مرتبط با هسته (NADs) نشان‌دهنده ارتباط ترجیحی کروموزوم ۱۹ با NADs در سلول‌های بنیادی جنینی انسان است. سلول‌های شبه ۸ دارای مورفولوژی هسته‌ای متمایز و ارتباط کمتر کروموزوم ۱۹ و جایگاه TPRX1 با هسته نسبت به سلول‌های بنیادی ساده و اولیه هستند، که نشان‌دهنده نقش دینامیک هسته‌ای در انتقال از حالت ۸ CLC به hESC است. مطابق با این نتایج، خاموش شدن LINE1 باعث اختلال در ساختار هسته و نشانه‌های تنش هسته‌ای می‌شود. اختلالات مستقل در هسته، برنامه ۸ C را در سلول‌های بنیادی انسانی القا می‌کنند. ژن‌های القاشده توسط خاموشی LINE1 برای اهداف مجتمع سرکوب‌کننده پلی‌کامپ (PRC2) غنی شده‌اند و مهار PRC2 به القای قوی ژن‌های ۸ C منجر می‌شود. نتایج ما نشان می‌دهد که LINE1 هماهنگی تقسیم‌بندی هسته‌ای و سرکوب ژن با واسطه کروماتین را برای جلوگیری از بازگشت رشدی سلول‌های بنیادی جنینی انسان انجام می‌دهد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی انسانی، LINE1، کروموزوم، RNA، ژنوم

۱. مقدمه

درک رشد اولیه انسان از اهمیت اساسی برخوردار است و می‌تواند کاربردهای جدیدی در حوزه سلامت باروری و پزشکی بازساختی (ترمیمی) ارائه دهد. تحقیقات در این زمینه به دلیل سؤالات اخلاقی و کمبود جنین‌های اولیه انسانی برای پژوهش محدود شده است. سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) بستری قدرتمند برای مدل‌سازی رشد انسانی فراهم می‌کنند. بسته به شرایط کشت، hESC‌ها می‌توانند وضعیت ساده (naïve) مرحله بلاستوسیست قبل از لانه‌گزینی یا وضعیت اولیه (primed) جنین پس از لانه‌گزینی را شبیه‌سازی کنند. این دو وضعیت قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند و می‌توان از آن‌ها برای تمایز سلول‌ها به سمت دودمان‌های خاص پس از گاسترولاسیون استفاده کرد.

بازگشت سلول‌های بنیادی ساده (naïve hESCs) به مراحل اولیه رشد دشوارتر بوده است. از جمله مراحل مهم، حالت ۸ سلولی (8C) است که در آن فعال‌سازی ژنوم زیگوتی رخ می‌دهد.^(۱) اخیراً چندین گروه گزارش داده‌اند که سلول‌های شبه ۸C (8CLCs)، که برنامه رونویسی متمایزی مشابه جنین ۸ سلولی را بیان می‌کنند، در کشت‌های سلول‌های بنیادی ساده (naïve hESCs) با فرکانس پایین وجود دارند.^(۲-۵) این شرایط اصلاح‌شده کشت hESC فرصتی بی‌سابقه برای مدل‌سازی و مطالعه رشد انسان پیش از لانه‌گزینی فراهم می‌کند.

در تأیید این مفهوم، مشخص شده است که فاکتور رونویسی TPRX1 برای رشد جنین‌های ۸ سلولی انسان در شرایط آزمایشگاهی^(۶) (ex vivo) و همچنین برای تولید سلول‌های شبه ۸C از hESC‌ها ضروری است.^(۳) با این حال، هنوز مشخص نیست که چه عوامل مولکولی از بازگشت hESC‌ها به حالت ۸CLC جلوگیری می‌کنند.

۲.۱. مطالعات و نتایج

مطالعات انجام‌شده روی موش‌ها نشان داده‌اند چندین عامل سرکوبگر حالت دوسلولی (2C)، که معادل حالت ۸ سلولی (8C) در انسان است، وجود دارند. ما و دیگر پژوهشگران نشان داده‌ایم که بیان بزرگ‌ترین خانواده عناصر قابل جابجایی (TES) در پستانداران، یعنی عنصر هسته‌ای پراکنده طولانی ۱ (LINE1)، برای خودنوسازی سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESC) و رشد پیش از لانه‌گزینی ضروری است. مشخص شده که LINE1 در موش به‌عنوان یک RNA غیرکدکننده هسته‌ای عمل می‌کند که با نوکلئولین (NCL) در کروماتین تعامل کرده و برنامه ۲ سلولی در موش را سرکوب می‌کند. در این مطالعه، به بررسی عملکرد RNA LINE1 در سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) پرداختیم. یافته‌های ما از مدلی حمایت می‌کنند که در آن RNA LINE1 برای خودنوسازی و هویت سلول‌های بنیادی جنینی انسان ضروری است، به‌طوری‌که از بازگشت به حالت ۸CLC به روشی وابسته به TPRX1 جلوگیری می‌کند. به‌طور هم‌زمان، داده‌های ما ویژگی‌های تنظیمی جدیدی از حالت ۸CLC انسانی را آشکار می‌کند، از جمله نقش معماری هسته و موقعیت‌یابی منحصر به فرد کروموزوم ۱۹ و عملکرد سرکوب‌کننده PRC2.

۳.۱. نتایج

ما بررسی خود را با تحلیل بیان زیر خانواده‌های LINE1 در طول مراحل پیش از لانه‌گزینی در رشد انسان آغاز کردیم. بیان زیر خانواده‌های LINE1 که در پستانداران تکامل یافته‌اند، در تخمک‌ها شناسایی شد و پس از لقاح به تدریج افزایش یافت، با یک اوج در توده سلولی داخلی (ICM) بلاستوسیست (تصاویر A1، S1A-S1B و S1D). در مقابل، زیر خانواده‌های قدیمی‌تر LINE1 در پستانداران الگوی بیان مشخصی را در طول رشد اولیه انسانی نشان نمی‌دهند (تصاویر S1C و S1E). سپس، بیان LINE1 در کشت‌های سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hESCs) که مراحل رشد قبل و بعد از لانه‌گزینی را بازسازی می‌کنند، بررسی شد (تصاویر S1F-S1H). یافته‌ها نشان داد که RNA LINE1 در تمام شرایط کشت آزمایش شده بیان می‌شود و عمدتاً در هسته قرار دارد، اگرچه برخی کانون‌های سیتوپلاسمی نیز مشاهده شد (تصویر S1H).

۲. بررسی عملکرد LINE1 در سلول‌های بنیادی جنینی انسان: (hESCs)

برای بررسی عملکرد LINE1 در hESC ها، یک الیگونوکلوئوتید آنتی‌سنس (ASO) طراحی شد که توالی حفظ‌شده‌ای در منطقه interORF زیر خانواده‌های LINE1 خاص به نخستی‌ها و انسان را هدف قرار می‌دهد. (ASO-L1) یافته‌ها نشان دادند که ASO-L1 به‌طور مؤثری RNA LINE1 را سرکوب می‌کند (L1KD) در مقایسه با ASO غیر هدفمند کنترلی (ASO-Ctr) یا نسخه سنس (SO-L1) ASO-L1 در شرایط مختلف کشت. hESC صرف‌نظر از شرایط کشت، سرکوب LINE1 باعث از دست دادن توانایی خودنوسازی hESC ها شد، نتایجی که با مشاهدات در سلول‌های بنیادی موش (mESC) سازگار است.

۳. تأثیر LINE1 KD بر رونویسی ژن‌ها در hESC ها

با استفاده از توالی یابی (RNA-seq) RNA، تأثیر LINE1 KD بر ترنسکرپتوم hESC ها بررسی شد. سه شرایط مختلف کشت برای hESC ها آزمایش شد:

۱. محیط mTeSR برای حفظ حالت اولیه (primed)، ۲. محیط RSeT برای حفظ حالت شبه ساده (naïve-like)، ۳. محیط RSeT+DT که با افزودن بازدارنده‌های هیستون داستیلاز (TSA) و هیدرولاز S-adenosyl-L-homocysteine (DZNep) تکمیل شده است و به ترویج حالت ساده‌تر و تسهیل ظهور سلول‌های شبه ۸ (C8CLCs) کمک می‌کند.

این شرایط تغییرات قابل تکرار در بیان ژن‌ها را پس از LINE1 KD نشان دادند، که با تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) و خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی تأیید شد.

۴. تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن: (GSEA)

این تحلیل نشان داد که LINE1 KD باعث القای نشانه‌های رونویسی مربوط به مراحل C8 و مورولا می‌شود که به‌طور معمول در hESC ها بیان نمی‌شوند. خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی تأیید کرد که برنامه بیان ژن C8 پس از LINE1 KD در hESC ها القا می‌شود. این اثر در سلول‌های ساده‌تر (RSeT+DT) برجسته‌تر از حالت اولیه یا شبه ساده بود.

۵. اعتبارسنجی نتایج با روش‌های مستقل

القا شدن نشانگرهای تشخیصی ۸C پس از LINE1 KD با استفاده از یک ASO مستقل که منطقه ORF2 را هدف قرار می‌دهد، یا یک رده XY از hESC ها، تأیید شد. همچنین، استفاده از سیستم تداخل CRISPR (CRISPRi) برای سرکوب LINE1 RNA و القای ژن‌های نشانگر ۸C یافته‌ها را بیشتر تأیید کرد.

۵.۱. نتیجه‌گیری

سرکوب LINE1 RNA با استفاده از روش‌های مختلف به‌طور مداوم منجر به از بین رفتن سرکوب برنامه ۸C در hESC ها شد. این نتایج نشان می‌دهند که LINE1 یک نقش کلیدی در حفظ وضعیت هسته‌ای hESC ها و جلوگیری از بازگشت به حالت ۸C ایفا می‌کند. باعث تولید و افزایش قابل توجه جمعیت ۸CLCs می‌شود که ویژگی‌های ژنی منحصر به فردی دارند.

