

*СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ*

Прохорович Мария Александровна

*Хромосомные аномалии в эмбриональных стволовых
клетках человека hESM01-04*

*Научный руководитель
д. б. н. Рубцов Николай Борисович*

Новосибирск – 2008

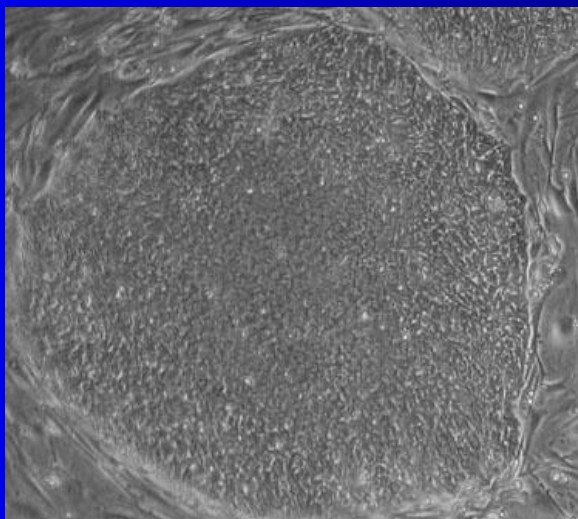
Цель работы:

оценить стабильность кариотипа эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека в процессе культивирования и определить характеристики, по которым ЭСК с выявленными хромосомными перестройками отличаются от клеток исходных линий.

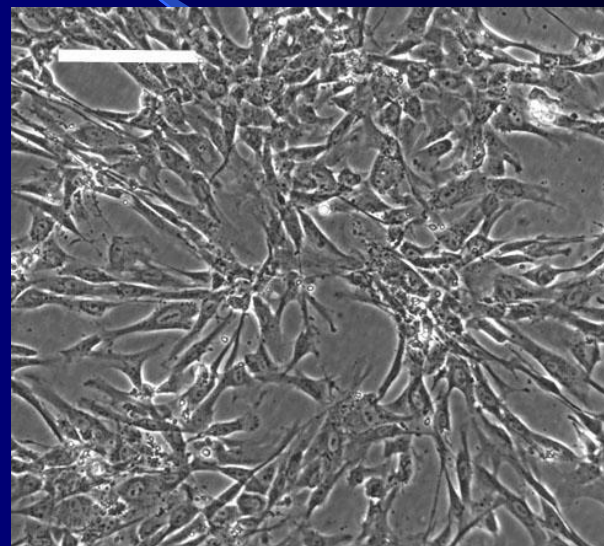
Задачи:

- 1) провести цитогенетический анализ эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека четырёх линий – hESM01, hESM02, hESM03 и hESM04 – в процессе культивирования;*
- 2) провести молекулярно-цитогенетический анализ состава и организации выявленных перестроенных хромосом;*
- 3) получить и охарактеризовать дифференцированные клетки из ЭСК с нормальным кариотипом, а также из ЭСК, несущих выявленные аномальные хромосомы;*
- 4) провести сравнительный анализ характеристик ЭСК исходных линий hESM01-04 и ЭСК, несущих аномальные хромосомы;*
- 5) разработать метод одновременной визуализации и идентификации хромосомных территорий перестроенной хромосомы и её нормального гомолога в трёхмерном пространстве интерфазного ядра ЭСК, несущих выявленные аномальные хромосомы;*
- 6) провести оценку влияния хромосомных перестроек на положение хромосом в интерфазных ядрах ЭСК, несущих выявленные аномальные хромосомы.*

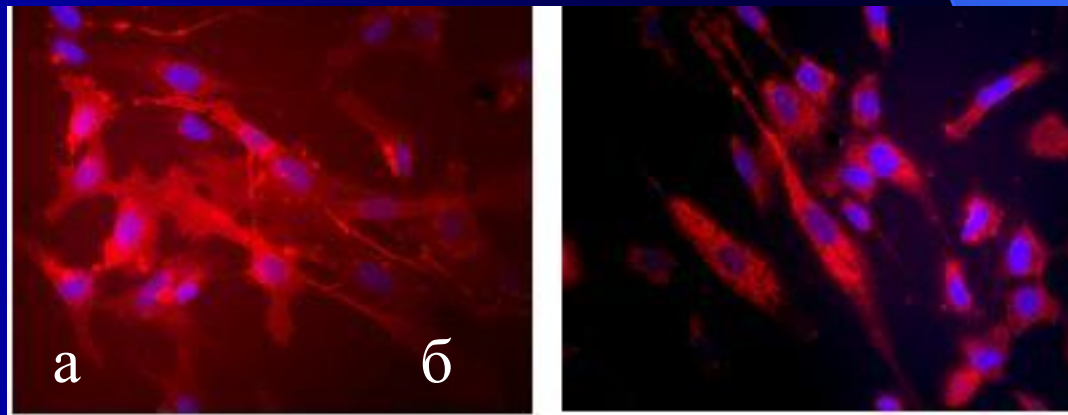
*Общий вид колонии
hESM01*



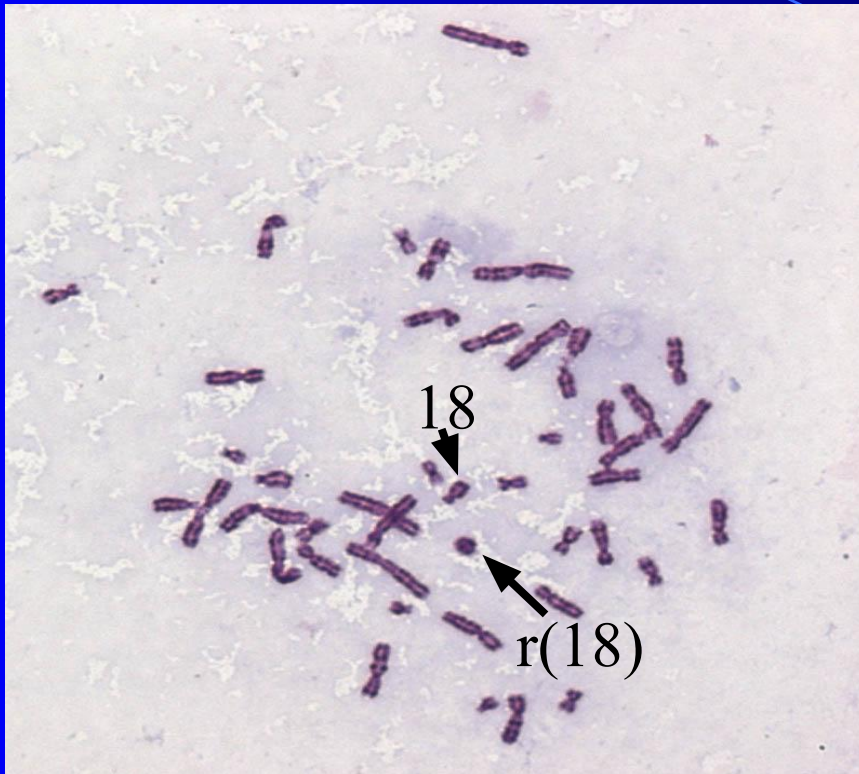
*Фибробластоподобные
производные клеток
hESM01*



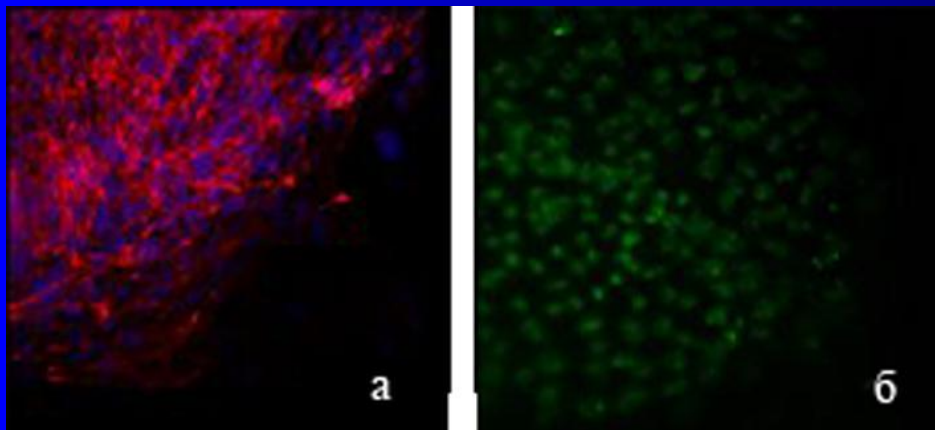
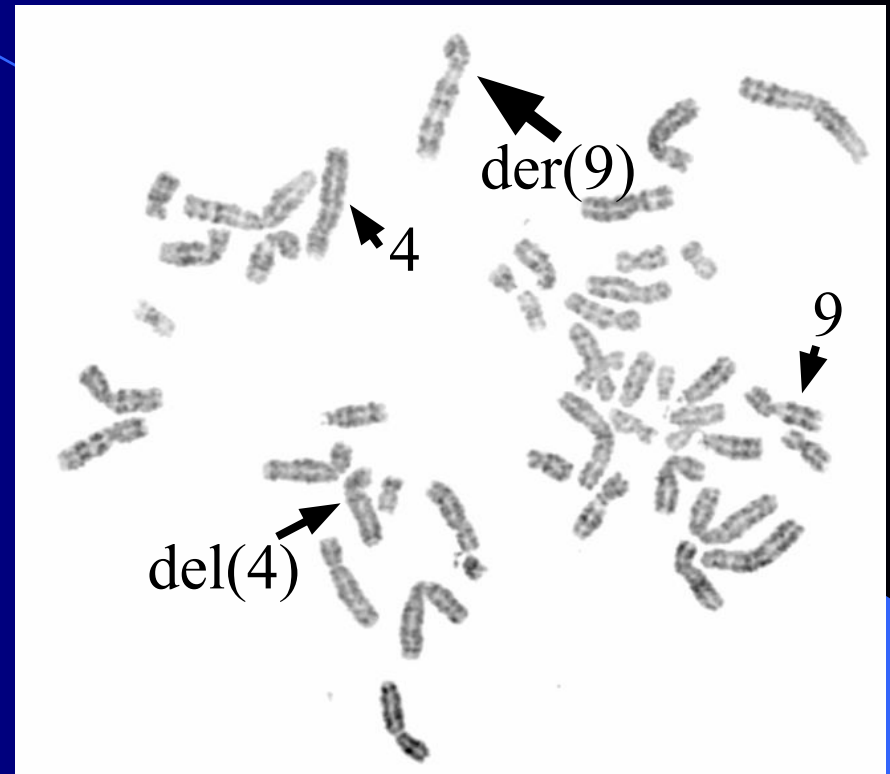
*Результаты
иммуноокрашивания
дифференцированных
клеток с помощью антител
против **CD105** (а), **пролил-
гидроксилазы** (б);
ядра окрашены **DAPI** –
синий цвет.*



