

*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

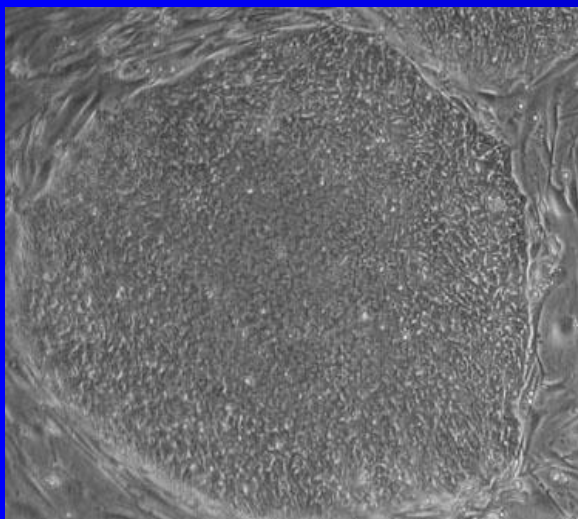
Цель работы:

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.

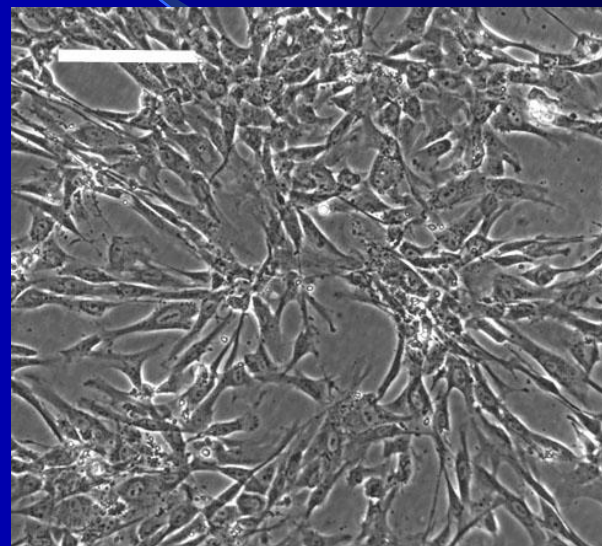
Задачи:

- 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.*

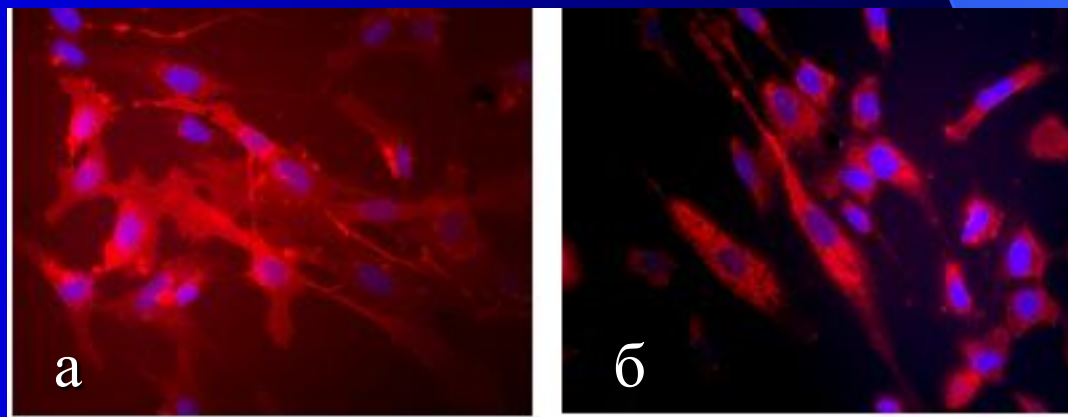
Общий вид колонии hESM01



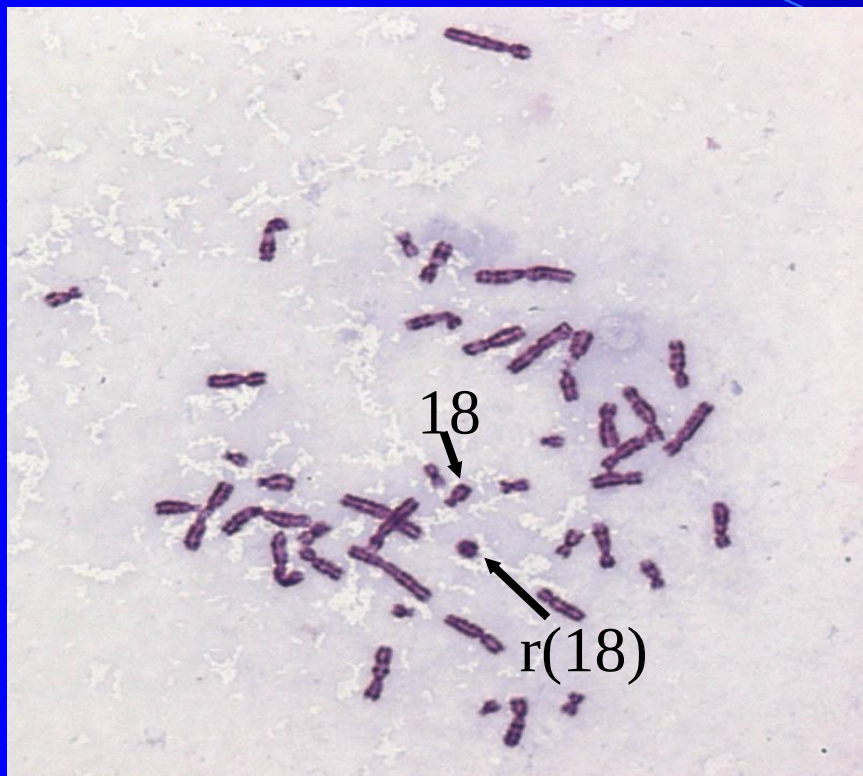
Фибробластоподобные производные клеток hESM01