۶. LINE1 KD باعث تولید سلول‌های شبه ۸ (8CLCs) می‌شود

سلول‌های شبه ۸ (8CLCs) انتظار می‌رود که زیرمجموعه‌ای نادر از سلول‌ها در کشت‌های سلول‌های بنیادی ساده (naïve) hESCs باشند. برای بررسی اینکه آیا افزایش برنامه ۸C پس از LINE1 KD به دلیل القای ۸CLCs است، ما توالی یابی RNA تک‌سلولی (scRNA-seq) را روی hESC هایی که با SO-L1 (کنترل) یا LINE1 KD (ASO-L1) ترانسفکت شده بودند، انجام دادیم. در مجموع، ۵۴۷۱ سلول در گروه کنترل و ۷۶۲۹ سلول در گروه LINE1 KD توالی یابی و از کنترل کیفیت عبور کردند. تحلیل UMAP نشان داد که جمعیتی از سلول‌ها امضاهای ژنی برنامه ۸C را بیان می‌کنند، از جمله نشانگرهای کلیدی مانند TPRX1, ZSCAN4, DPPA3, ZNF280A, و SLC34A2. این خوشه همچنین عناصر قابل جابجایی (TEs) مانند MLT2A1/2 و LTR7B را بیان می‌کند، که قبلاً به عنوان نشانگرهای مرحله ۸C گزارش شده بودند. مطابق با ویژگی‌های ۸CLCs، این خوشه سطوح پایین تری از نشانگرهای پرتوانی مانند POU5F1, SOX2, و NANOG را نشان می‌دهد. برخی نشانگرهای ۸C مانند TPRX1, DPPA3, و CCNA1 به‌طور مداوم در تمام سلول‌های این خوشه شناسایی شدند، در حالی که برخی دیگر (مانند DUXA, KLF17, و ZSCAN4) تنها در بخشی از آن‌ها شناسایی شدند. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از ناهمگنی جمعیت سلولی یا محدودیت‌های عمق توالی یابی باشد.

۶.۱. تغییرات بیان ژنی: LINE1 KD

باعث افزایش قابل توجه جمعیت ۸CLCs می‌شود. این خوشه تنها در گروه LINE1 KD مشاهده شد، جایی که ۰.۰۷٪ از سلول‌های کنترل به خوشه ۸CLC تعلق داشتند، اما LINE1 KD باعث افزایش ۶۵ برابری این جمعیت به ۴.۹۵٪ شد.

۶.۲. مقایسه با داده‌های جنین انسانی

برای بررسی شباهت بین hESC های LINE1 KD و سلول‌های جنینی در شرایط *in vivo*، داده‌های scRNA-seq با داده‌های منتشر شده از جنین‌های انسانی اولیه مقایسه شدند. این تحلیل نشان داد که گروه‌هایی از سلول‌ها در مجموعه داده LINE1 KD، اما نه در مجموعه کنترل، با خوشه‌های سلولی جنین‌های روز سوم (8C) و چهارم (مورولا) تطابق دارند.

۶.۳. ارزیابی مستقل با ایمونوفلورسانس

برای بررسی مستقل ظهور CLCs8، بیان پروتئین TPRX1، به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی CLCs8، با ایمونوفلورسانس ارزیابی شد. در hESC های H9، LINE1 KD تعداد سلول های TPRX1+ را از ۰.۸٪ به ۳.۶٪ افزایش داد. در hESC های H1، این افزایش از ۰.۲٪ به ۴.۲٪ مشاهده شد. این درصدها با داده های scRNA-seq همخوانی دارند.

۶.۴. نتیجه‌گیری

این یافته‌ها نشان می‌دهد که LINE1 KD به‌طور مؤثری باعث ظهور CLCs8 در کشت‌های hESC می‌شود و تغییرات بیان ژنی قابل توجهی را القا می‌کند که با مراحل رشد اولیه انسانی مرتبط است.

۷. القای برنامه ۸C پس از LINE1 KD با واسطه TPRX1 انجام می‌شود

برای شناسایی ژن‌هایی که ممکن است واسطه القای برنامه ۸C پس از LINE1 KD باشند، بررسی‌های متعددی انجام شد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که فاکتور رونویسی DUX4 تنظیم‌کننده اصلی برنامه ۸C انسانی است، مشابه نقش همولوگ آن (Dux) در موش. در سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESCs)، القای برنامه ۲C پس از LINE1 KD به Dux وابسته است.

۷.۱. عدم نقش DUX4

یافته‌های ما نشان دادند که ژن‌های DUX4 و مشابه آن در داده‌های RNA-seq ما اساساً غیرقابل‌شناسایی بوده و توسط LINE1 KD القا نمی‌شوند. این نتیجه با نقش TPRX1، یک تنظیم‌کننده شناخته‌شده CLCs8 انسانی در شرایط آزمایشگاهی و توسعه ۸C در شرایط *in vivo*، در تضاد است.

۷.۲. بررسی سایر عوامل احتمالی

در کنار TPRX1، نقش بالقوه برای H3.XY، یک واریانت هیستونی که به‌عنوان نشانگر حالت ۸C شناخته می‌شود و با LINE1 KD القا می‌شود، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، نقش احتمالی TP53 به دلیل ارتباط آن با فعال‌سازی ژن‌های ۲C/8C ناشی از استرس در سلول‌های انسانی و موش، بررسی شد.

۷.۳. آزمایش Knockdown ژن‌ها

برای بررسی نقش این ژن‌های کاندید، LINE1 KD با استفاده از ASO به‌تنهایی یا هم‌زمان با KD ژن‌های TPRX1، H3.XY یا TP53 با استفاده از siRNA انجام شد. نتایج RNA-seq نشان داد که TPRX1 KD، اما نه H3.XY یا TP53، به‌طور جزئی القای برنامه ۸C پس از LINE1 KD را سرکوب می‌کند.

۷.۴. یافته‌های کلیدی

بیان نشانگرهای تشخیصی کلیدی ۸ CLCs مانند KDM4E, SLC34A2, ZSCAN4, RFPL2, DPPA3 و KLF17 تنها در صورت KD TPRX1 به سطوح کنترل بازمی‌گردند، اما این امر در مورد سایر ژن‌ها مشاهده نشد. با این حال، تغییرات رونویسی دیگری که توسط LINE1 KD القا شده‌اند و به برنامه ۸ C مربوط نمی‌شوند، توسط KD TPRX1 نجات نمی‌یابند. القای برنامه ۸ C پس از LINE1 KD تا حدی با کاهش مهار TPRX1 انجام می‌شود. هرچند، ممکن است واسطه‌های دیگری نیز در انتقال به ۸ CLCs نقش داشته باشند.

۸. دامنه‌های مرتبط با لامینا و هسته: دینامیک مکانی ژن‌های ۸ C و غنی‌سازی برای LINE1

در سلول‌های شبه ۲ C موش (2CLCs)، فعال‌سازی Dux با جابه‌جایی آن از محیط هسته به نوکلئوپلاسم همراه است. برای درک دینامیک تقسیم‌بندی هسته‌ای، از جمله موقعیت‌یابی LINE1 و ژن‌های ۸ C در hESC، توالی‌یابی دامنه‌های مرتبط با هسته (NAD) ها (و لامینا LAD) ها (انجام شد).

۸.۱. یافته‌ها

غنی‌سازی LINE1 در NAD ها و LAD ها : توالی‌یابی نشان داد که جایگاه‌های LINE1 انسانی در NAD ها و LAD ها در hESC ها غنی‌سازی شده‌اند. این نتایج با داده‌های قبلی در mESC ها سازگار است RNA LINE1. در کانون‌های هسته‌ای تجمع می‌یابد که اغلب در نزدیکی نوکلئول و لامینا قرار دارند، در حالی که در نوکلئوپلاسم تراکم کمتری دارند. تعامل RNA LINE1 با پروتئین‌ها: آزمایش CLIP-qRT-PCR نشان داد که RNA LINE1 با پروتئین‌های نوکلئولین (NCL) و لامینین B1 (LMNB1) تعامل دارد. تفاوت بین hESC های ساده و اولیه LAD: ها بین حالت‌های ساده (naïve) و اولیه hESC (primed) ها نسبتاً ثابت هستند، اما NAD ها در hESC های ساده کمتر دیده می‌شوند و در حالت اولیه از نظر سیگنال و اندازه گسترش می‌یابند. نتایج نشان می‌دهد که محفظه هسته‌ای ممکن است در مراحل اولیه رشد انسان بسیار دینامیک باشد. موقعیت‌یابی ژن‌های ۸ C: داده‌های LAD و NAD پیش‌بینی کردند که جایگاه‌های ژن‌های ۸ C مانند TPRX1 و H3.XY به نوکلئول یا لامینا مرتبط هستند. تحلیل DNA-FISH نشان داد که: TPRX1 در ۸ CLCs در نوکلئوپلاسم قرار دارد، اما با پیشرفت رشد hESC ها ارتباط بیشتری با لامینای هسته و محیط نوکلئول پیدا می‌کند.

H3.XY: در تمام حالت‌های hESC در لامینای هسته باقی می‌ماند و تنها حدود ۲۰٪ جایگاه‌های آن در ۸ CLCs به نوکلئوپلاسم منتقل می‌شود. تأثیر LINE1 KD بر موقعیت‌یابی هسته‌ای: در hESC های KD LINE1، درصد کمتری از جایگاه‌های H3.XY در لامینا قرار دارند (~۷۲٪ در مقابل ~۸۵٪ در سلول‌های کنترل) و فاصله کلی آن‌ها از لامینا افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که RNA LINE1 به سرکوب ژن‌های H3.XY با کمک به اتصال آن‌ها به لامینای هسته کمک می‌کند. عدم تغییر در موقعیت‌یابی LINE1 KD: TPRX1 تغییر معنی‌داری در موقعیت‌یابی TPRX1 ایجاد نکرد. و درصد کمی از جایگاه‌های TPRX1 در نزدیکی لامینا یا هسته در hESC های ساده و اولیه قرار دارند، که تفسیر تأثیر LINE1 KD را پیچیده می‌کند. همچنین، TPRX1 علی‌رغم موقعیت‌یابی غالب نوکلئوپلاسمی، در hESC های ساده و اولیه سرکوب می‌شود، که نشان می‌دهد مکانیسم‌های دیگری به جز موقعیت‌یابی هسته‌ای سبب عدم امکان است در سرکوب TPRX1 نقش داشته باشند.