Сублиния *hESM01r18*.
46, XX, r(18)



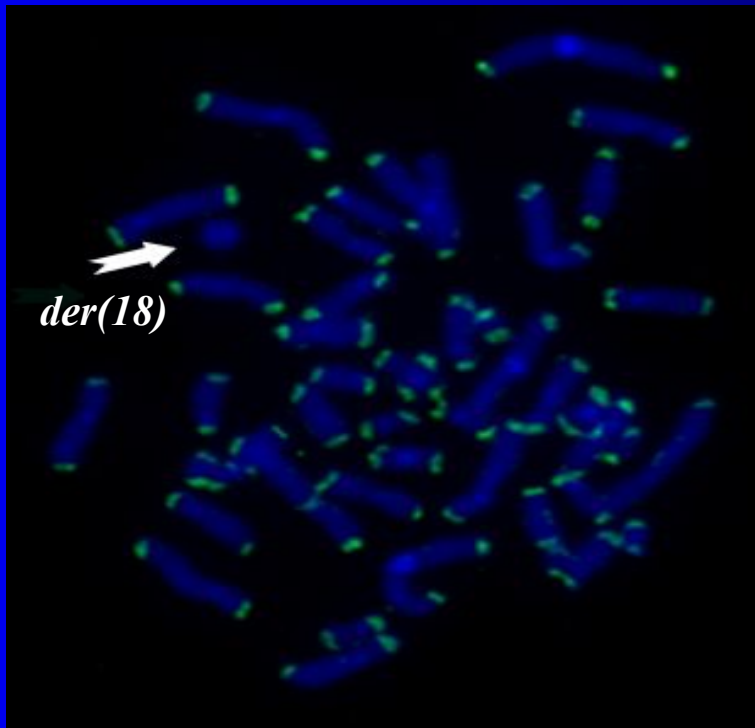
Сублиния *hESM03der9*.
46, XX, del(4),der(9)



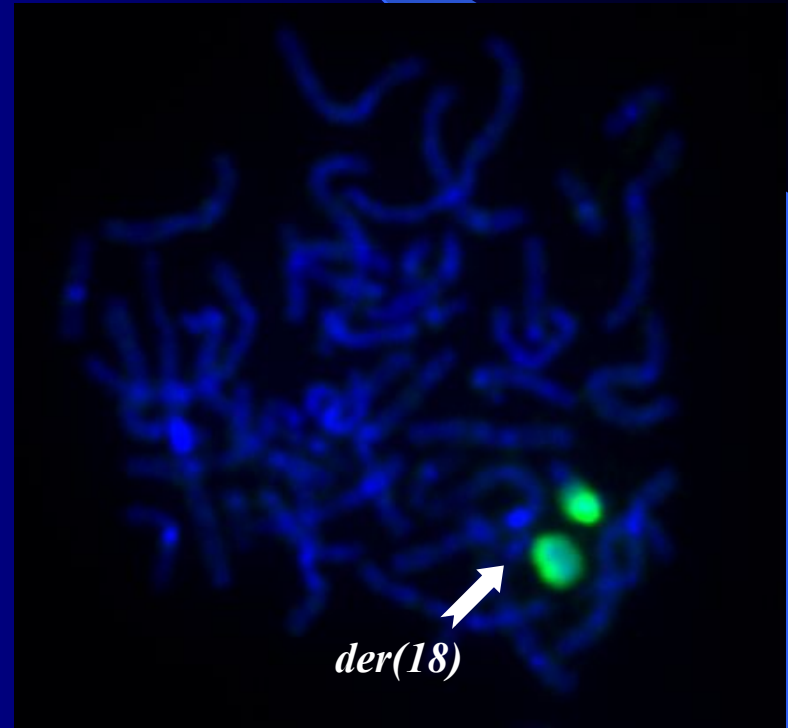
Иммуноокрашивание клеток *hESM01r18*.
На фотографиях «а» и «б»
представлены фрагменты колоний.
а – **Tra-1-60** – красный сигнал, ядра
окрашены *DAPI* – синий цвет;
б – **OCT4** – зелёный сигнал.

Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии ESM01r18

*FISH теломерной
ДНК пробы с хромосомами
клеток сублинии ESM01r18*

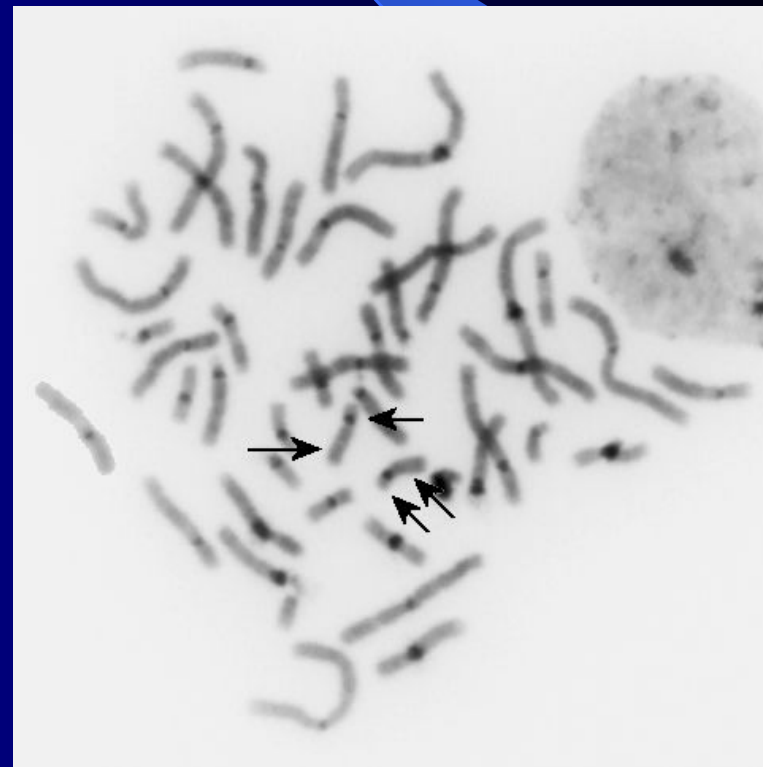
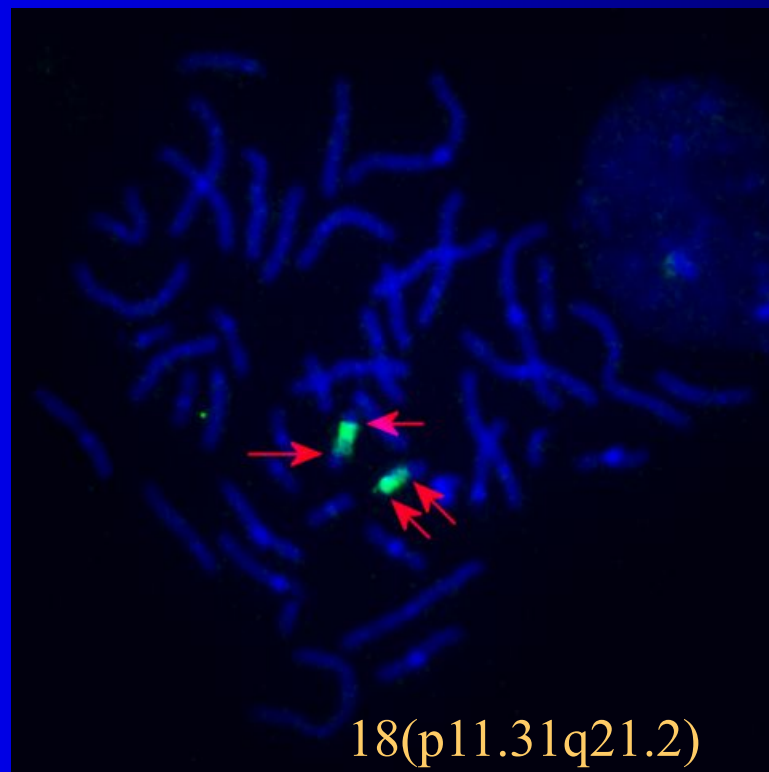