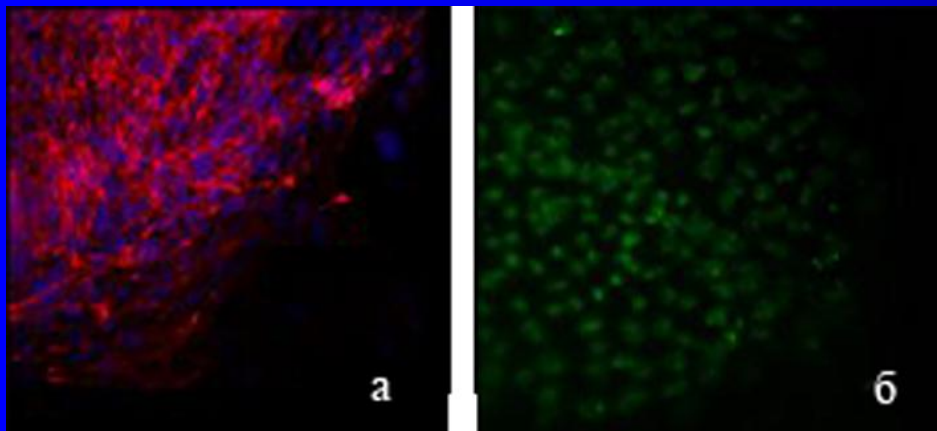
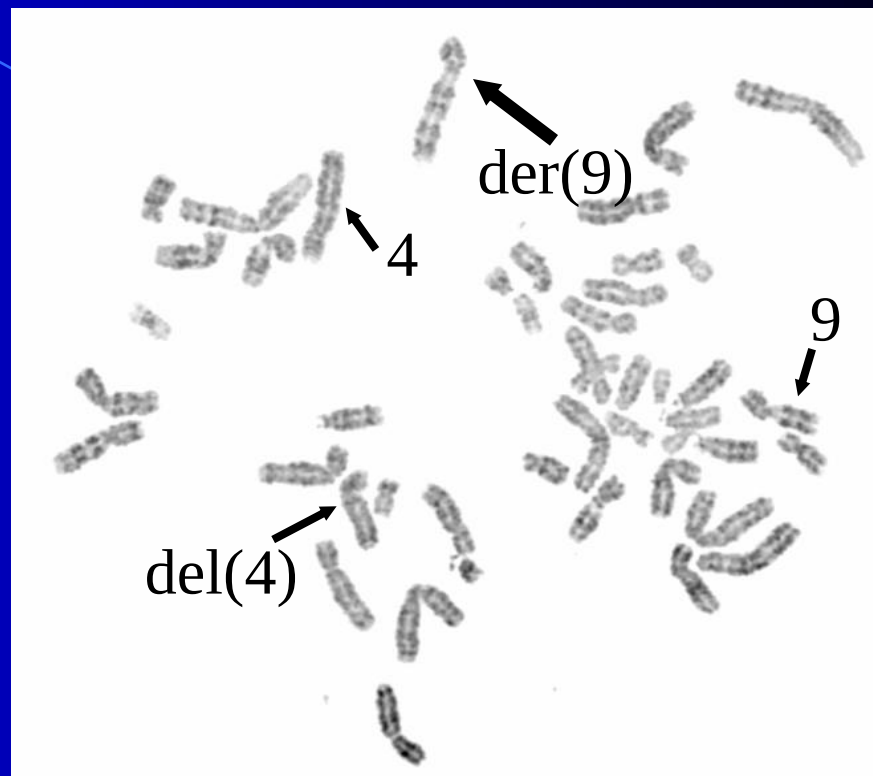
Результаты
иммуноокрашивания
дифференцированных
клеток с помощью антител
против **CD105** (а), **пролил-
гидроксилазы** (б);
ядра окрашены DAPI –
синий цвет.