۸.۲. نتیجه‌گیری

این داده‌ها نشان می‌دهد که RNA LINE1 نقش مهمی در تنظیم موقعیت‌یابی ژنی و سرکوب ژن‌ها از طریق ارتباط آن‌ها با لامینا و نوکلئول دارد و به دینامیک تقسیم‌بندی هسته‌ای در مراحل اولیه رشد hESC کمک می‌کند.

۹. کروموزوم ۱۹: غنی‌سازی برای ژن‌های القا شده پس از LINE1 KD و ارتباط ترجیحی با نوکلئول

۹.۱. یافته‌های کلیدی

تمرکز ژن‌های مهم روی کروموزوم ۱۹ مشاهده شد که ژن TPRX1 و سایر نشانگرهای کلیدی حالت ۸ مانند CTPRX2, ZSCAN4, DUXA و LEUTX همگی در کروموزوم ۱۹ قرار دارند. بررسی توزیع کروموزومی ژن‌هایی که بیان آن‌ها در hESC های LINE1 KD متفاوت است، نشان داد که کروموزوم ۱۹ غنی‌سازی قابل توجهی برای ژن‌های افزایش‌یافته در تمام شرایط hESC آزمایش‌شده (RSeT+DT), RSeT و (Primed) دارد.

ارتباط کروموزوم ۱۹ با NAD ها و نوکلئول: تحلیل داده‌های LAD/NAD-seq نشان داد که بیشتر کروموزوم‌ها در هر دو محفظه (NAD) و (LAD غنی‌سازی دارند، اما کروموزوم‌های ۱۹ و ۲۲ به طور خاص برای NAD ها غنی‌سازی شده‌اند، نه LAD ها. این مشاهده با داده‌های سلول‌های تمایز یافته نیز پشتیبانی می‌شود، که نشان می‌دهد کروموزوم ۱۹ در یک ناحیه داخلی هسته‌ای نزدیک به نوکلئون قرار دارد. تفاوت موقعیت‌یابی کروموزوم ۱۹ در ۸ CLCs برای بررسی موقعیت سه‌بعدی کروموزوم ۱۹ در ۸ CLCs در مقایسه با hESC ها، تکنیک رنگ‌آمیزی کروموزوم انجام شد. در سلول‌های CLC ۸، یک جدایی قابل توجه بین کروموزوم ۱۹ و نوکلئول مشاهده شد، در حالی که در سلول‌های ساده (naïve) این کروموزوم ارتباط نزدیکی با نوکلئول داشت. تغییرات در مورفولوژی نوکلئول در ۸ CLCs جدایی بیشتر بین کروموزوم ۱۹ و نوکلئول در ۸ CLCs به شکل گردتر نوکلئول در این سلول‌ها مرتبط است. این امر نشان می‌دهد که ۸ CLCs از قاعده ارتباط نزدیک کروموزوم ۱۹ و نوکلئول در انواع دیگر سلول‌ها مستثنی هستند. کروموزوم ۱۹ نقش مهمی در برنامه رونویسی مرتبط با LINE1 KD دارد و به‌طور معمول با نوکلئون مرتبط است. این ارتباط در ۸ CLCs کمتر دیده می‌شود. این یافته‌ها اهمیت نوکلئول را در تنظیم ژنوم در مراحل رشد اولیه انسانی برجسته می‌کنند.

۱۰. RNA LINE1 برای حفظ ساختار هسته‌ای و سرکوب برنامه ۸ ضروری است

۱۰.۱. یافته‌های کلیدی

تفاوت مورفولوژی نوکلئول در ۸ CLCs سلول‌های CLC ۸ یک مورفولوژی گردتر برای نوکلئول نشان می‌دهند و به‌طور قابل توجهی با شکل نامنظم نوکلئول در hESC های دیگر و سلول‌های غیرپرتوان متفاوت است. این ساختار در ۸ CLCs مشابه چیزی است که در *in vivo* در جنین‌های انسانی اولیه تا مرحله ۴-۸ سلولی مشاهده می‌شود. پس از این مرحله، نوکلئول نامنظم‌تر شده و هتروکروماتین در پیرامون آن تجمع می‌یابد. نقش RNA LINE1 در معماری نوکلئول: سرکوب LINE1 در hESC ها باعث اختلال در سازمان‌دهی طبیعی نوکلئول می‌شود. در سلول‌های LINE1 KD، دامنه FBL (عنصر داخلی فیبریل متراکم) اغلب به خارج از دامنه NCL (عنصر گرانولی خارجی) می‌رسد و ساختارهایی به نام کلاهک‌های نوکلئولی تشکیل می‌دهد. این پدیده همراه با افزایش غیرطبیعی سطح FBL، نشانه‌ای از تنش نوکلئولی است. تفاوت سرکوب RNA پلی‌مراز I و: LINE1 KD مهار RNA پلی‌مراز I با استفاده از BMH باعث مورفولوژی گرد

نوکلئول و افزایش چشمگیر نشانگرهای ژنی ۸C پس از ۲۴ ساعت شد. این در حالی است که LINE1 KD باعث اختلالی متمایز در معماری نوکلئول می‌شود. بررسی تنظیم‌کننده‌های خروج از حالت ۸C تجزیه و تحلیل بیان پروتئین‌های نوکلئولی و سرکوب‌کننده‌های هتروکروماتین نشان داد، اجزای اصلی کمپلکس EZH2 (PRC2)، EED، SUZ12 و پروتئین‌های کلیدی نوکلئولی (NCL) و (FBL) در مراحل تقسیم جنین به شدت افزایش می‌یابند. در مقابل، اعضای کمپلکس PRC1 یا عوامل مرتبط با متیلاسیون H3K9 در مراحل اولیه رشد انسانی حضور ندارند یا الگوی بیان معکوس نشان می‌دهند. نقش PRC2 و NCL در تنظیم ژن‌های ۸C: مهار PRC2 (با استفاده از UNC1999 اما نه آنالوگ غیر فعال آن UNC2400) به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش قابل توجه ژن‌های ۸C می‌شود، حتی بدون حضور DZNep در محیط کشت. سرکوب NCL با استفاده از CRISPRi نیز بیان نشانگرهای ژنی کلیدی ۸C را افزایش می‌دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که RNA LINE1 با حفظ معماری بالغ نوکلئول و همراه با پروتئین NCL و سرکوب ژنی با واسطه PRC2، از بازگشت hESC ها به حالت ۸C جلوگیری می‌کند. این مکانیزم‌ها برای جلوگیری از فعال‌سازی برنامه‌های ژنی مرتبط با توانایی توتی‌پوتنت در مراحل اولیه رشد انسانی ضروری هستند.

۱۰۲. بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت برنامه ۸C در رشد اولیه انسان: فاکتور رونویسی TPRX1 که بخشی از خانواده‌ای از فاکتورهای هومئوباکس است، نقش مهمی در تولید سلول‌های شبه ۸C (8CLCs) در hESC ها و رشد جنین‌های ۸C انسانی دارد، اما در موش نقش مشابهی ندارد. نقش اساسی LINE1: این مطالعه نشان داد که LINE1 یک تنظیم‌کننده حیاتی برای حفظ خودنوسازی و هویت hESC ها است و از بازگشت رشدی به حالت ۸C جلوگیری می‌کند. RNA LINE1 با لامینای هسته و نوکلئول مرتبط است و برای حفظ معماری نوکلئولی ضروری است. این RNA به عنوان مانعی برای بیان TPRX1 و فعال‌سازی برنامه ۸C عمل می‌کند. نقش نوکلئول در دینامیک کروموزوم و تنظیم ژن‌ها: این مطالعه به دینامیک ناحیه کروموزوم ۱۹ و نقش کلیدی نوکلئول در تنظیم انتقال از حالت توتی‌پوتنت به پرتوت (totipotency-to-pluripotency) در hESC ها اشاره دارد. کروموزوم ۱۹ غنی از ژن‌های مرتبط با برنامه ۸C است و معمولاً با نوکلئول مرتبط است. نوکلئول به عنوان مرکزی برای سرکوب هتروکروماتین عمل می‌کند، از جمله تنظیم‌کننده‌های ۸C مانند TPRX1. نقش PRC2 در سرکوب برنامه ۸C:

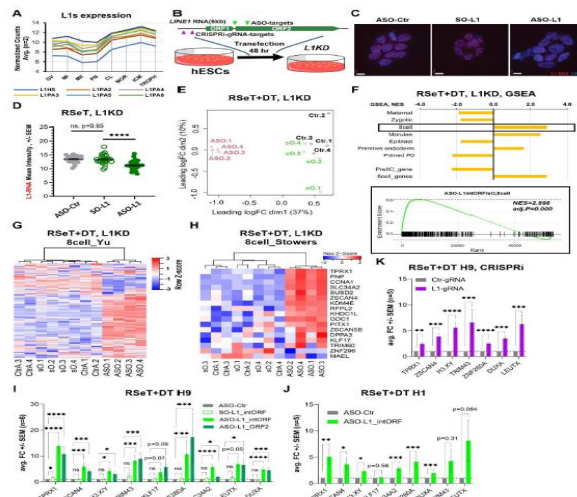
کمپلکس PRC2 در سرکوب برنامه ۸C نقش مهمی دارد، مهار PRC2 باعث افزایش چشمگیر ژن‌های ۸C می‌شود. تطابق عملکرد LINE1 در موش و انسان: این مطالعه نشان داد که LINE1 در موش و انسان نقش مشابهی در تنظیم تقسیم‌بندی هسته‌ای و رشد اولیه دارد. باوجود تفاوت‌های ژنومی بین این دو گونه، نقش LINE1 در مناطق غنی از AT و فقر ژن که به طور معمول سرکوب شده‌اند، مشابه است. بازسازی نوکلئول و نقش LINE1: تغییرات قابل توجه در ساختار نوکلئول در طی انتقال بین ۸C و hESC ها ساده مشاهده شد. القای قوی فاکتورهای نوکلئولی در مرحله ۴-۸ سلولی ممکن است به بلوغ نوکلئول کمک کند. ارتباط RNA LINE1 با پروتئین NCL جدیداً سنتز شده ممکن است جدایی فاز مایع-مایع و/یا بلوغ نوکلئول را تسهیل کند.