*FISH микродиссекционной
ДНК пробы der(18) с хромосомами
клеток сублинии hESM01r18*



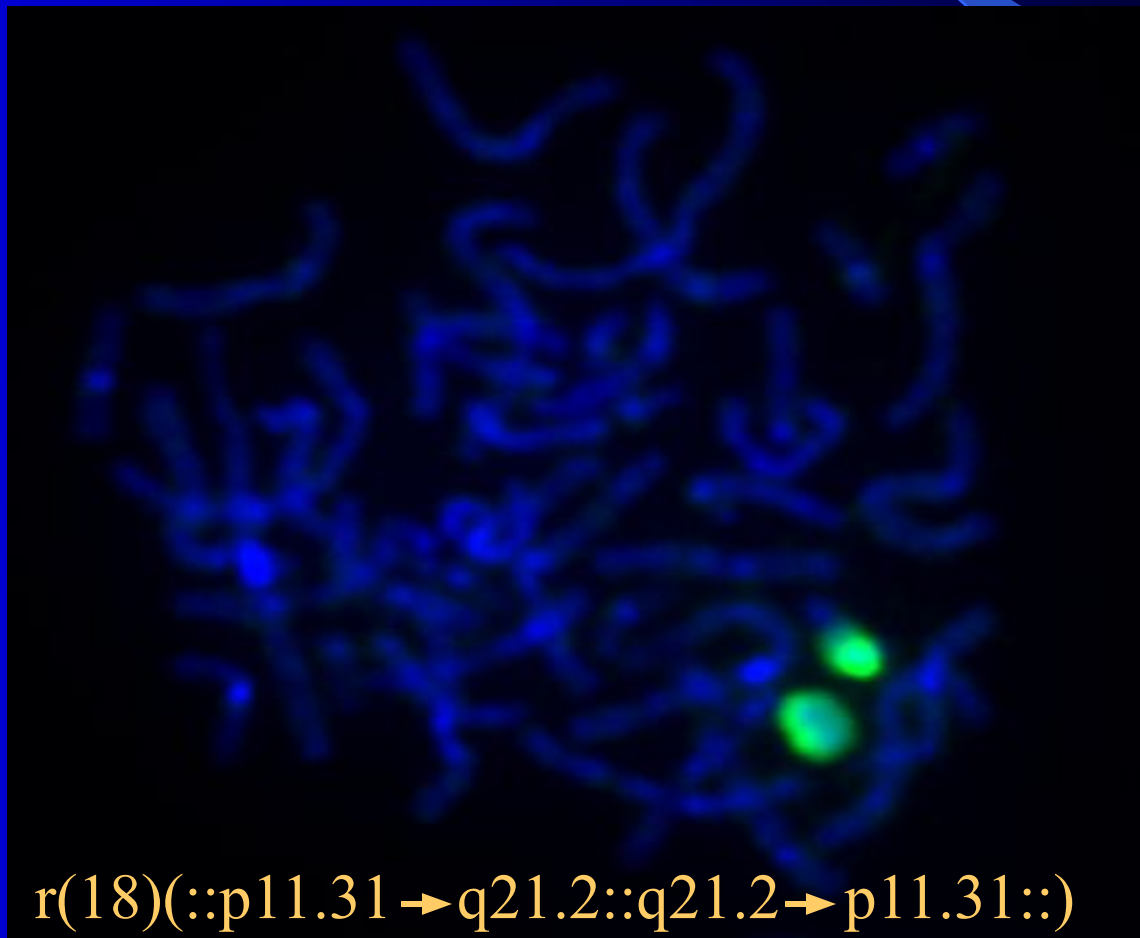
Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии ESM01r18

FISH микродиссекционной ДНК пробы *der(18)* с метафазными хромосомами лимфоцитов взрослого человека с нормальным кариотипом



Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии hESM01r18

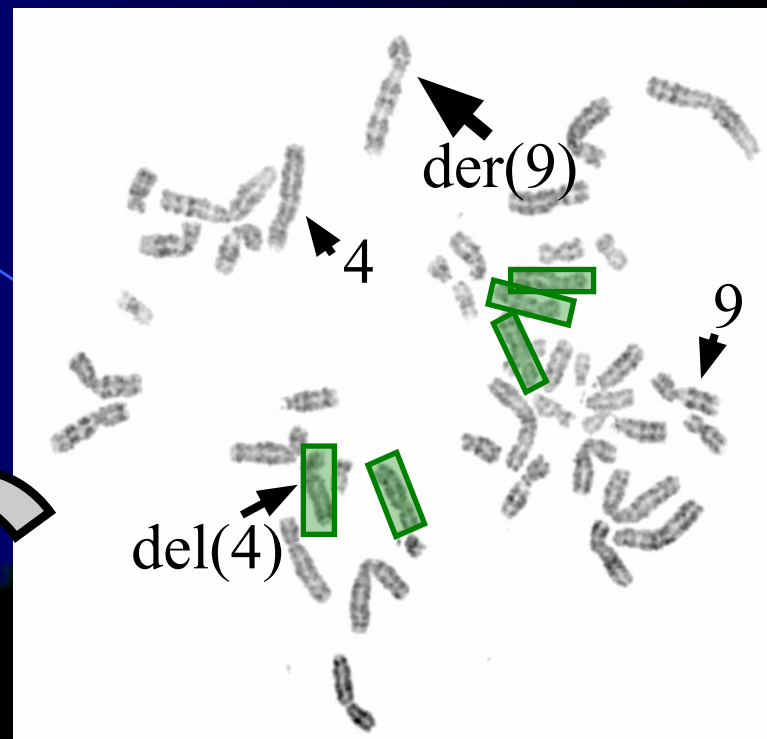
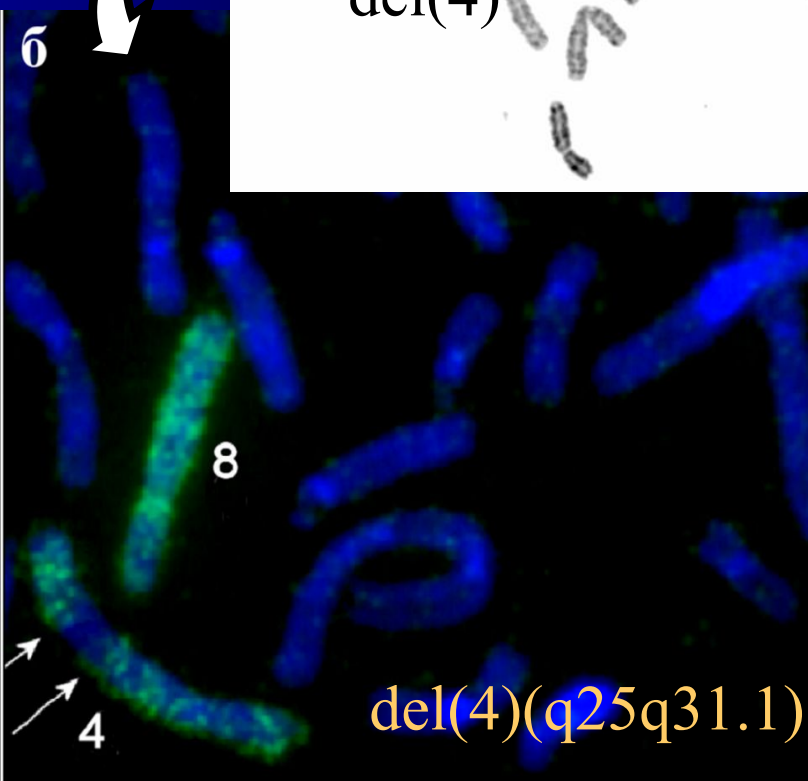
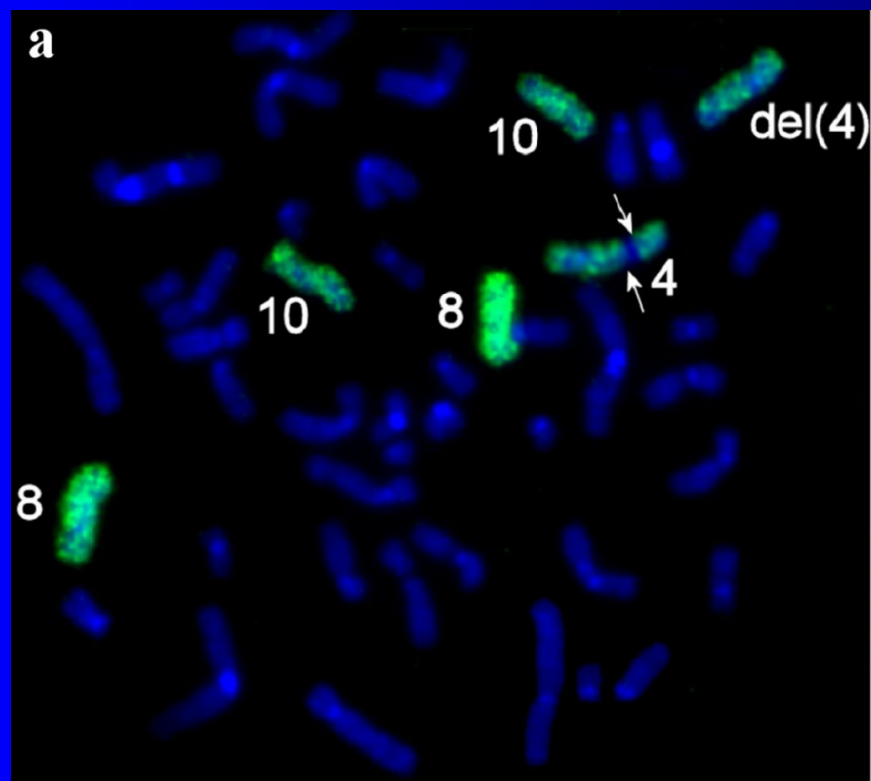
*FISH микродиссекционной ДНК пробы der(18) с хромосомами
клеток сублинии hESM01r18*