*Сублиния hESM01r18.
46, XX, r(18)*



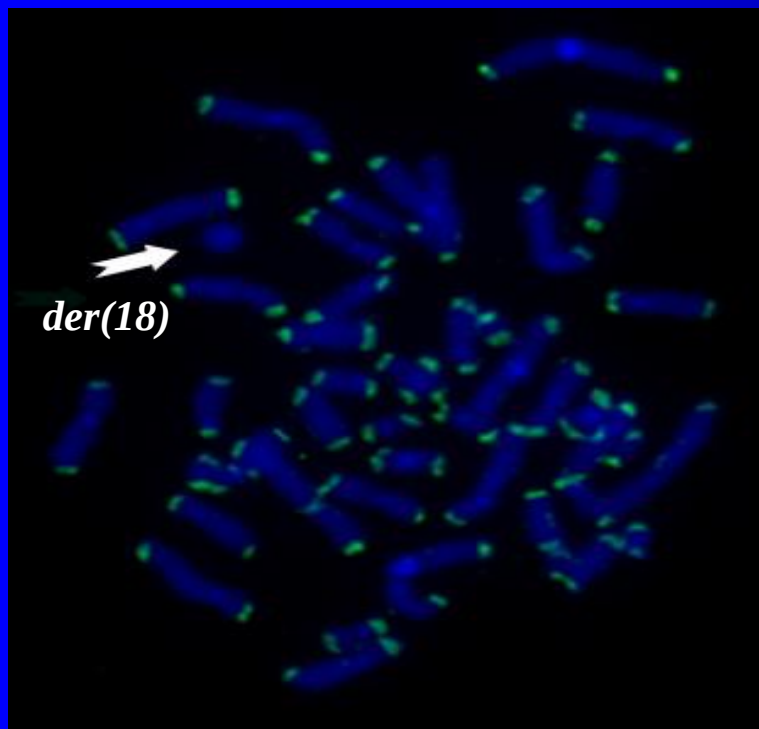
*Сублиния hESM03der9.
46, XX, del(4),der(9)*



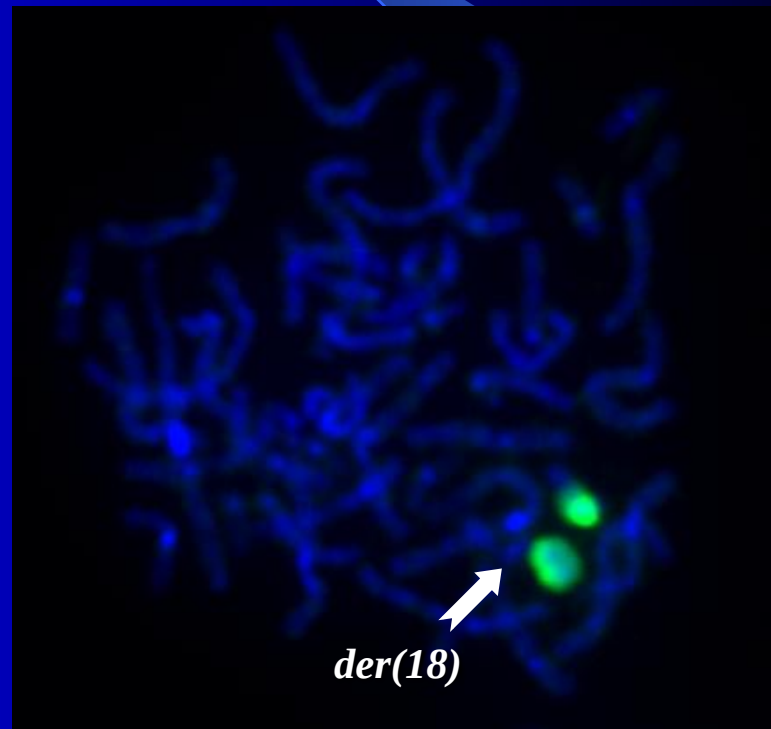
*Иммуноокрашивание клеток hESM01r18.
На фотографиях «а» и «б»
представлены фрагменты колоний.
а – **Tra-1-60** – **красный сигнал**, ядра
окрашены **DAPI** – **синий цвет**;
б – **OCT4** – **зелёный сигнал**.*

Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии ESM01r18

FISH теломерной
ДНК пробы с хромосомами
клеток сублинии ESM01r18

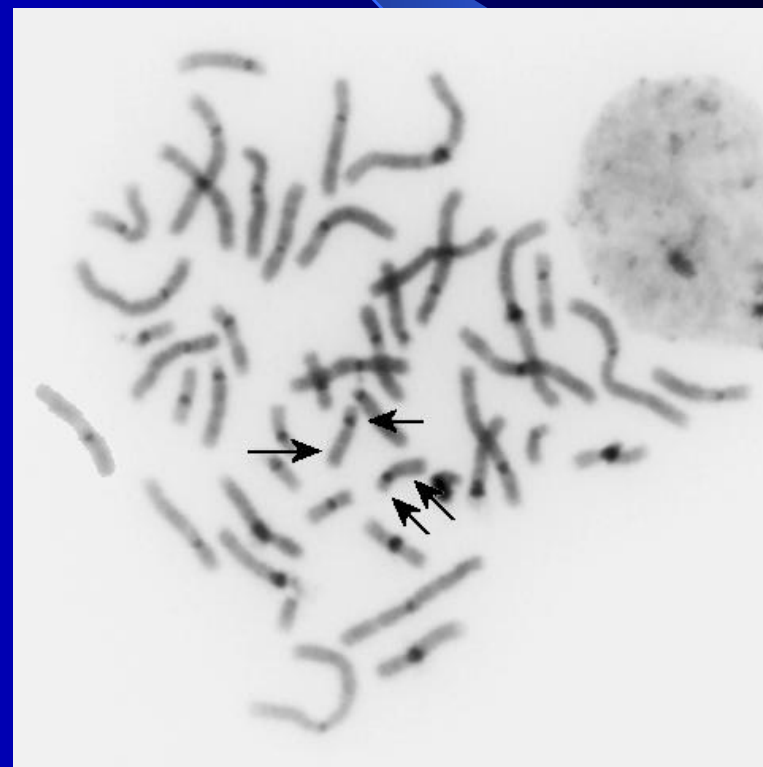
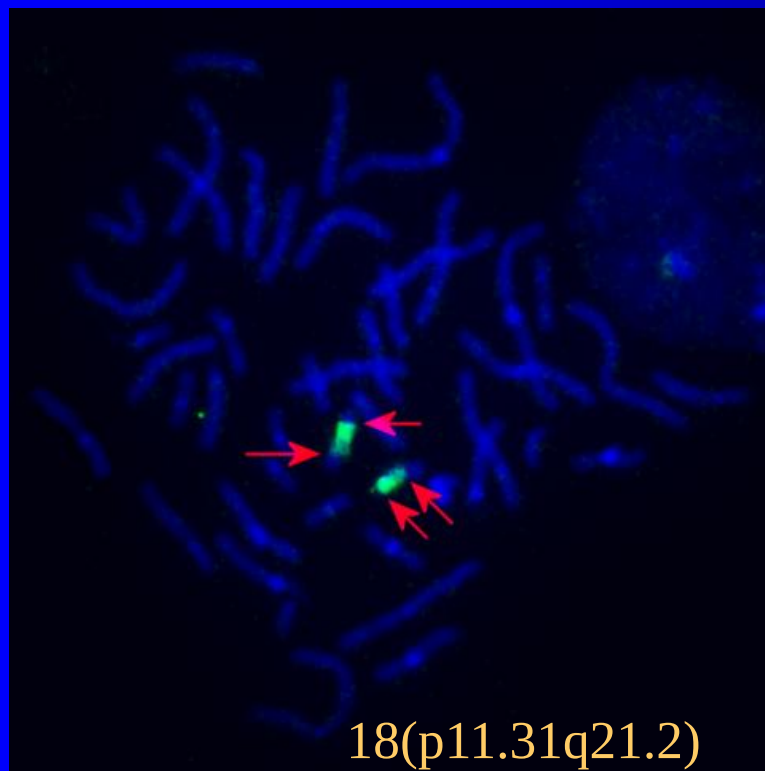


FISH микродиссекционной
ДНК пробы *der(18)* с хромосомами
клеток сублинии hESM01r18



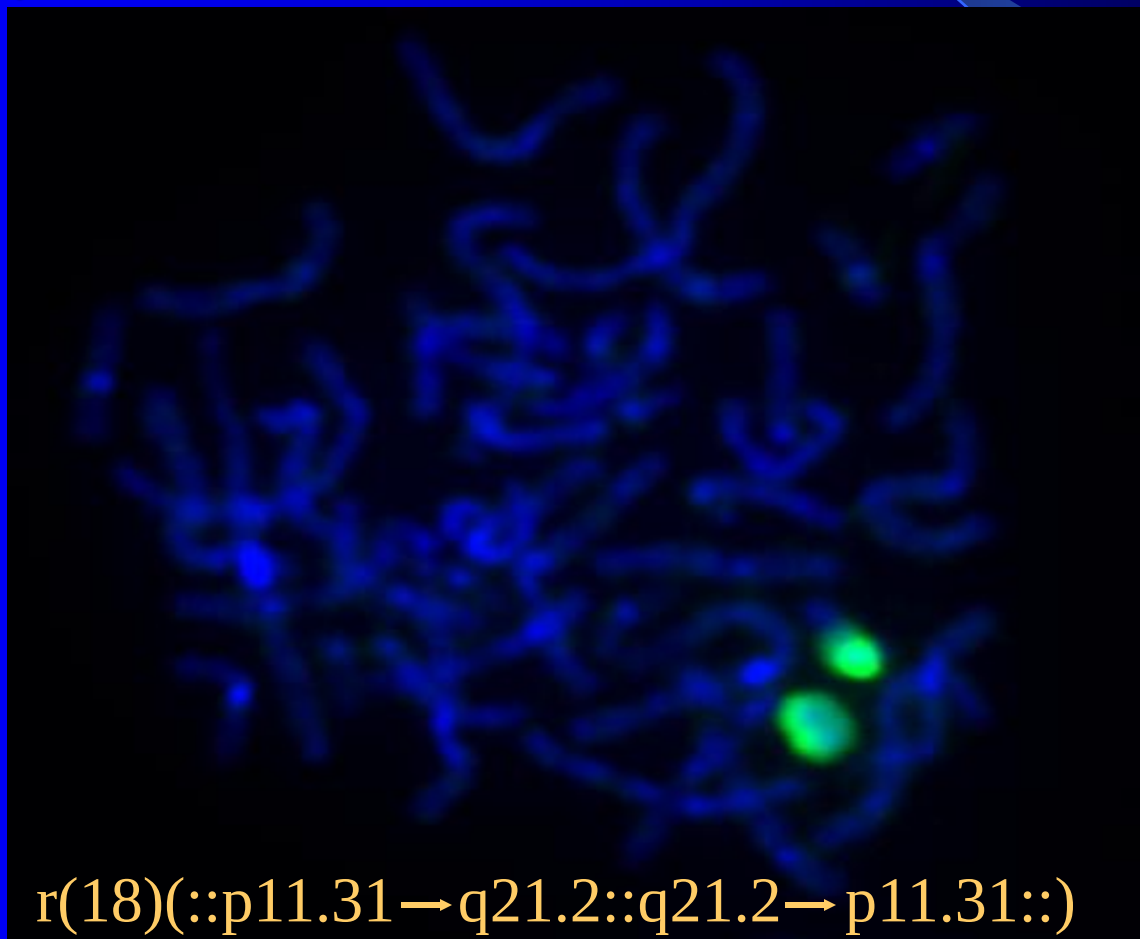
Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии ESM01r18