۱۰۳. نتیجه‌گیری کلی

این یافته‌ها نشان می‌دهند که LINE1 نه تنها DNA زائد " نیست، بلکه تنظیم‌کننده‌ای اساسی برای سازماندهی سه‌بعدی هسته و سرکوب ژنی با واسطه کروماتین در hESC ها است. مطالعات بیشتر درباره نقش توسعه‌ای LINE1 و توزیع آن در محفظه‌های هسته‌ای در سایر گونه‌های پستانداران می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های تکاملی و تنظیم رشد کمک کند.

۱۰۴. نقش لامینای هسته‌ای

RNA LINE1 و برخی جایگاه‌های ۸ C مانند H3.XY نیز در لامینای هسته غنی هستند. یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که لامینای هسته در مرحله ۲ C جنین موش بسیار دینامیک است و ممکن است سازمان‌دهی کروماتین را در فعال‌سازی ژنوم زیگوتی (ZGA) تنظیم کند



شکل ۱- RNA LINE1: به‌عنوان مانعی برای برنامه ۸ C در hESC ها

(A) مقادیر نرمال‌شده متوسط RNA-seq از دو نمونه مستقل نشان‌دهنده القای زیرخانواده‌های LINE1 خاص به انسان و نخستی‌ها (L1HS) و L1PA2 تا L1PA8 در طی مراحل شکافت جنین انسانی است. مراحل شامل (GV و زیگول زایشی)، (MI متافاز I)، (MII متافاز II)، (PN مرحله پیش‌هسته‌ای)، (CL شکافت)، (MOR مورولا)، (ICM توده سلولی داخلی)، (TROPH تروفکتودرم) هستند (B). نمای شماتیک از آزمایش‌های RNA LINE1 Knockdown در hESC ها.

ASO ها (پیکان‌های سبز): مکان‌های inter-ORF و ORF2 را هدف قرار می‌دهند.
(CRISPRi gRNA پیکان‌های بنفش): مکان‌های ۵' UTR-عناصر کامل LINE1 را هدف قرار می‌دهند.

سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شدند.
C تصاویر RNA FISH از hESC های RSeT نشان می‌دهد که RNA LINE1 به‌طور عمده در هسته قرار دارد.
Knockdown مؤثر RNA LINE1 در سلول‌های ترانسفکشن شده با ASO-L1 در مقایسه با کنترل‌ها (ASO-Ctr) و SO-L1 (۴۸ ساعت ترانسفکشن دیده می‌شود).

(D) اندازه‌گیری شدت سیگنال RNA FISH LINE1 در (C) نشان می‌دهد که شدت LINE1 در سلول‌های ترانسفکشن شده با ASO-L1 به‌طور قابل توجهی در مقایسه با کنترل‌ها کاهش یافته است. نتایج از سه آزمایش مستقل.

(E) نمودار MDS نشان‌دهنده پروفایل‌های بیان ژنی متمایز hESC های RSeT+DT با ASO-L1 (KD LINE1) نسبت به نمونه‌های کنترل SO-L1 و ASO-Ctr.

(F) تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژن نشان می‌دهد که hESC های KD LINE1 با برنامه‌های ۸ سلولی و مورولا غنی‌سازی قابل توجهی دارند.

(G و H) نقشه‌های حرارتی نشان‌دهنده القای مجموعه‌های ژنی تشخیصی مرحله ۸ (Yu et al. و Taubenschmid-C)

(Stowers et al.) در hESC های RSeT+DT پس از ASO-L1 KD در مقایسه با کنترل‌ها.

I)

qRT-PCR تأیید می‌کند که ژن‌های ۸ در hESC های RSeT+DT با استفاده از ASO هایی که سایت‌های inter-ORF و ORF2 را هدف قرار می‌دهند، افزایش می‌یابند. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۶ تکرار زیستی هستند.

J)

qRT-PCR تأیید می‌کند که ژن‌های ۸ در hESC های RSeT+DT با استفاده از ASO هایی که سایت‌های inter-ORF را هدف قرار می‌دهند، افزایش می‌یابند. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۵ تکرار زیستی هستند.

K)

qRT-PCR تأیید می‌کند که ژن‌های ۸ در hESC های RSeT+DT با استفاده از CRISPRi که LINE1 را هدف قرار می‌دهد، افزایش می‌یابند. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۵ تکرار زیستی هستند.

۱۰.۵. آمار

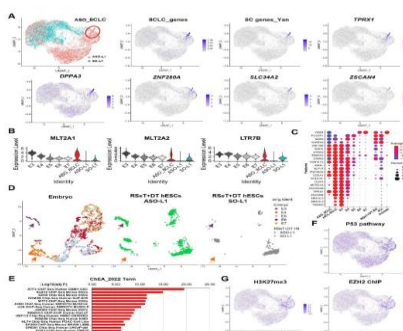
Ns: معنی‌دار نیست

*: $p < 0.05$

**: $p < 0.01$

***: $p < 0.001$

****: $p < 0.0001$



شرح شکل ۲ LINE1 KD: القای تولید سلول‌های شبه ۸ (8CLCs) C

A. تصویرسازی UMAP از داده‌های scRNA-seq در hESC های RSeT+DT پس از LINE1 KD و کنترل. نقاط قرمز نشان‌دهنده سلول‌های ASO-L1 KD و نقاط آبی سلول‌های SO-L1 هستند. جمعیت محصور شده (خوشه ۱۵) نشان‌دهنده 8CLCs القاشده توسط LINE1 KD است که مجموعه‌های ژنی ۸ C را بیان می‌کنند. نشانگرهای ژنی ۸ C نیز مشخص شده‌اند.

B. نمودار ویولن بیان نرمال شده نمای عناصر قابل جابجایی (TEs) غنی شده در ۸ C مانند MLT2A1، MLT2A2 و LTR7B در مراحل E3 تا E7 جنین انسانی، ۸ CLCs القاشده توسط LINE1 KD، و کل hESC های ترانسفکت شده با ASO-L1 یا SO-L1.

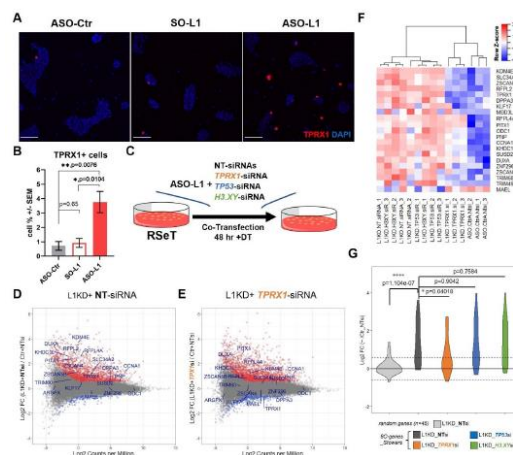
C. نمودار حبابی که فرکانس بیان و میانگین بیان ژن‌های پرتوانی و توتی‌پوتنتی نماینده را در مراحل اولیه جنین انسانی، ۸ CLCs القاشده توسط ASO-L1 KD، ۸ CLCs القاشده توسط e4CL، hESC های RSeT+DT کنترل (ترانسفکت شده با SO-L1)، hESC های ۴ CL و hESC های اولیه نشان می‌دهد.

D. تصویرسازی UMAP از داده‌های scRNA-seq جنین‌های انسانی اولیه (E3 تا E7).

داده‌های مربوط به hESC های ترانسفکت شده با ASO-L1 یا SO-L1 روی داده‌های *in vivo* قرار گرفته‌اند. پیکان‌های بنفش و نارنجی به خوشه‌های سلولی مراحل E3 و E4 اشاره دارند. (E) عوامل مرتبط با کروماتین که در ژن‌های افزایش یافته پس از LINE1 KD در hESC های RSeT+DT غنی‌سازی شده‌اند. (F) نمای UMAP از سطوح بیان ژن‌های مسیر p53. (G) نمای UMAP از سطوح بیان ژن‌های نشان‌دار شده با H3K27me3 (چپ) و اهداف EZH2 (راست) در hESC ها.

۱۰.۴. نتیجه‌گیری

UMAP نشان می‌دهد که LINE1 KD باعث القای جمعیتی از سلول‌ها می‌شود که برنامه‌های ژنی C ۸ را بیان می‌کنند و با سلول‌های C ۸ انسانی در مراحل E3 و E4 جنین همخوانی دارند. TES. مرتبط با C ۸ و ژن‌های مسیر p53 و اهداف PRC2 مانند EZH2 در سلول‌های LINE1 KD غنی شده‌اند که سرنخ‌هایی درباره تنظیم ژنومی برنامه C ۸ ارائه می‌دهد.



شکل ۳- القای برنامه C ۸ پس از LINE1 KD با واسطه TPRX1

(A). تصاویر ایمونواستینینگ نشان‌دهنده افزایش سلول‌های مثبت برای TPRX1 در hESC های RSeT+DT H9 پس از LINE1 KD (ASO-L1KD) در مقایسه با کنترل‌ها. این نتایج نمایانگر سه آزمایش مستقل هستند. مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر.

(B). کمی‌سازی درصد سلول‌های TPRX1+ در هر نمونه مشخص شده. حدود ۱۵۰۰-۱۰۰۰ سلول از شش تصویر به‌طور تصادفی انتخاب شده در دو آزمایش مستقل تحلیل شدند. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM هستند.

آزمون Welch t، * = $p < 0.05$ ، ** = $p < 0.01$.

(C). نمای شماتیک از Knockdown RNA LINE1 به همراه ترانسفکشن همزمان با siRNA هایی که ژن‌های TPRX1، TP53 و H3.XY را هدف قرار می‌دهند.

نمونه‌های کنترل با siRNA غیرهدفمند (NT-siRNA) مقایسه شدند.

سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شدند.

و D (E) نمودار: MA تغییرات بیان ژن (log2 fold change) نشان داده شده است:

(D) برای L1 KD + NT-siRNA.