Реорганизация хромосомы 4 в клетках сублинии *hESM03der9*

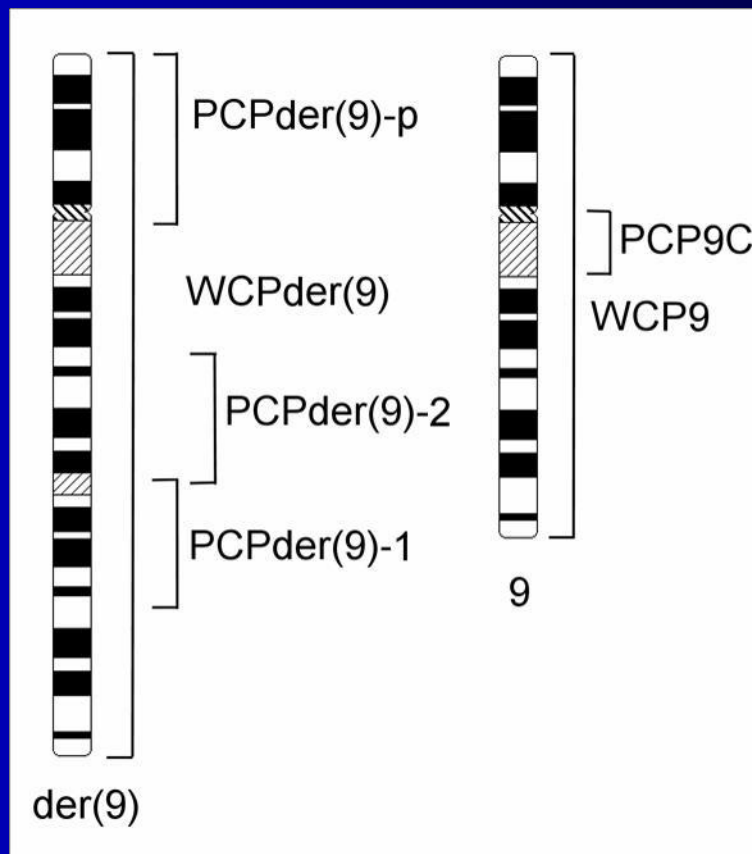
FISH микродиссекционной комбинированной
ДНК пробы *del(4)*

а - с хромосомами клеток сублинии *hESM03der9*;
б - с хромосомами лимфоцитов здорового донора
(фрагмент пластинки).



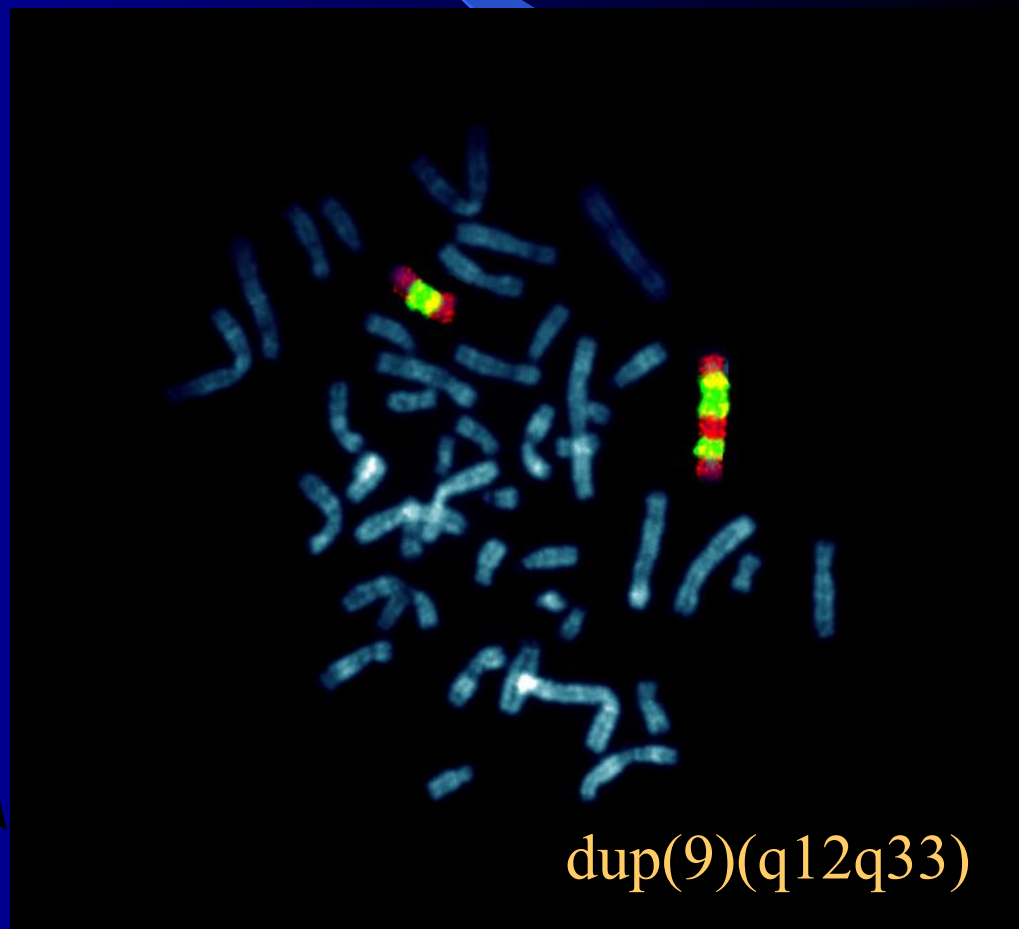
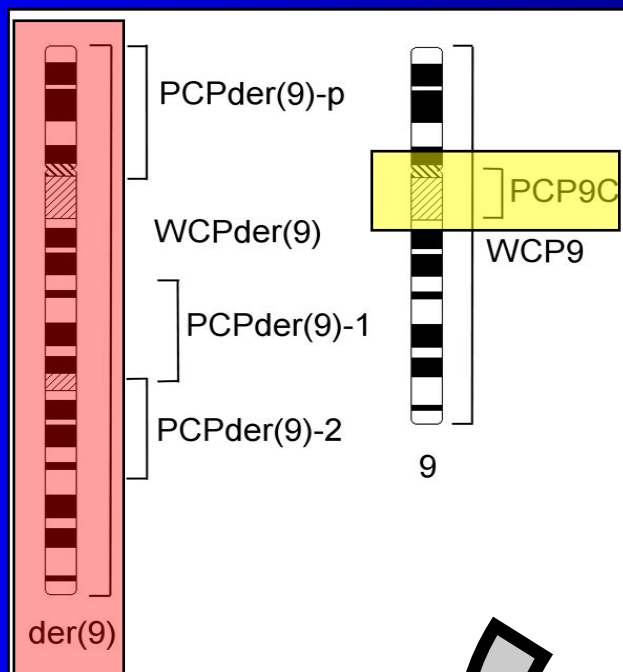
Реорганизация хромосомы 9 в клетках сублинии hESM03der9

Схема микродиссекции нормальной хромосомы 9 и der(9) для получения хромосомоспецифичных проб WCP9 и WCPder(9), а также районспецифичных проб PCPder(9)-p, PCPder(9)-1, PCPder(9)-2 и центромерной пробы PCPC