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



Реорганизация хромосомы 18 в клетках сублинии hESM01r18

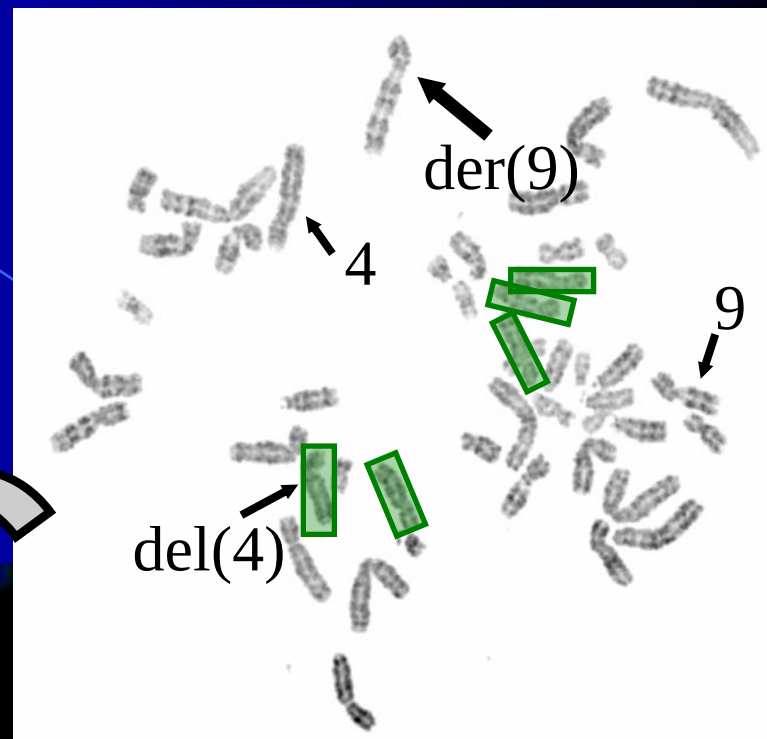
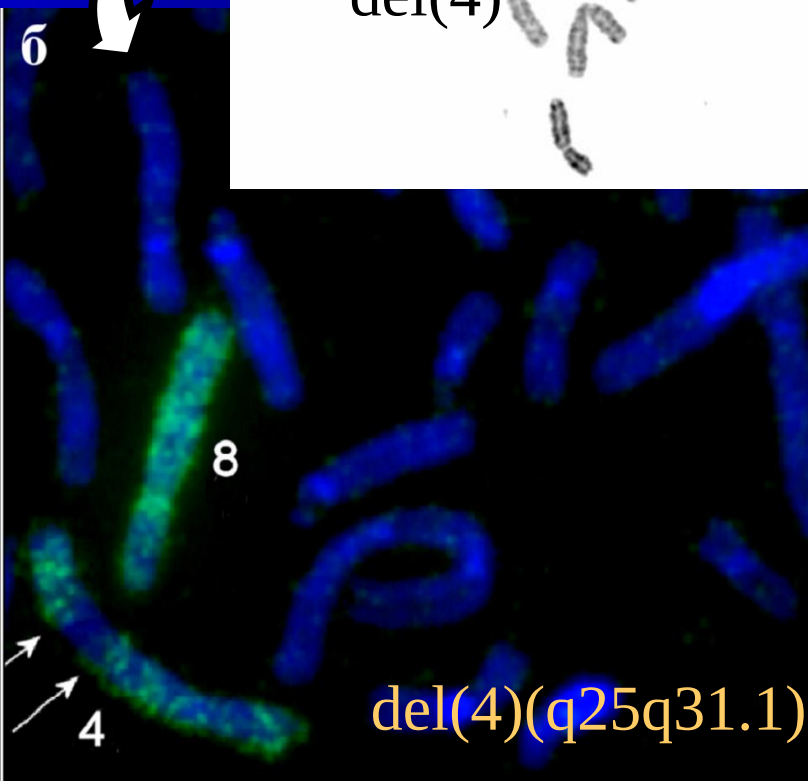
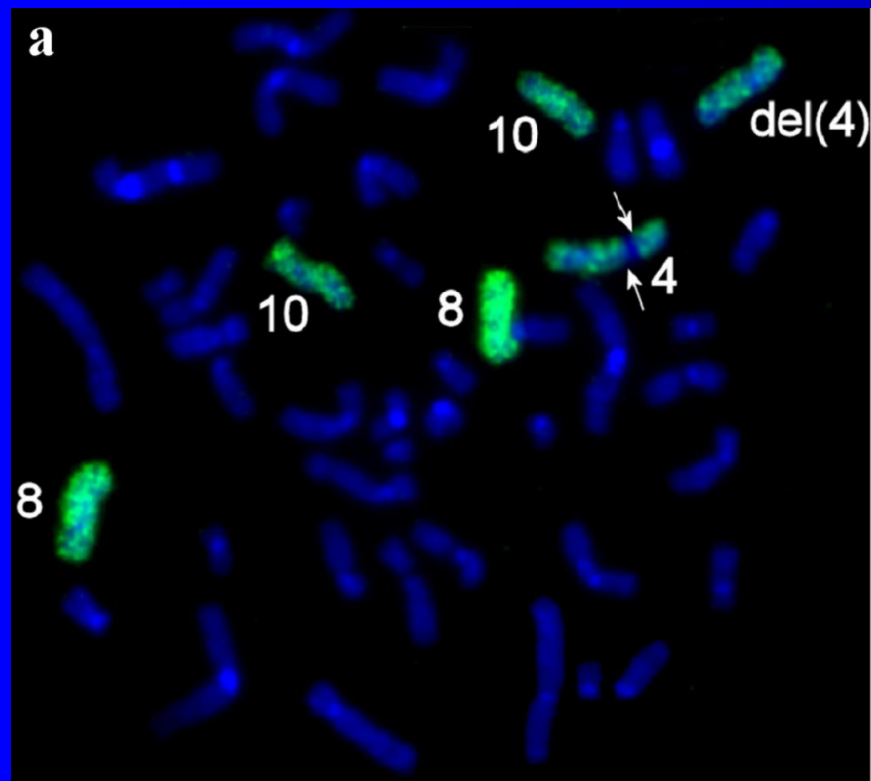
*FISH микродиссекционной ДНК пробы der(18) с хромосомами
клеток сублинии hESM01r18*