(E) برای L1 KD + TPRX1-siRNA در مقایسه با سلول‌های کنترل.

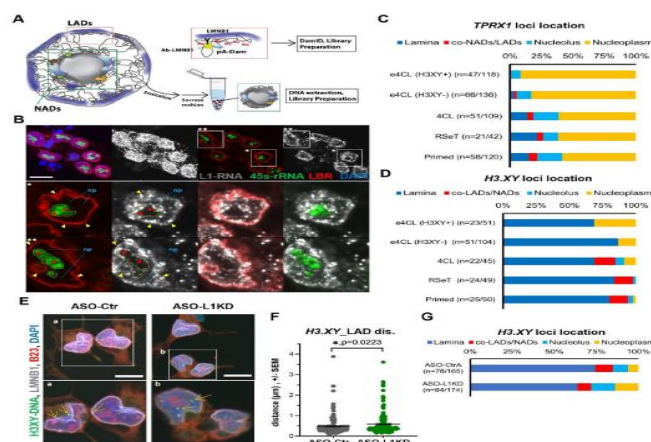
ژن‌های با مقدار $\text{adj.P-value} < 0.05$ و Fold Change بالاتر از ۱.۵ یا کمتر از -۱.۵ با رنگ قرمز یا آبی برجسته شده‌اند. نشانگرهای ژنی ۸ C براساس (Taubenschmid-Stowers et al.) با رنگ آبی تیره مشخص شده‌اند.

(F) نقشه حرارتی: کاهش القای ژن‌های نشانگر ۸ C زمانی مشاهده می‌شود که LINE1 KD با TPRX1 RNAi ترکیب شود، اما چنین کاهشی در صورت استفاده از TP53 RNAi یا H3.XY RNAi دیده نمی‌شود. (G) نمودار ویولن از همان داده‌های بخش: TPRX1 RNAi F، برخلاف TP53 RNAi یا H3.XY RNAi، به‌طور معناداری القای ژن‌های نشانگر ۸ C را سرکوب می‌کند.

آزمون Wilcoxon: $p < 0.05$ ، $**** = p < 0.0001$.

۱۰.۵. نتیجه‌گیری

این یافته‌ها نشان می‌دهد که TPRX1 یک تنظیم‌کننده کلیدی در القای برنامه ۸ C است. Knockdown TPRX1 به‌طور معناداری از القای نشانگرهای ژنی ۸ C پس از LINE1 KD جلوگیری می‌کند، در حالی که Knockdown TP53 یا H3.XY چنین تأثیری ندارد.



شکل ۴: دامنه‌های مرتبط با لامینا و نوکلئول، غنی‌سازی برای LINE1 و مکان‌یابی دینامیک جایگاه‌های ۸ C را نشان می‌دهند

(A) نمای شماتیک از روش‌های LAD-seq و NAD-seq برای مطالعه توزیع دامنه‌های مرتبط با لامینا و نوکلئول در hESC. برای جزئیات بیشتر به بخش روش‌ها مراجعه شود.

(B) تصویر نماینده‌ای از RNA-FISH برای LINE1 و ۴۵S-rRNA همراه با co-IF با استفاده از آنتی‌بادی LBR در hESC: RSeT+DT.

LINE1 RNA در نزدیکی دامنه‌های نوکلئولی و لامینی غنی شده است.

تصویر پروجکشن ماکزیمم (دو پانل بالا سمت چپ) نشان‌دهنده بیان بالای LINE1 در هسته است.

در یک لایه نماینده (دو پانل بالا سمت راست)، مناطق مشخص شده (با * و **) بزرگ‌نمایی شده و کانال‌های رنگ جدا شده‌اند (پانل‌های وسط و پایین). خط زرد نقطه‌چین محدوده نوکلئول را مشخص می‌کند. پیکان‌های زرد و قرمز به نقاط غنی‌شده از LINE1 RNA در دامنه‌های نوکلئولی و لامینی اشاره دارند. مناطق نوکلئوپلاسم (np) به‌طور کلی از تجمع LINE1 خالی هستند. مقیاس: ۱۰ میکرومتر. C) توزیع مکان جایگاه‌های TPRX1 در بین محفظه‌های هسته‌ای مختلف. برای جزئیات بیشتر به شکل S10 مراجعه شود.

D) توزیع مکان جایگاه‌های H3.XY در محفظه‌های هسته‌ای مختلف. برای جزئیات بیشتر به شکل S11 مراجعه شود. E) تصویر نماینده‌ای از DNA-FISH برای H3.XY همراه با co-IF برای B23 و LMNB1 در hESC در RSeT+DT LINE1 KD: کنترل و:

جایگاه‌های H3.XY در سلول‌های LINE1 KD از لامینا دورتر شده‌اند. منطقه مشخص شده در تصاویر پروجکشن ماکزیمم (پانل‌های بالا) بزرگ‌نمایی شده و به صورت تصاویر نماینده Z-stack (پانل‌های پایین) نمایش داده شده است.

پیکان‌های زرد به جایگاه‌های H3.XY در نوکلئوپلاسم اشاره دارند. مقیاس: ۱۰ میکرومتر. F) کمی‌سازی داده‌های H3.XY DNA-FISH و co-IF نشان‌دهنده در E): فاصله جایگاه‌های H3.XY تا دامنه لامینا رسم شده است.

اگر فاصله کمتر از ۰.۵ میکرومتر باشد، به‌عنوان درون LAD ها تعریف می‌شود.

تعداد سلول‌های تحلیل‌شده در هر گروه در G مشخص شده است.

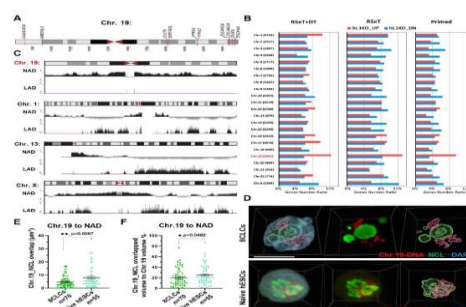
آزمون: Mann-Whitney: * = $p < 0.05$

داده‌ها از سه آزمایش مستقل گرفته شده‌اند.

G) توزیع مکان جایگاه‌های H3.XY در بین محفظه‌های هسته‌ای مختلف در hESC های کنترل و LINE1 KD ، بر اساس کمی‌سازی فاصله در F. تعداد سلول‌ها و جایگاه‌های H3.XY تحلیل‌شده نشان داده شده است. داده‌ها از سه آزمایش مستقل گرفته شده‌اند.

۱۰.۶. نتیجه‌گیری

این شکل نشان می‌دهد که LINE1 RNA در نزدیکی دامنه‌های نوکلئولی و لامینی غنی است و LINE1 KD باعث تغییر مکان جایگاه‌های H3.XY از لامینا می‌شود. این داده‌ها نقش LINE1 را در حفظ تقسیم‌بندی هسته‌ای و تنظیم برنامه‌های ژنی مانند برنامه C8 برجسته می‌کند.

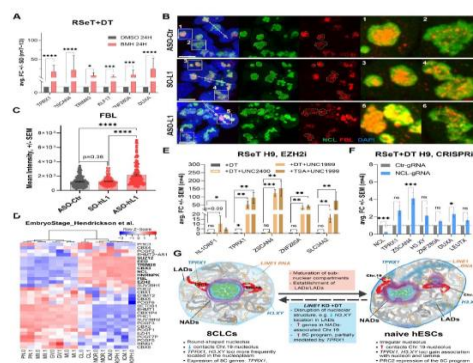


شکل ۵- کروموزوم ۱۹ غنی از ژن‌های القا شده پس از LINE1 KD و ارتباط ترجیحی با نوکلئول

(A) ایده‌گرام کروموزوم ۱۹ با نشان دادن مکان چندین ژن مرتبط با حالت C.۸
(B) توزیع ژن‌های کدکننده پروتئین که در نتیجه LINE1 KD بیان آن‌ها افزایش یافته (میله‌های قرمز) یا کاهش یافته (میله‌های آبی) است.
درصد ژن‌های بیان‌شده از کل ژن‌های هر کروموزوم محاسبه شده است.
کروموزوم ۱۹ در تمام شرایط کشت hESC نسبت به سایر کروموزوم‌ها، تعصب بیشتری به سمت ژن‌های افزایش یافته نشان می‌دهد.
(C) نمایشگر مرورگر ژنومی از امضاهای غنی‌سازی LAD و NAD در کروموزوم‌های ۱۹، ۱، ۱۳ و X:
کروموزوم ۱۹ به‌طور مشخص برای NAD غنی شده است اما غنی‌سازی برای LAD را نشان نمی‌دهد، که در سراسر کروموزوم دیده می‌شود.
(D) تصاویر نمونه ویدیوهای S1 و S2 از DNA-FISH کروموزوم ۱۹ و co-IF استفاده از آنتی‌بادی: NCL (naïve) کروموزوم ۱۹ در H3.XY+ 8CLCs ارتباط کمتری با نوکلئول نشان می‌دهد، در مقایسه با hESC‌های ساده (naïve) که به ترتیب در محیط‌های e4CL و ۴CL کشت داده شدند.
داده‌های بازسازی سه‌بعدی فلورسانس و سطح نیز نمایش داده شده‌اند.
نماینده‌ای از دو آزمایش مستقل.
مقیاس: ۲۰ میکرومتر.
(E و F) کمی‌سازی DNA-FISH کروموزوم ۱۹ و co-IF: NCL در hESC‌های ساده (naïve) همپوشانی قابل توجهی بیشتر بین قلمروهای کروموزوم ۱۹ و نوکلئول نسبت به ۸ CLCs (H3.XY+ یا H3.XY- وجود دارد).
داده‌ها از دو آزمایش مستقل تکرار شده.
تعداد سلول‌های تحلیل‌شده در هر گروه مشخص شده است.
آزمون $p < 0.05$: *، Mann-Whitney. $p < 0.01$: **

۱۰.۷. نتیجه‌گیری

کروموزوم ۱۹ در نتیجه LINE1 KD غنی از ژن‌های افزایش‌یافته است و ارتباط ترجیحی با نوکلئول نشان می‌دهد. این ارتباط در سلول‌های ۸ CLC ضعیف‌تر است و این تغییر با ساختار نوکلئول و نقش آن در تنظیم ژن‌های حالت C مرتبط است. داده‌ها نقش کروموزوم ۱۹ و نوکلئول را در تنظیم برنامه‌های ژنی در hESC‌ها برجسته می‌کند.