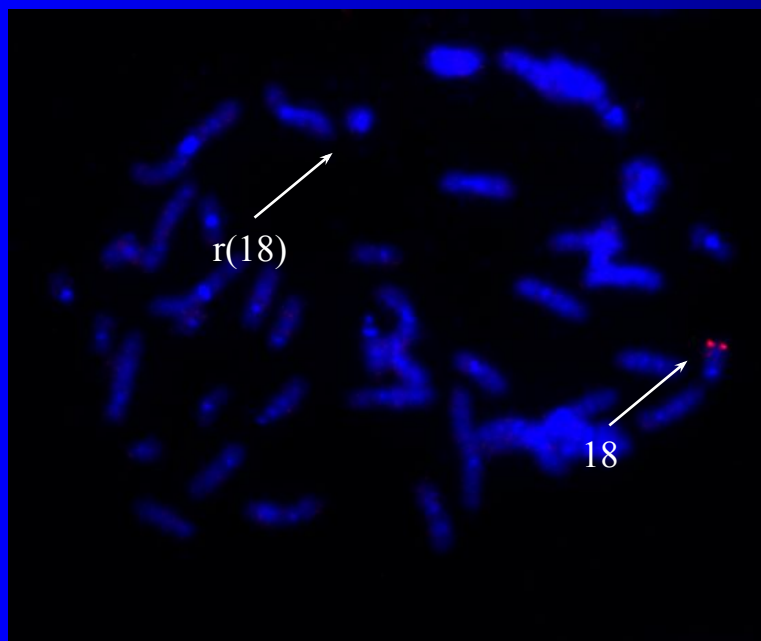
Реорганизация хромосомы 9 в клетках сублинии hESM03der9

FISH хромосомспецифичной WCPder(9) (красный цвет) и прицентромерной PCP9C (жёлтый цвет) микродиссекционных ДНК проб с хромосомами клеток сублинии hESM03der9.

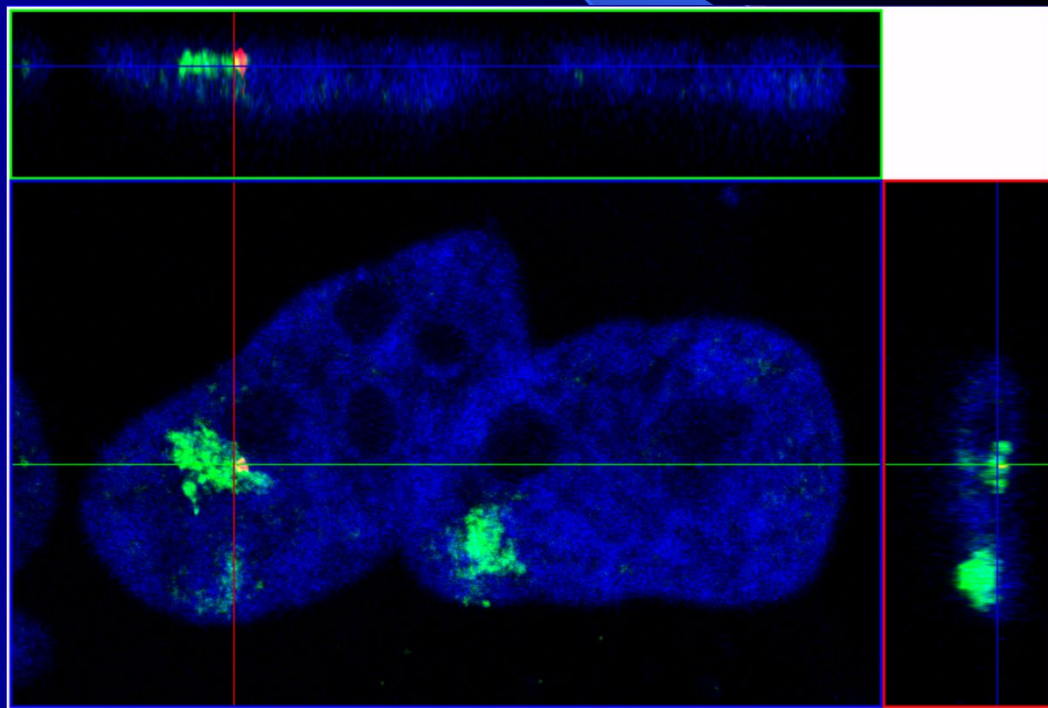


Визуализация и идентификация хромосомных территорий хромосомы 18 и её деривата

*FISH с хромосомами клеток сублинии hESM01r18 **ДНК** пробы, приготовленной на базе клонированного фрагмента ДНК из района делеции.*



*Совместная 3D FISH **ДНК** пробы, маркирующей нормальный гомолог хромосомы 18, и **хромосомоспецифичной пробы WCP18**, окрашивающей хромосомные территории хромосомы 18 и её деривата. Ядра окрашены DAPI – синий цвет.*



Оптические срезы двух ядер (три проекции).

Трёхмерная реконструкция хромосомных территорий хромосом 18 и r18 в ядрах клеток hESM01r18

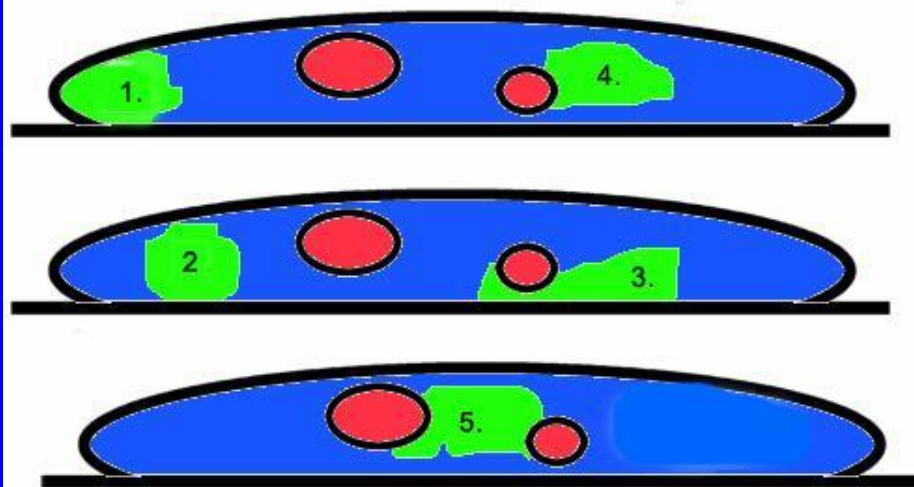
Совместная 3D FISH ДНК пробы, маркирующей нормальный гомолог хромосомы 18, и хромосомоспецифичной пробы WCP18, окрашивающей хромосомные территории хромосомы 18 и её деривата. Ядра окрашены DAPI – синий цвет.



Серии оптических срезов.

Локализация хромосомных территорий хромосом 18 и r(18) в клетках сублинии hESM01r18

Пять различных вариантов расположения хромосомной территории в ядре



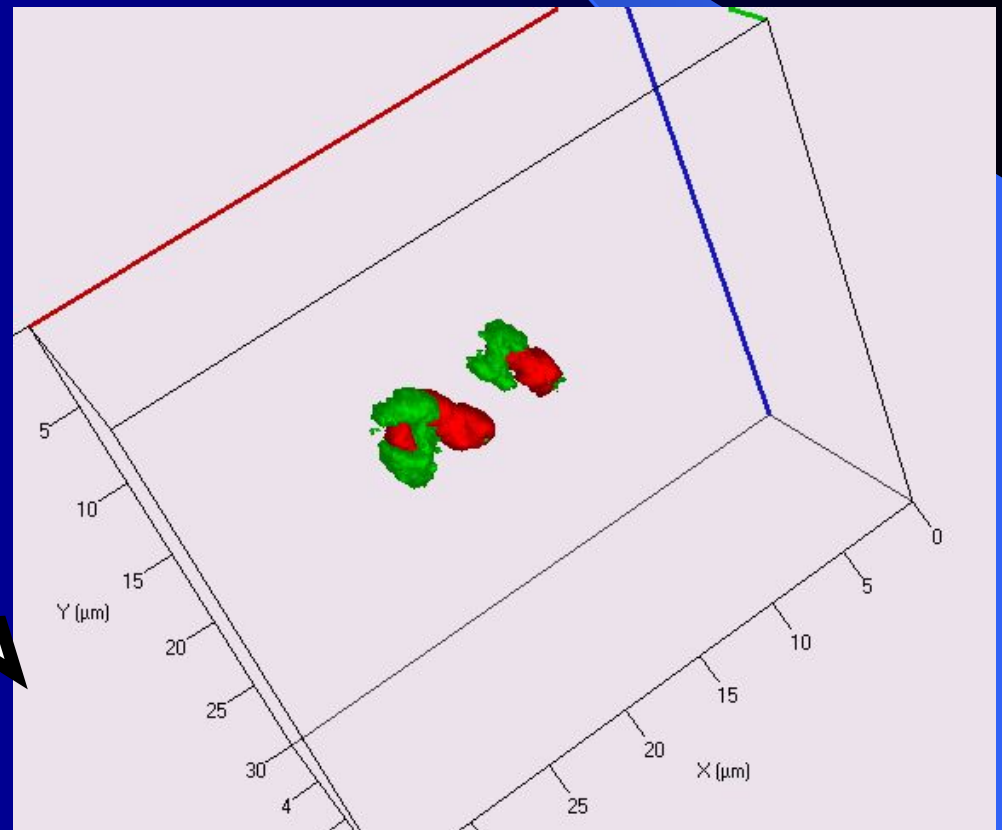
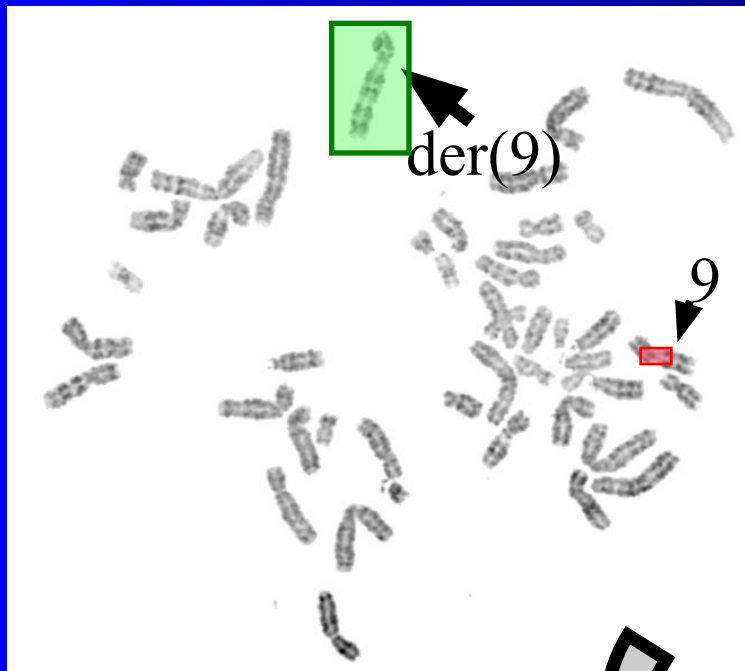
1. Хромосомная территории лежит в периферической области ядра с трёх сторон.
2. Хромосомная территории лежит в периферической области ядра с двух сторон.
3. Хромосомная территория касается ядрышка и лежит в периферической области ядра.
4. Хромосомная территория касается ядрышка.
5. Хромосомная территория касается двух ядрышек.