Реорганизация хромосомы 4 в клетках сублинии hESM03der9

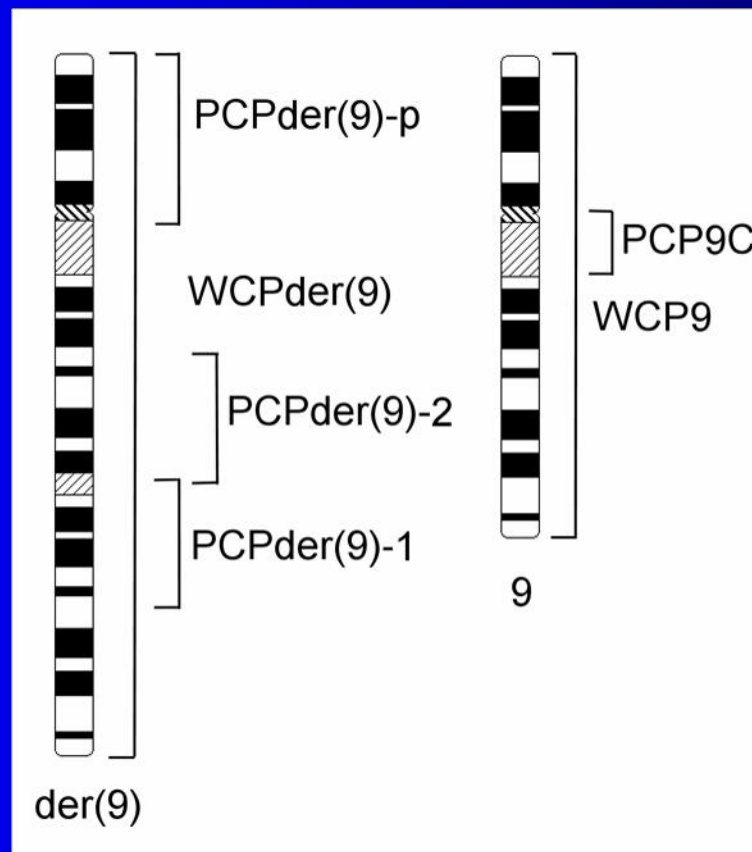
FISH микродиссекционной комбинированной
ДНК пробы *del(4)*