شکل ۶ - RNA LINE1: از معماری نوکلئولی پشتیبانی می‌کند و برنامه ۸C را سرکوب می‌کند

(A) داده‌های qRT-PCR نشان‌دهنده افزایش قوی ژن‌های ۸C پس از مهار RNA Pol I با استفاده از ۰.۲۵ μM BMH به مدت ۲۴ ساعت در hESC ها. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۷-۱۳ تکرار زیستی هستند. آزمون Student's t: * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$.

(B) ایمونوفلورسانس (IF) برای NCL و FBL در hESC های کنترل و: LINE1 KD در سلول‌های LINE1 KD، FBL از قلمرو NCL خارج می‌شود. این پدیده نشان‌دهنده اختلال در معماری نوکلئول است. نماینده دو آزمایش مستقل. مقیاس: ۱۰ میکرومتر.

(C) کمی‌سازی تصاویر IF FBL مطابق: (B) سلول‌های LINE1 KD سطوح بالاتری از FBL نسبت به hESC های کنترل دارند. داده‌ها از دو آزمایش مستقل. آزمون Mann-Whitney: **** = $p < 0.0001$.

(D) نقشه حرارتی بیان ژن برای فاکتورهای انتخابی هتروکروماتین و نوکلئولی در طول مراحل اولیه رشد جنین انسانی: داده‌های RNA-seq به صورت بالک. پروتئین‌های نوکلئولی و زیرواحدهای PRC2 (برجسته‌شده) در مراحل شکافت (CL) افزایش می‌یابند.

(E) داده‌های qRT-PCR: افزایش بیان ژن‌های ۸C پس از مهار EZH2 در hESC های RSeT+DT یا RSeT+TSA با استفاده از ۲.۵ μM UNC1999 به مدت ۴۸ ساعت، در مقایسه با کنترل‌های RSeT+DT و RSeT+DT+UNC2400. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۴ تکرار زیستی هستند. آزمون Student's t: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

(F) داده‌های qRT-PCR: افزایش بیان ژن‌های ۸C پس از Knockdown NCL با استفاده از CRISPRi. داده‌ها میانگین $\pm$ SEM از ۵-۷ تکرار زیستی هستند. آزمون Student's t: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

(G) مدل پیشنهادی: بلوغ NAD ها و LAD ها و بازتوزیع سه‌بعدی هسته‌ای کروموزوم ۱۹ و جایگاه‌های کلیدی ۸C بین hESC و CLCs های ساده.

LINE1 RNA با حفظ معماری نوکلئول و سرکوب برنامه ۸C، نقش حیاتی ایفا می‌کند.

۱۰.۸. نتیجه‌گیری

این شکل نشان می‌دهد که RNA LINE1 از معماری بالغ نوکلئول پشتیبانی می‌کند، که به عنوان مانعی در برابر فعال‌سازی ژن‌های ۸C عمل می‌کند. مهار RNA LINE1 یا عوامل مرتبط با نوکلئول مانند NCL یا EZH2 منجر به افزایش ژن‌های ۸C و بازتوزیع کروموزوم‌های کلیدی در هسته می‌شود. این نتایج نقش LINE1 را در سرکوب حالت توتی‌پونت در hESC ها برجسته می‌کند.

۱۱. روش‌ها: کشت انواع hESC و MEF

۱۱.۱. کشت hESC اولیه: (Primed hESC)

خطوط سلولی H9: H1 محیط کشت. mTeSR Plus Medium (STEMCELL #05825): بستر: صفحات پوشیده‌شده با ماتریل. (VWR #CA89050-192) شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO₂، ۲۰٪ O₂.

پاساژدهی: شست‌وشو با PBS ۲. افزودن و حذف (ReLeSR (STEMCELL #05873، سپس انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C. اضافه کردن محیط mTeSR و ضربه زدن به صفحات برای جدا کردن کلنی‌ها. ۴. برای جداسازی تک‌سلولی، تعلیق سلولی با پیپت مخلوط و با افزودن ۲۰ μM مهارکننده ROCK (Y-27632، Stemgent #S1049) در تعداد مورد نظر کشت داده شد.

۱۱.۲. کشت: hESC RSeT:: محیط کشت. (RSeT Medium (STEMCELL #05975):

شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO₂، ۵٪ O₂
پاساژدهی: سلول‌های اولیه زمانی که اندازه کلنی‌ها به حدود ۱۰۰ میکرومتر رسید به شرایط RSeT منتقل شدند. از این سلول‌ها طی ده پاساژ پس از تبدیل استفاده شد.
شرایط مکمل:

RSeT+DT: افزودن ۱۰ nM DZNep و ۵ nM TSA برای ۴۸ ساعت با تعویض محیط هر ۲۴ ساعت.
RSeT+eDT: افزودن ۵۰ nM DZNep و ۲۰ nM TSA برای ۴۸ ساعت.

۱۱.۳. کشت: MEF: منبع MEF:

های اولیه (پاساژ ۳) از مرکز ESC مؤسسه Lunenfeld-Tanenbaum بستر: صفحات پوشیده‌شده با ژلاتین ۰.۱٪
محیط کشت DMEM: با گلوکز بالا، GlutaMAX™، پیروات ۱۵٪، ۰.۱ mM اسیدهای آمینه ضروری، ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین-استرپتومایسین. استفاده MEF: های خوراکی‌دهنده ظرف ۴-۵ روز پس از ذوب استفاده شدند.

۱۱.۴. کشت ۴ CL و hESC: e4CL

تبدیل به ۴: CL
۱-۱.۵ x 10⁵ سلول hESC اولیه در صفحات ۶-چاهی پوشیده‌شده با MEF کشت داده شدند.
محیط mTeSR با ۱۰ μM Y-27632 پس از ۲۴ ساعت: تغییر محیط به 4CL Medium تغییر روزانه محیط. سلول‌ها طی ۳-۵ پاساژ استفاده شدند.

ترکیب محیط
۱:۱ مخلوط Neurobasal و Advanced DMEM/F12 همراه با مکمل‌های N2، B27، پیروات، اسیدهای آمینه، GlutaMAX، پنی‌سیلین-استرپتومایسین، ۱۰ nM DZNep، ۵ nM TSA، ۱ μM PD0325901، ۱۵ μM IWR-1، ۲۰ μM LIF، ۲۰ ng/mL ACTIVIN A، ۵۰ μg/mL اسید اسکوربیک، و ۰.۲٪ Geltrex.
تبدیل به: e4CL

۳ x 10⁵ سلول ۴ CL در محیط ۴ CL کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت: افزودن ۵۰ nM DZNep و ۲۰ nM TSA. ۵ روز کشت در محیط e4CL، سلول‌ها برای تحلیل پردازش شدند.

۱۱.۵. ایجاد خط سلولی hESC Cas9-KRAB

ساخت پلازمید: پلازمیدها براساس سیستم ترانسپوزون Sleeping-Beauty ساخته شدند.

مراحل: حذف توالی amaxaGFP از پلازمید (T2-CAG-amaxaGFP هدیه‌ای از آزمایشگاه Izsvák) با استفاده از آنزیم‌های AgeI و BglIII. جایگزینی با توالی الیگویی مصنوعی حاوی سایت‌های برش آنزیمی متعدد ۰.۳. افزودن توالی hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro از پلازمید pLV-hU6-sgRNA-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro (Addgene #71236) به پلازمید جدید، که اکنون بین تکرارهای معکوس/مستقیم Sleeping Beauty قرار دارد.

۱۱.۶. ترانسفکشن سلول‌های H9 hESC اولیه: مواد:

1.5 µg pT2-hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro. پلازمید
0.5 µg pCMV(CAT)T7-SB100X (ترانسپوزاز SB100X فعال، هدیه‌ای از آزمایشگاه Izsvák)
4 µl Lipofectamine Stem در ۲۰۰ µl Opti-MEM.
فرایند: مخلوط ترانسفکشن به چاهک‌های ۶-چاهی با $10^6 \times$ سلول منفرد اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط mTeSR تغییر داده شد و ۰.۳ µg/ml پورومايسين اضافه شد. پس از ۸ روز، کلنی‌ها جدا شده و به صفحات ۲۴-چاهی منتقل شدند. کلنی‌ها گسترش یافتند و برای مقاومت به پورومايسين و بیان پروتئين dCas9 تأیید شدند.

۱۲. طراحی siRNA، CRISPRi gRNA و ASO

۱۲.۱. طراحی ASO:

ASOهای LNA-gapmeR هدف‌گیری توالی L1HS LINE1 L1RP با استفاده از ابزارهای زیر طراحی شدند:
CRISPR-RT برای حذف اهداف خارج از توالی. جستجو در پایگاه BLASTN برای حذف اهداف ناخواسته. ۳. رتبه‌بندی براساس حفاظت در عناصر کامل LINE1 با استفاده از L1base. ۴. تطبیق با توصیه‌های طراحی LNA-GapmeR (QIAGEN).

۱۲.۱. طراحی siRNA:

siRNAهای هدف‌گیری TPRX1، TP53 و H3.XY براساس منابع معتبر انتخاب شدند. از siRNA کنترل غیرهدفمند (Dharmacon #D-001210-03) به عنوان کنترل استفاده شد.

۱۲.۲. طراحی CRISPRi gRNA:

gRNAهای هدف‌گیری ۵' UTR L1RP با استفاده از ابزارهای CRISPOR و CRISPick انتخاب شدند.
توالی‌های gRNA طراحی شده به پلازمید pGL3-U6-sgRNA-EGFP (Addgene #107721) کلون شدند.