Зелёным цветом обозначены хромосомные территории
Красным цветом обозначены ядрышки

локализация	1	2	3	4	5
хромосомная территория					
хромосома 18 (нормальный гомолог)	10	19	56	2	3
хромосома r(18) (кольцевой дериват)	16	35	34	5	0

**3D реконструкция хромосомы 9 и её деривата
в пространстве интерфазного ядра клетки сублинии hESM03der9**

**3D FISH хромосомоспецифичной WCPder(9) (зелёный цвет) и
прицентромерной PCP9C (красный цвет) ДНК проб с ядрами ESM03der9.**



Выводы

- 1) Получены две сублинии ЭСК, отягощённые хромосомными перестройками, в то же время показано, что при проведении регулярного мониторинга состояния кариотипа возможно проведение длительного культивирования клеток hESM01-04, не сопровождающееся тотальной дестабилизацией кариотипа.
- 2) Детально охарактеризованы выявленные аномальные хромосомы, являвшиеся производными хромосом 4, 9 и 18, с помощью полученного комплекта микродиссекционных проб.
- 3) Показано, что, несмотря на сохранение «маркёров плюрипотентности», способности к дифференцировке ЭСК, отягощённых выявленными хромосомными аномалиями, снижены по сравнению с клетками исходных линий hESM01-04.

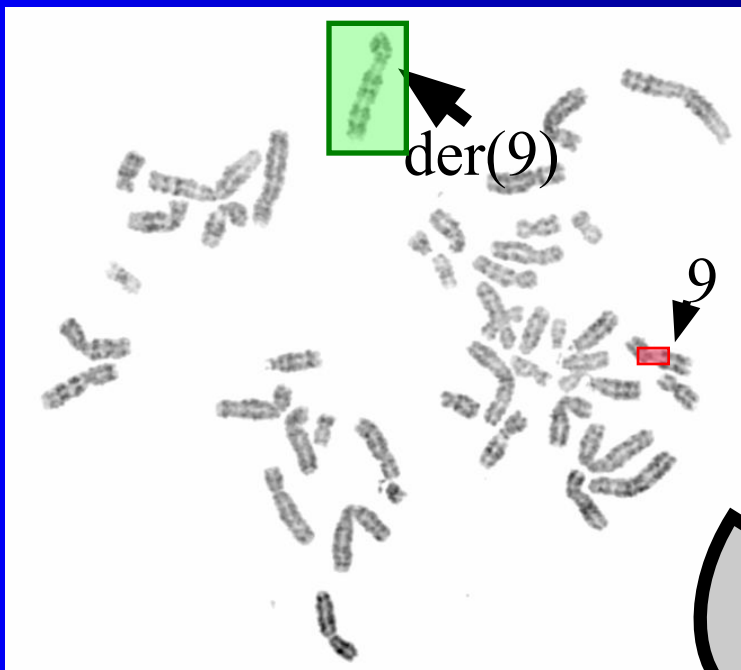
Выводы

- 4) Разработан метод одновременной визуализации и идентификации хромосомных территорий хромосомы 18 и её деривата в клетках hESM01r18, хромосомы 9 и её деривата в клетках hESM03der9.
- 5) На примере хромосомных территорий хромосом r18 и её нормального гомолога показано, что хромосомная перестройка сопровождалась изменением локализации перестроенной хромосомы по сравнению с локализацией её нормального гомолога относительно периферической области ядра и ядрышек. На примере аномалии хромосомы 9 в клетках hESM03der9 и их дифференцированных производных показано, что дублицированный район, содержащий последовательности, гомологичные прицентромерным повторам, локализуется предпочтительно в периферической области ядра, также как и прицентромерные районы хромосом 9 и её деривата.

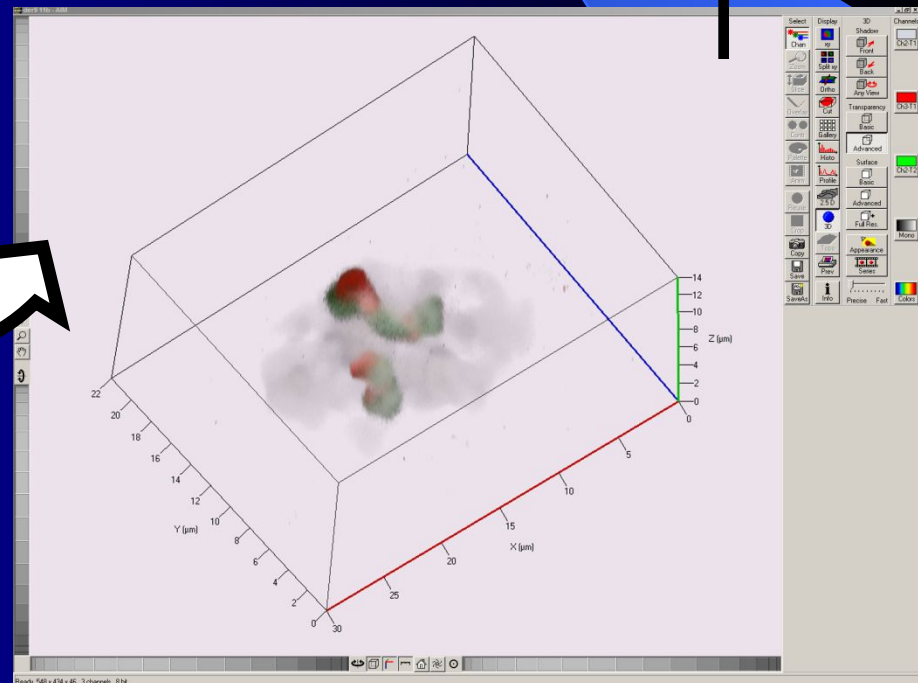
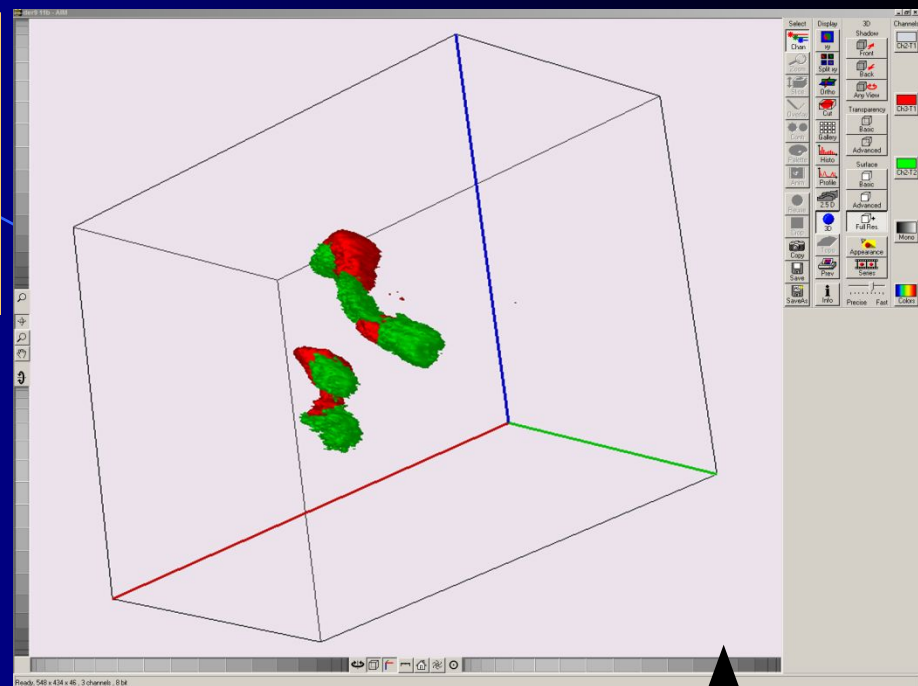
The background is a solid dark blue. A thin, light blue curved line starts from the top left and arcs towards the right. A larger, light blue triangular shape is positioned on the right side, pointing towards the center.