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



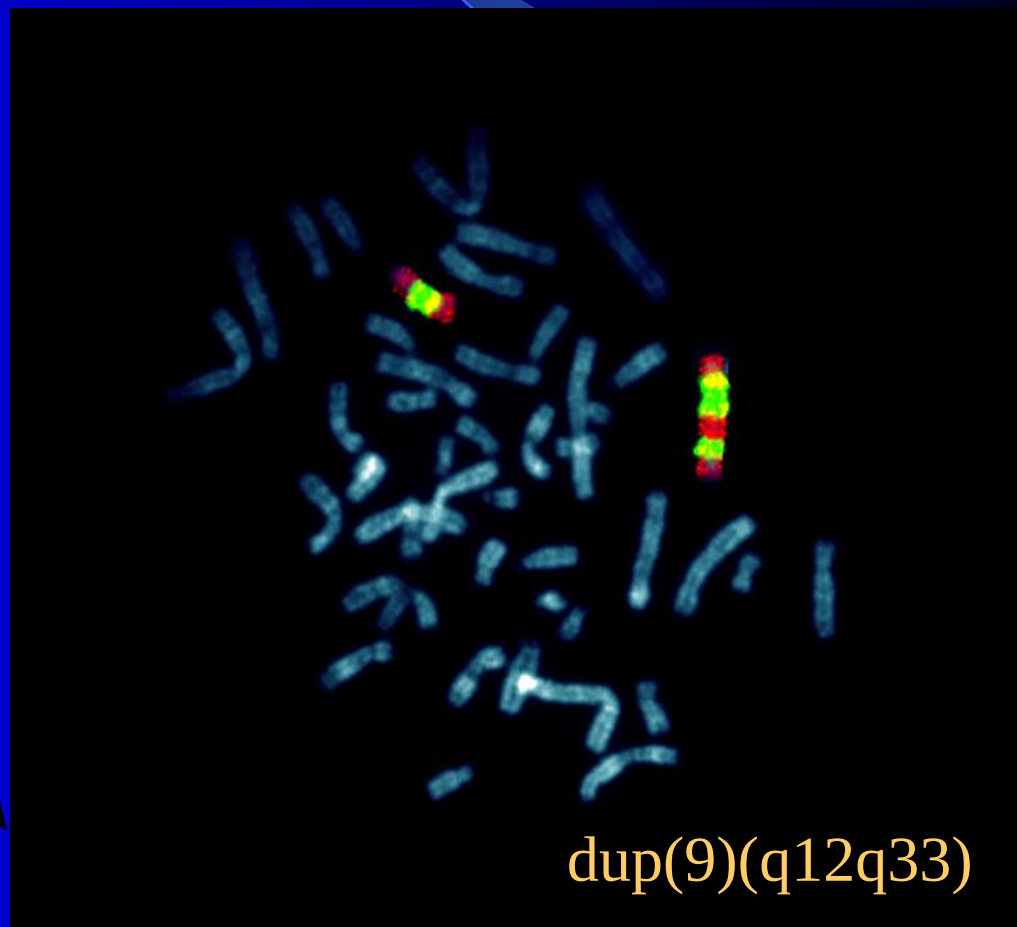
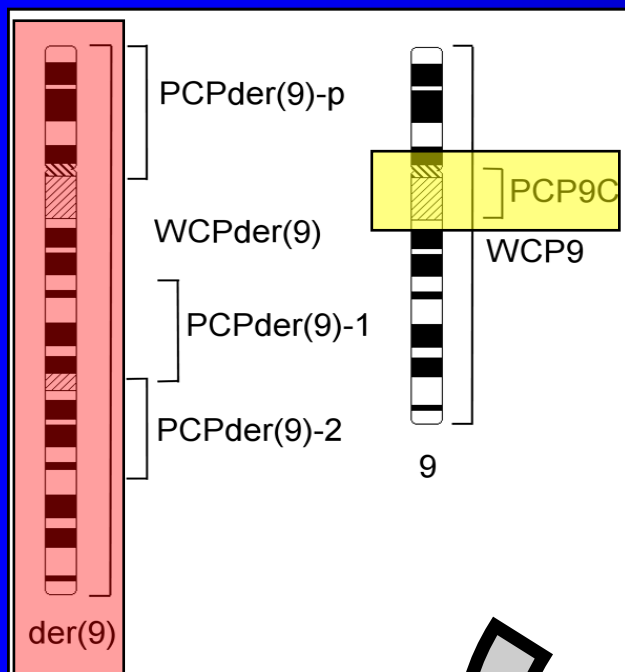
Реорганизация хромосомы 9 в клетках сублинии hESM03der9

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



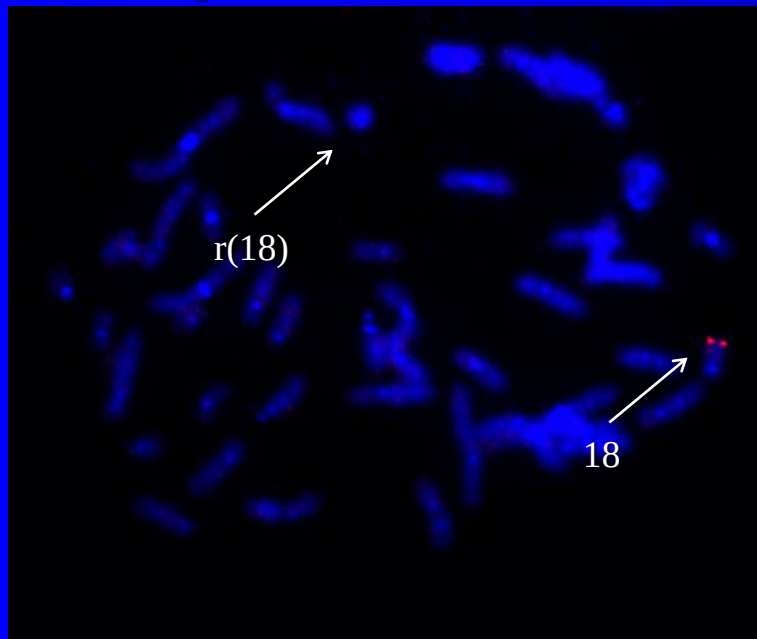
Реорганизация хромосомы 9 в клетках сублинии hESM03der9