۱۲.۳. ترانسفکشن الیگوها یا پلازمیدها روش

ASOها یا CRISPRi gRNA پلازمیدها: مواد 4 µl Lipofectamine Stem، ۲۵ nM ASO یا ۱ µg/ml پلازمید. در Opti-MEM به تعلیق سلولی $2.5-4 \times 10^5$ hESC سلول (اضافه شدند).
مکمل‌ها:

0.7 μ M Trans-ISRIB، 5 μ M Emricasan، 10 μ M Y-27632 برای افزایش کارایی و بقای سلول.
siRNAها:

40 nM siRNA به تنهایی یا همراه با 25 nM ASO با استفاده از DharmaFECT 1. مهار RNA پلی‌مراز: سلول‌های hESC RSeT در شرایط RSeT+DT قرار گرفتند. پس از 24 ساعت، 0.25 μ M BMH-21 اضافه شد (کنترل). DMSO: سلول‌ها پس از 8 ساعت برای ایمونوفلورسانس یا 24 ساعت برای استخراج RNA جمع‌آوری شدند.

۱۳. روش‌ها: مهار EZH2، خودتجدیدی، استخراج RNA، و تحلیل داده‌های RNA-Seq

مهار EZH2 کشت hESC: های RSeT در چاهک‌های ۱۲-چاهی با تراکم 8×10^4 سلول در هر چاهک. مکمل‌ها: تغییر محیط به RSeT+DT، RSeT+DT+UNC2400، RSeT+DT+UNC1999 یا RSeT+DT+UNC1999+TSA+RSeT غلظت نهایی UNC1999 و UNC2400: 2.5 μ M. جمع‌آوری: سلول‌ها پس از 48 ساعت برای استخراج RNA جمع‌آوری شدند.

۱۳.۱. آزمون‌های خودتجدیدی: کشت اولیه :

hESC های اولیه به صورت تک‌سلولی با تراکم 8×10^4 سلول در هر چاهک در صفحات ۱۲-چاهی پوشیده شده با ماتریزل. محیط کشت: استفاده از محیط Cloning مبتنی بر mTeSR با افزودن CloneR برای بهبود بقای سلول و تشکیل کلنی.

ترانسفکشن: مخلوط شامل 10 nM ASO، 1 μ l Lipofectamine Stem و 50 μ l Opti-MEM. اضافه کردن مخلوط 3 ساعت پس از کشت سلول. ارزیابی: پس از 6 روز، کلنی‌ها با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز (AP) Red Substrate (AP) رنگ‌آمیزی شدند. کلنی‌های مثبت AP به صورت دستی زیر میکروسکوپ شمارش شدند. hESC های RSeT و RSeT+DT: بقای سلول در تراکم‌های پایین دشوار است. مساحت کلنی‌ها با استفاده از ImageJ و تصاویر میکروسکوپی پس از 48 ساعت از ترانسفکشن ASO تحلیل شد.

۱۳.۲. استخراج RNA و qRT-PCR: جداسازی سلول‌های FAM+: FAM+

سلول‌های ترانسفکت شده با ASO های دارای برچسب FAM از طریق FACS جدا شدند. در شرایط RSeT+DT با کارایی ترانسفکشن (>80%) جداسازی FACS انجام نشد و سلول‌ها مستقیماً جمع‌آوری شدند. استخراج RNA: با استفاده از کیت‌های RNeasy Mini (QIAGEN) یا Direct-zol RNA Mini/Microprep (Zymo) همراه با هضم DNase. ساخت cDNA و qPCR: استفاده از SuperScript IV VILO Master Mix برای cDNA. تحلیل qPCR با PowerUp SYBR Green Master Mix و سیستم QuantStudio™ 5 نرمال‌سازی داده‌ها به ژن‌های مرجع (UBB) و/یا (GAPDH). تحلیل و نمایش داده‌ها با GraphPad Prism.

۱۳.۳ RNA-Seq و تحلیل داده‌ها: آماده‌سازی نمونه‌ها:

200-30 نانوگرم RNA با کیفیت بالا برای هر نمونه.
3-4 تکرار برای هر نمونه (مگر در موارد ذکر شده).
ساخت کتابخانه‌ها: استفاده از ماژول NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation و NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit.
ارزیابی کیفیت RNA و کتابخانه‌ها با Fragment Analyzer (Agilent).
توالی‌یابی: سیستم Illumina NextSeq500 با قرائت‌های تک‌طرفه 75bp.
تحلیل داده‌ها: کنترل کیفیت و برش داده‌ها با Trim Galore!.
TopHat2 شمارش ژن‌ها یا عناصر تکراری با FeatureCounts. فیلتر ژن‌های با مقادیر پایین $CPM \leq 0.2$ برای RSeT و RSeT+DT، $CPM \leq 0.5$ برای hESC‌های اولیه).
تحلیل بیان دیفرانسیلی با edgeR. نمایش نتایج با:
Volcano plots برای تغییرات بیان ژنی. نقشه‌های حرارتی با gplots. تحلیل MDS با limma.
تحلیل غنی‌سازی مجموعه‌های ژنی (GSEA) با fgsea. مقایسه تغییرات کروموزومی با استفاده از توابع R. ژن‌هایی با $adj.P < 0.05$ و $\log_2FC$ مطلق > 1.5 به عنوان افزایش/کاهش معنادار در نظر گرفته شدند.
روش‌ها: تحلیل داده‌های scRNA-Seq، LAD-Seq، و بررسی ژن‌های C8

۱۴. تحلیل ژن‌های مراحل جنینی

ایجاد مجموعه ژن‌ها: خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی avg.PKMR ژن‌های هر مرحله از جنین‌زایی با استفاده از داده‌های scRNA-seq (مطالعه) Yan et al. نرم‌افزار. (gplots خوشه‌های ژن برای مراحل یا تبارهای خاص مشخص شده و تحلیل شدند. ژن‌های C8 و Morulae از خوشه 8 cell_Morulae_1687 استخراج شدند:
فیلتر: $avg.PKMR > 20$;
ژن‌ها: $avg.PKMR (8cell / Morulae) > 1.5$;
Morulae ژن‌ها: $avg.PKMR (Morulae / 8cell) > 1.5$;
تحلیل زیرخانواده‌های LINE1 و ژن‌های کدکننده پروتئین: داده‌های RNA-seq بالک از Hendrickson et al. با استفاده از edgeR تحلیل شد. نرمال‌سازی داده‌ها با محاسبه فاکتورهای نرمال‌سازی و تولید مقادیر نرمال‌شده برای عناصر تکراری.

۱۵. توالی‌یابی و تحلیل scRNA

جداسازی سلول‌ها:
100,000 سلول FAM+ (SO-L1) یا ASO-L1 به HBSS+2% FBS در یخ منتقل شدند.
سلول‌ها سانتریفیوژ، بازتعلیق، و بلافاصله روی پلتفرم ۱۰ Genomics Chromium x پردازش شدند. هدف: ~12,000 سلول در هر نمونه.
توالی‌یابی: کتابخانه‌ها با Illumina NovaSeq6000 توالی‌یابی شدند:
ASO-L1: قرائت/سلول ~94,000.

SO-L1: ~50,000 قرائت/سلول.

پردازش داده‌ها: تطابق با ژنوم مرجع انسانی (GRCh38) با Cell Ranger v7.1.0.

حذف سلول‌ها: ژن‌های کمتر از ۵۰۰۰. بیش از ۱۰۰,۰۰۰ UMIs

UMIs میتوکندریایی. ۱۵٪ > نرمال‌سازی با Seurat v4 SCTransform. خوشه‌بندی و تجسم با FindClusters و RunUMAP.

پروژکشن به داده‌های جنینی: نرمال‌سازی داده‌های جنینی و شناسایی ۳۰۰۰ ژن متغیر برتر. استفاده از hESC. FindTransferAnchors برای اتصال به داده‌های.

تحلیل غنی‌سازی مسیرها: مجموعه ژن‌های افزایش‌یافته پس از LINE1 KD با Enricher تحلیل شد: پیش‌بینی غنی‌سازی بالا برای مسیرهایی مانند p53 یا اهداف PRC2. تجسم داده‌ها در UMAP. LAD-Seq:

آماده‌سازی نمونه‌ها: ۳ تکرار زیستی برای هر نمونه. از pA-DamID و آنتی‌بادی LMNB1 (Abcam # ab16048) استفاده شد.

استخراج: DNA با کیت ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline).

آماده‌سازی کتابخانه: با استفاده از پروتکل DamID-seq، بدون هضم DpnII برای واکنش pA-Dam. تخلیص محصولات

Fragment Analyzer (Agilent). PCR با AMPure XP beads و ارزیابی با

توالی‌یابی: توالی‌یابی انتهای تک ۱۰۰ bp با Illumina HiSeq2500 و ۱٪ PhiX spike-in.

نتیجه‌گیری: روش‌ها شامل تحلیل داده‌های scRNA-Seq، LAD-Seq، و غنی‌سازی ژن‌های ۸ C است. این تکنیک‌ها نقش ژن‌ها و مسیرهای خاص را در تنظیم حالت ۸ C و سرکوب آن توسط LINE1 RNA بررسی می‌کنند.

۱۶. روش‌ها: NAD-Seq، تحلیل داده‌های LAD و NAD، CLIP-qPCR و ایمونوفلورسانس-NAD (IF) Seq

آماده‌سازی نمونه‌ها: ۳ تکرار زیستی برای هر نمونه. جداسازی هسته‌های نوکلئولوس با روش اتصال‌دهی عرضی (Crosslinking) با استفاده از دستگاه Misonix XL-2000.

DNA نوکلئولوس (NF-DNA) و DNA کل سلول (WC-DNA) با استفاده از ست NucleoBond AGX-20

استخراج شد. ارزیابی غنی‌سازی نوکلئولوس با qPCR پرایمرها در جدول (S1).

ساخت کتابخانه: از کیت TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation (Illumina) استفاده شد. قطعات ۳۵۰

bp توسط سونیکاسیون جدا و با AMPure انتخاب شدند. توالی‌یابی ۱۵۰ bp جفت‌شده روی دستگاه Illumina NovaSeq6000 انجام شد.

۱۷. تحلیل داده‌های LAD-Seq و NAD-Seq

تطابق و پردازش اولیه: فایل‌های خام توالی‌یابی با ابزار bwa به ژنوم مرجع انسانی (GRCh38) تطبیق داده شدند. فیلتر کردن داده‌ها با samtools برای خوانش‌های با کیفیت بالا.