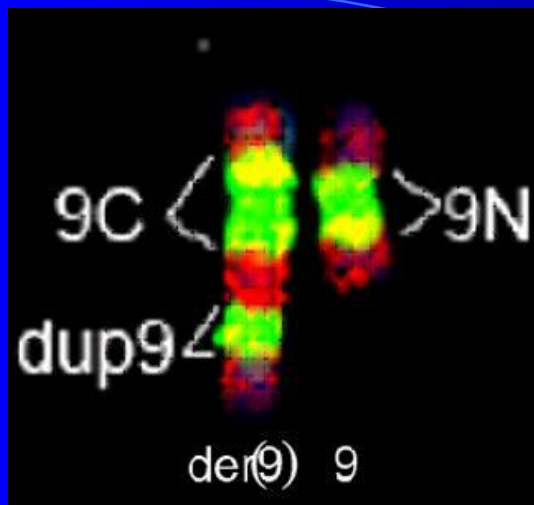
Спасибо за внимание!

3D реконструкция хромосомы 9 и её деривата в пространстве интерфазного ядра клеток сублинии *hESM03der9*



3D FISH
хромосомоспецифичной
WCPder(9) (зелёный цвет) и
центромерной *RCP9C*
(красный цвет) ДНК проб с
ядрами *hESM03der9*.



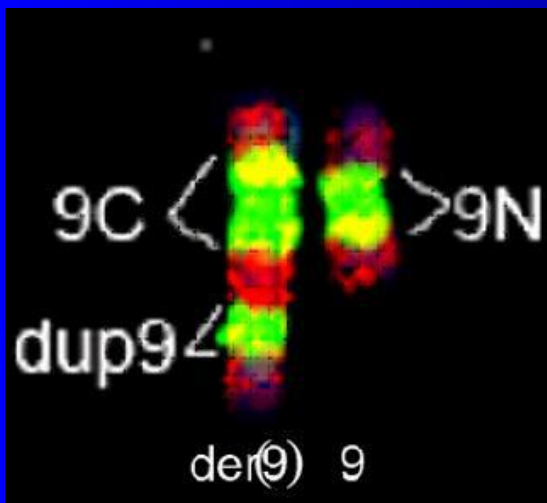


Локализация трёх районов хромосомных территорий хромосом 9 и der(9) в клетках hESM03der9 и их дифференцированных производных

Обозначение районов хромосомы 9 и её деривата.
 9N - прицентромерный район хромосомы 9,
 9C – прицентромерный район хромосомы der(9),
 dup9 – дополнительный сигнал на хромосоме der(9).
 Хромосомы окрашены красным, сигналы жёлтым.

Один из вариантов локализации районов dup9, 9C и 9N в ядрах клеток hESM03der9 и в ядрах дифференцированных клеток, полученных на основе hESM03der9.

локализация района	Касается ядрышка и не лежит в периферической области ядра		
район	dup9	9C	9N
в ядрах клеток hESM03der9	18 из 97	17 из 97	13 из 97
в ядрах дифференцированных клеток, полученных на основе hESM03der9	2 из 87	0 из 87	0 из 87



Варианты локализации части хромосомной территории относительно границы ядра и ядрышка.

(C 1) – одной стороной лежит в периферической области ядра;

(C 2) – двумя сторонами лежит в периферической области ядра;

(C nu) – касается ядрышка,

(C 1 + nu) – одной стороной касается ядрышка, другая лежит в периферической области ядра;

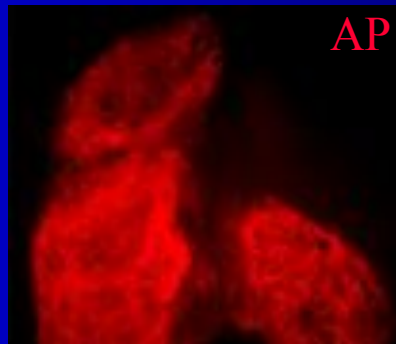
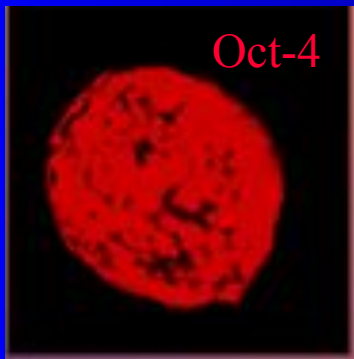
0 - не касается ядрышка и не лежит в периферической области ядра.

Зелёным обозначены варианты локализации части хромосомной территории, красным – ядрышки.

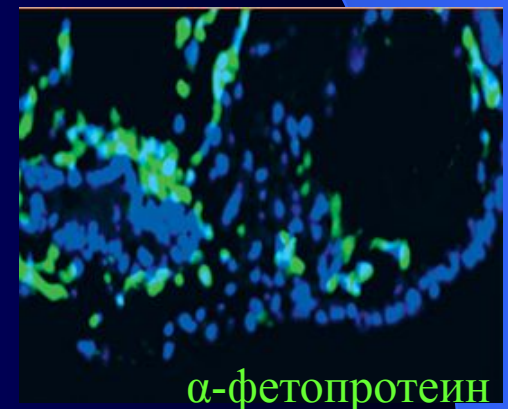
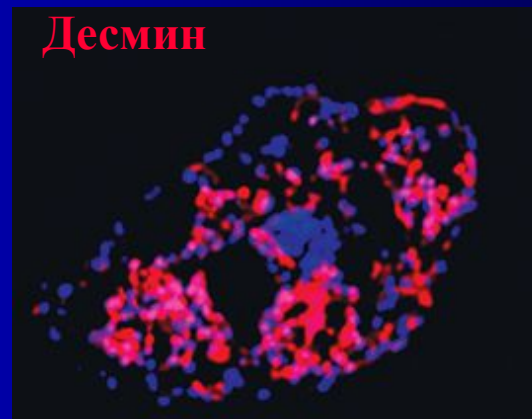
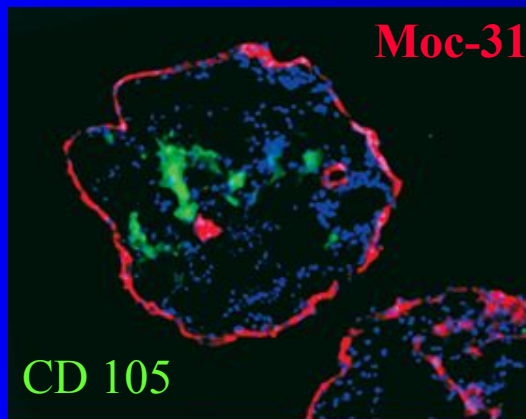