تشخیص پیک‌ها: پیک‌های LAD و NAD با استفاده از ابزار epic2 شناسایی شدند. تنظیمات:

LAD: bin_size=10000, gap=10.

NAD: bin_size=10000, gap=5.

پیک‌هایی که در حداقل دو تکرار زیستی مشاهده شدند، برای تحلیل نهایی انتخاب شدند. تحلیل‌های نهایی: داده‌ها به مرورگر ژنومی UCSC بارگذاری شدند. نسبت طول پوشش LAD و NAD در هر کروموزوم محاسبه شد. غنی‌سازی LINE1 و سایر عناصر تکراری با استفاده از bedtools و مقایسه با مجموعه‌های DNA تصادفی بررسی شد.

۱۸. CLIP-qPCR

آماده‌سازی سلول‌ها:

hESC‌های RSeT+DT با PBS شسته شدند و با UV به شدت 400 mJ/cm^2 متصل شدند. استخراج هسته با پروتکل استاندارد Abcam انجام شد. ایمونواسیتیرسیپیتاسیون: RNA آنتی‌بادی‌های نوکلئولین (NCL)، LaminB1 یا Rabbit-IgG با داینابیدهای پروتئین A پیوند داده شدند. استخراج RNA با استفاده از Trizol و روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام شد. RNA به دست آمده با استفاده از کیت RNeasy Mini (QIAGEN) تصفیه شد. qPCR: RNA تصفیه شده برای تولید cDNA و تحلیل qRT-PCR استفاده شد. پرایمرها در جدول S1 ارائه شده‌اند.

۱۹. ایمونوفلورسانس (IF)

آماده‌سازی نمونه‌ها: پوشش‌های استریل در صفحات ۱۲-چاهی قرار داده شدند و با ماتریژل پوشیده شدند. hESC‌ها به مدت ۲ روز پس از کشت با PBS شسته و در ۴٪ پارافرمالدهید به مدت ۸ دقیقه ثابت شدند. رنگ‌آمیزی: نفوذپذیری با ۰.۲٪ Triton X-100 در PBS به مدت ۲ دقیقه روی یخ انجام شد. مسدودسازی با PBS-T + 10% BSA + 1% سرم الاغ. انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه و شستشو با PBS-T. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های ثانویه (جدول S3) و انکوباسیون با VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium حاوی DAPI. ثبت تصاویر: پوشش‌ها روی اسلایدها قرار گرفتند و با لاک ناخن مهر و موم شدند.

۲۰. روش‌های RNA-FISH، RNA-FISH/IF، DNA-FISH/IF

۲۰.۱. تصاویر IF و RNA-FISH

بیشتر تصاویر IF با میکروسکوپ Andor BC43 Benchtop Confocal گرفته شده‌اند، به جز موارد خاص مانند H3.XY و TPRX1. RNA-FISH و RNA-FISH/IF مراحل زیر را طی کردند:

۲۰.۲. RNA-FISH

آماده‌سازی نمونه‌ها: سلول‌ها روی پوشش‌ها کشت داده شدند و در ۴٪ پارافرمالدهید (PFA) به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شدند. پوشش‌ها در ۷۰٪ اتانول ذخیره شدند.

هیبریداسیون: RNA سلول‌ها در محلول بافر شستشوی RNA (WB) بازآبرسانی شدند. نمونه‌ها در بافر هیبریداسیون حاوی پروب RNA به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار

گرفتند.

پس از هیبریداسیون: پوشش‌ها شسته و با VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium همراه با DAPI نصب شدند.

۲۰۲. RNA-FISH و IF مشترک

هیبریداسیون همراه با آنتی‌بادی: آنتی‌بادی‌های اولیه به بافر هیبریداسیون با پروب RNA اضافه شدند. نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک شب در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مراحل پس از رنگ‌آمیزی: پوشش‌ها با آنتی‌بادی ثانویه (۱:۲۰۰) و سپس با RNaseOUT انکوبه شدند. نمونه‌ها مانند روش RNA-FISH معمولی آماده‌سازی شدند.

۲۰۳. DNA-FISH/IF

تولید پروب: DNA-FISH پروب‌ها از BACs یا پلاسمید LINE1 تولید شدند. DNA پلاسمید به کمک ترجمه نیک با DNase I و DNA Polymerase I آماده شد. پوشش و آماده‌سازی سلول: سلول‌ها روی Poly-Prep Slides پوشش داده شده با Matrigel کشت شدند. مراحل ثابت‌سازی، نفوذپذیری، و شستشو طبق روش استاندارد انجام شد. رنگ‌آمیزی: DNA-FISH/IF سلول‌ها پس از نفوذپذیری با آنتی‌بادی اولیه (۱:۱۰۰) و ثانویه (۱:۲۰۰) انکوبه شدند. مراحل آماده‌سازی DNA-FISH شامل استفاده از پروب‌های DNA و شستشوی دقیق بود. پروب‌ها: طراحی و ساخت توسط Stellaris، رنگ‌آمیزی و نشانه‌گذاری فلورسانسی برای بررسی‌های دقیق. ترکیب‌های پروب: DNA-FISH ترکیب‌های پروب DNA-FISH مطابق با روش توصیف‌شده توسط Bolland و همکاران (ارجاع ۹۳) در مراحل نفوذپذیری سلول و ایمونوفلورسانس (IF) آماده شدند. مخلوط پروب کروموزوم ۱۹ (Creative Bioarray # FWCP-19) تحت تیمار با دناتوراسیون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و سپس مستقیماً مطابق دستورالعمل سازنده به اسلایدها اضافه شد.

وقتی سلول‌ها و پروب‌ها آماده شدند، اسلایدها با استفاده از گوش‌پاک‌کن تخلیه شدند و بلافاصله با ۱۰ میکرولیتر از مخلوط پروب که از قبل روی کاوراسل ریخته شده بود، پوشانده شدند. پس از مهر و موم کردن کاوراسل‌ها با چسب لاستیکی (Marabu Fixogum)، اسلایدها به مدت ۲ دقیقه روی صفحه گرم‌کن با دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد گرم شدند. سپس اسلایدها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک محفظه تاریک و مرطوب انکوبه شدند. روز بعد، اسلایدها تحت مجموعه‌ای از مراحل شستشو مطابق با پروتکل توصیف‌شده توسط Bolland و همکاران (ارجاع ۹۳) قرار گرفتند و سپس با محیط تثبیت‌کننده VECTASHIELD® همراه با DAPI نصب شدند. اسلایدها برای حداقل ۱ ساعت در دمای اتاق نگه داشته شدند و سپس با لاک ناخن مهر و موم شدند. تصاویر DNA-FISH و هم‌نشانی IF با استفاده از میکروسکوپ کنفوکال Andor BC43 گرفته شد.

۲۰۴. کمی‌سازی تصاویر

برای کمی‌سازی شدت سیگنال، اندازه نواحی و فاصله‌ها، از نرم‌افزار ImageJ استفاده شد. نواحی هسته یا نوکلئولوس به صورت



دستی بر اساس سیگنال DAPI یا NCL/B23 ترسیم شدند. کمی‌سازی تعداد نقاط LINE1 در هر سلول با آستانه ۵ مطابق با روش منتشر شده برای RNA-FISH انجام شد. (ارجاع ۹۷) تصاویر DNA-FISH/IF با استفاده از نرم‌افزار Imaris تجزیه و تحلیل شدند. کروموزوم ۱۹، NCL نوکلئولوس، DAPI (هسته) و مکان‌های DNA-TPRX1 با استفاده از عملکرد "Create Surface" در Imaris بازسازی سه‌بعدی شدند تا نواحی و مکان‌های آن‌ها شناسایی شده و حجم‌های هم‌پوشانی آن‌ها محاسبه شود.

۲۰.۵. اطلاعات تکمیلی: (Supplemental Information)

جدول S1: توالی‌های ASO ها، siRNA ها، CRISPRi-gRNA ها، پرایمرها و الیگوهای آداپتور استفاده شده در این مطالعه.
جدول S2: مجموعه ژن‌هایی که در این مطالعه استفاده شدند.
جدول S3: آنتی‌بادی‌های استفاده شده برای ایمونوفلورسانس (IF) و Cross-Linking Immunoprecipitation (CLIP).
جدول S4: توالی‌های پروب‌های RNA-FISH و فهرست پلاسمیدهای پروب‌های DNA-FISH.

مراجع

1. Braude, P., Bolton, V., and Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight cell stage of preimplantation development. *Nature*, 332(6163), 459-461.
2. Taubenschmid, J., Stowers, J., Rostovskaya, M., Santos, F., Ljung, S., Argelaguet, R., Krueger, F., Nichols, J., and Reik, W. (2022). 8C-like cells capture the human zygotic genome activation program in vitro. *cell stem cell*, 29, 449-456.
3. Mazid, M.A., Ward, C., Luo, Z., Liu, C., Li, Y., Lai, Y., Wu, L., Li, J., Jia, W., Jiang, Y., et al. (2022) Rolling Back human pluripotent stem cells to and eight- cell embryo- like stage. *Nature*, 605, 315-324.
4. Yu, X., Liang, S., Chen, M., Yu, H., Li, R., Qu, Y., Kong, X., Guo, R., Zheng, R., Izsvák, Z., et al. (2022). Recapitulating early human development with 8C- like cells, 39, 110994.
5. Moya-Jodar, M., Ullate-Agote, A., Barlabe, P., Rodriguez-Madoz, J.R., Abizanda, G., Barreda, C., Carvajal-Vergara, X., Vilas-Zornoza, A., Romero, J.P., Garate, L., et al. (2023) revealing cell population catching the early stages of human embryo development in naive pluri potent stem cell cultures. *Stem Cell reports*, 18, 64-80.
6. Zou, Z., Zhang, C., Wang, Q., Hou, Z., Xiong, Z., Kong, F., Wang, Q., Song, J., Liu, B., Liu, B., et al. (2022). Translatome and transcriptome co-profiling reveals a role of TPRXs in human zygotic genome activation. *science*. 378, abo7923.