*Экспрессия специфических маркёров, выявленная с
помощью моноклональных антител*

Культура клеток. Линия hESM01



Срезы эмбрионидных телец. Линия hESM03

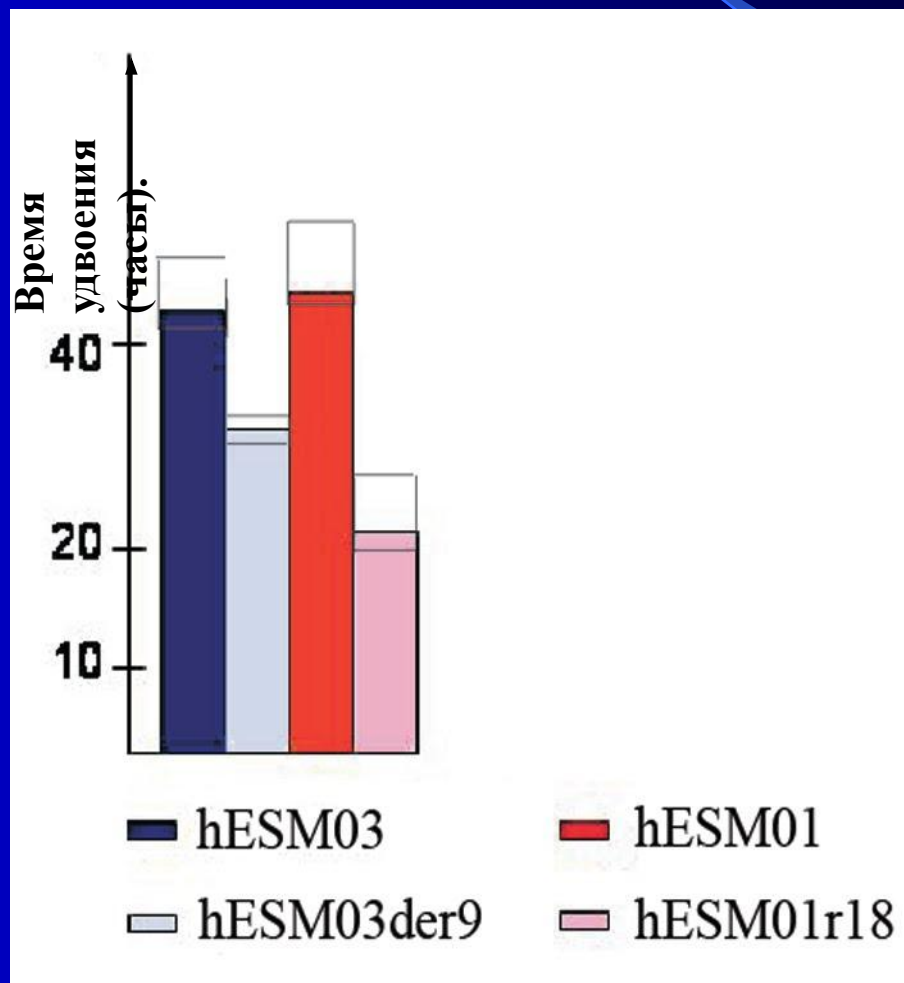


Сравнение свойств клеток сублиний

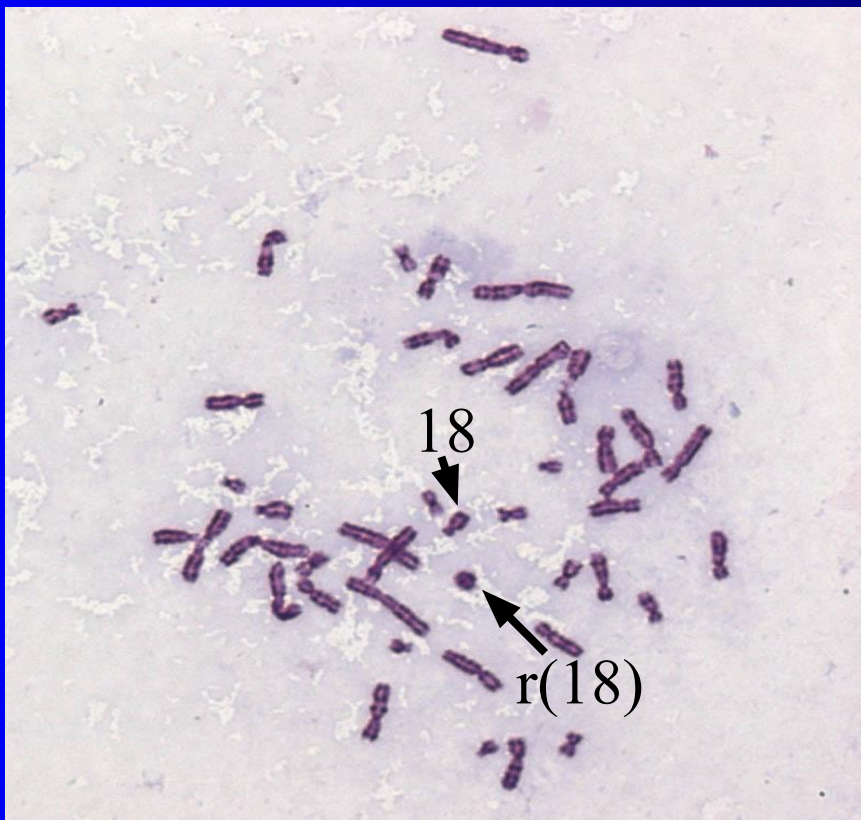
hESM01 и hESM01r18

линия	формирование эмбрионидных телец (ЭТ)	примечания	кариотип
hESM01	образуют обычные ЭТ, состоящие из тканеподобных структур разных типов		46,XX
hESM01r18	образуют ЭТ значительно медленнее. Большинство проанализированных ЭТ состоят из однослойного эпителия	легко переносят пересев мелкими (меньше 50 клеток) кластерами. Легко переносят заморозку.	46,XX,r(18)

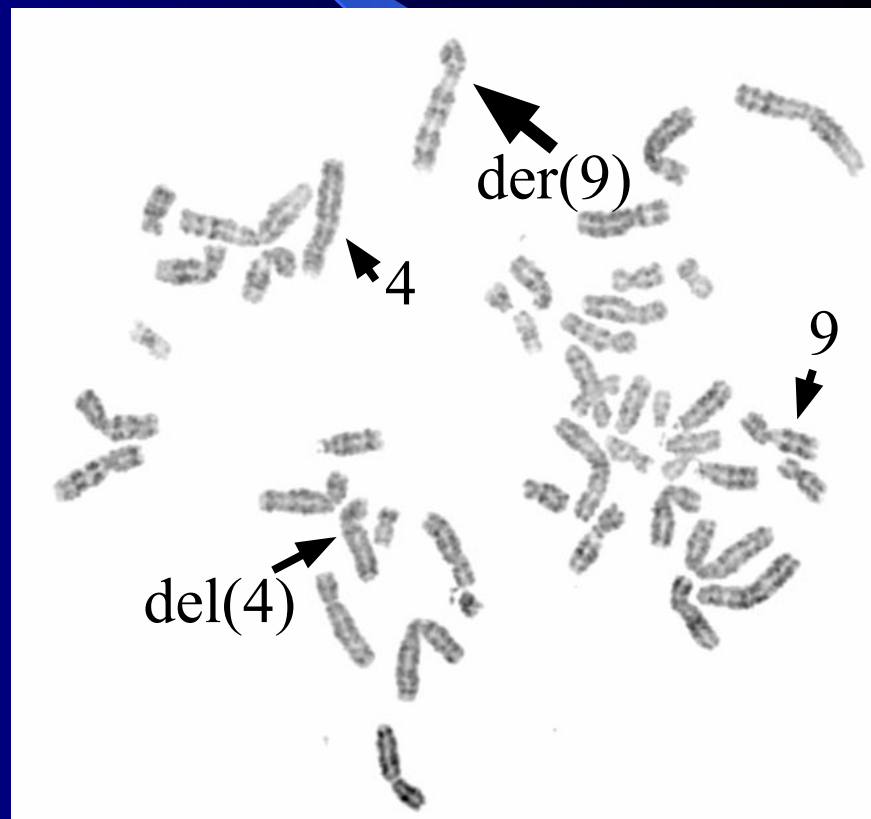
Сравнение свойств клеток сублиний hESM01 и hESM01r18, hESM03 и hESM03der9



*Сублиния hESM01r18.
46, XX, r(18)*



*Сублиния hESM03der9.
46, XX, del(4),der(9)*



18p11.32	Hs.464416		LOC729309	↑	sv pr dl ev mm	SNP	mRNA	18p11.31	hypothetical protein LOC729309
18p11.31	Hs.190886		KIAA0802	↓	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18p11.22	KIAA0802
18p11.23	Hs.464472		TXNDC2	↓	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	mRNA	18p11.31-p11.2	thioredoxin domain-containing 2 (spermato
18p11.22	Hs.464595		GNAL	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18p11.22-p11.21	guanine nucleotide binding protein (G prote
18p11.21	Hs.99528		SPIRE1	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18p11.21	spire homolog 1 (Drosophila)
18p11.1	Hs.699980		MC2R	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm	SNP	best RefSeq	18p11.2	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrop
18q11.1	Hs.404263		RIOK3	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q11.2	RIO kinase 3 (yeast)
18q11.2	Hs.427202		KCTD1	↑	sv pr dl ev mm hm	SNP	mRNA	18q11.2	potassium channel tetramerisation domain c
18q12.1	Hs.643454		PA2G4P3	↑	HGNC sv dl ev mm		best RefSeq	18q11.2	proliferation-associated 2G4 pseudogene 3
18q12.2	Hs.532824		ZNF396	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q12	zinc finger protein 396
18q12.3	Hs.514806		C18orf21	↑	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q12.2	chromosome 18 open reading frame 21
18q21.1	Hs.9059		MYO5B	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q21	myosin VB
18q21.2	Hs.298280		CCDC68	↑	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q21	coiled-coil domain containing 68
18q21.31	Hs.12253		ST8SIA3	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q21.31	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8
18q21.32	Hs.162996		SERPINB11	↑	HGNC sv pr dl ev mm hm	SNP	best RefSeq	18q21.3	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbur
18q21.33	Hs.374588		TSHZ1	↑	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q22.3	teashirt zinc finger homeobox 1
18q22.1	Hs.293653		LOC100131014	↑	sv dl ev mm		mRNA	18q23	similar to hCG2045213
18q22.2	Hs.435090		LOC100129089	↑	sv dl ev mm		mRNA	18q23	hypothetical protein LOC100129089
18q22.3	Hs.114412		GALR1	↑	OMIM HGNC sv pr dl ev mm hm sts	SNP	best RefSeq	18q23	galanin receptor 1
18q23	Hs.405610		LOC100127994	↑	sv dl ev mm		protein	18q23	hypothetical protein LOC100127994