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

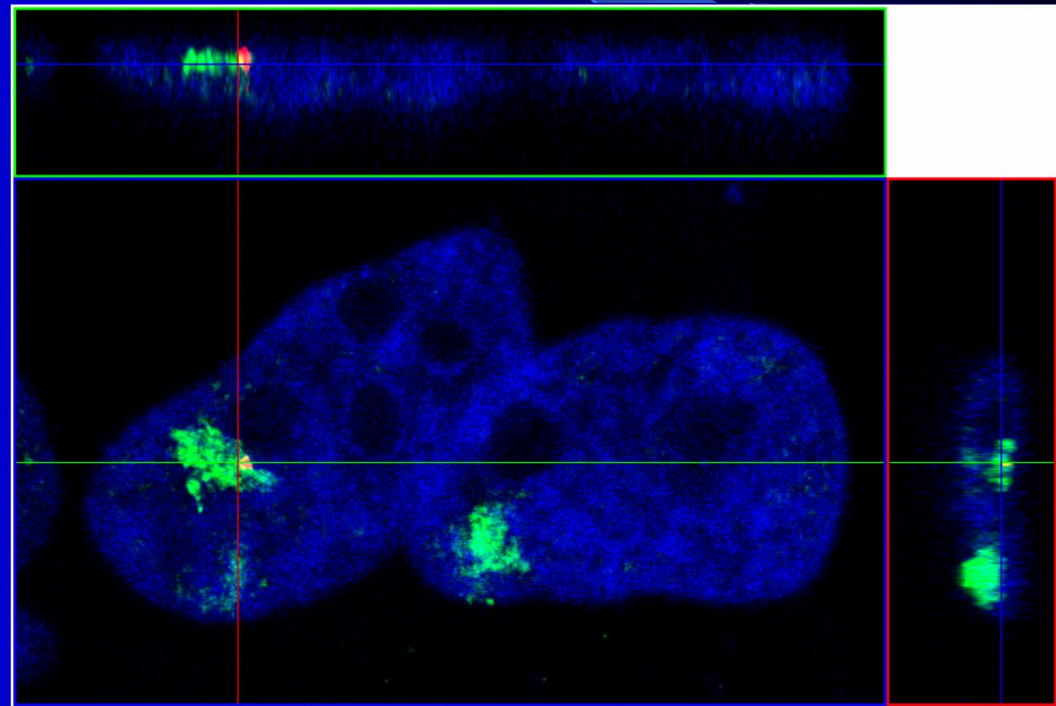


Визуализация и идентификация хромосомных территорий хромосомы 18 и её деривата

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



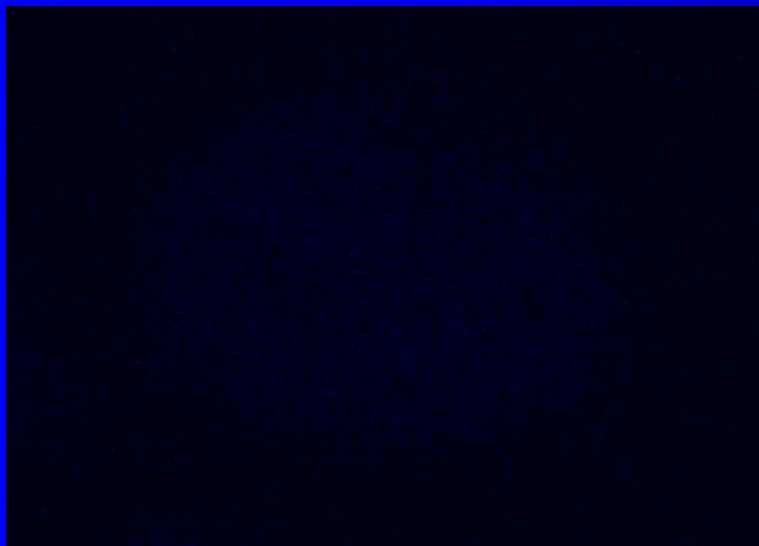
Совместная 3D FISH **ДНК пробы**, маркирующей нормальный гомолог хромосомы 18, и **хромосомоспецифичной пробы WCP18**, окрашивающей хромосомные территории хромосомы 18 и её деривата. Ядра окрашены DAPI – синий цвет.



Оптические срезы двух ядер (три проекции).

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

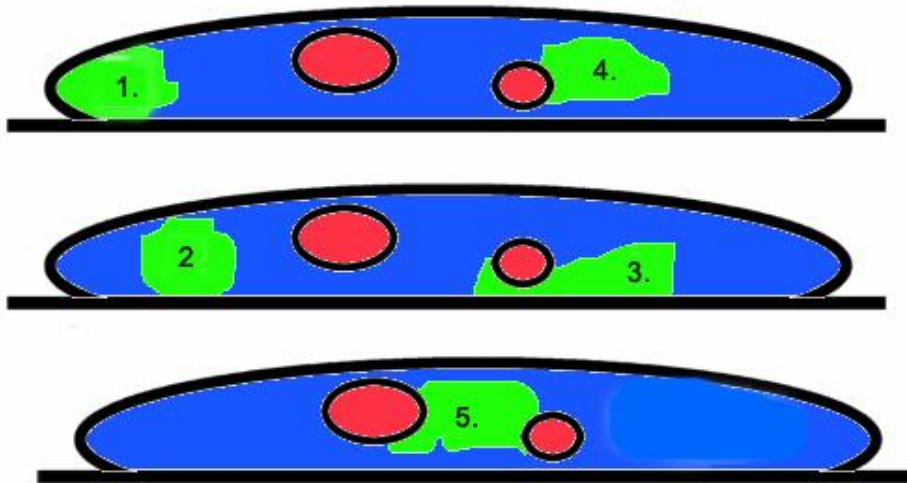
Совместная 3D FISH **ДНК** пробы, маркирующей нормальный гомолог хромосомы 18, и **хромосомоспецифичной пробы WCP18**, окрашивающей хромосомные территории хромосомы 18 и её деривата. Ядра окрашены DAPI – синий цвет.



Серии оптических срезов.

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

Пять различных вариантов расположения хромосомной территории в ядре



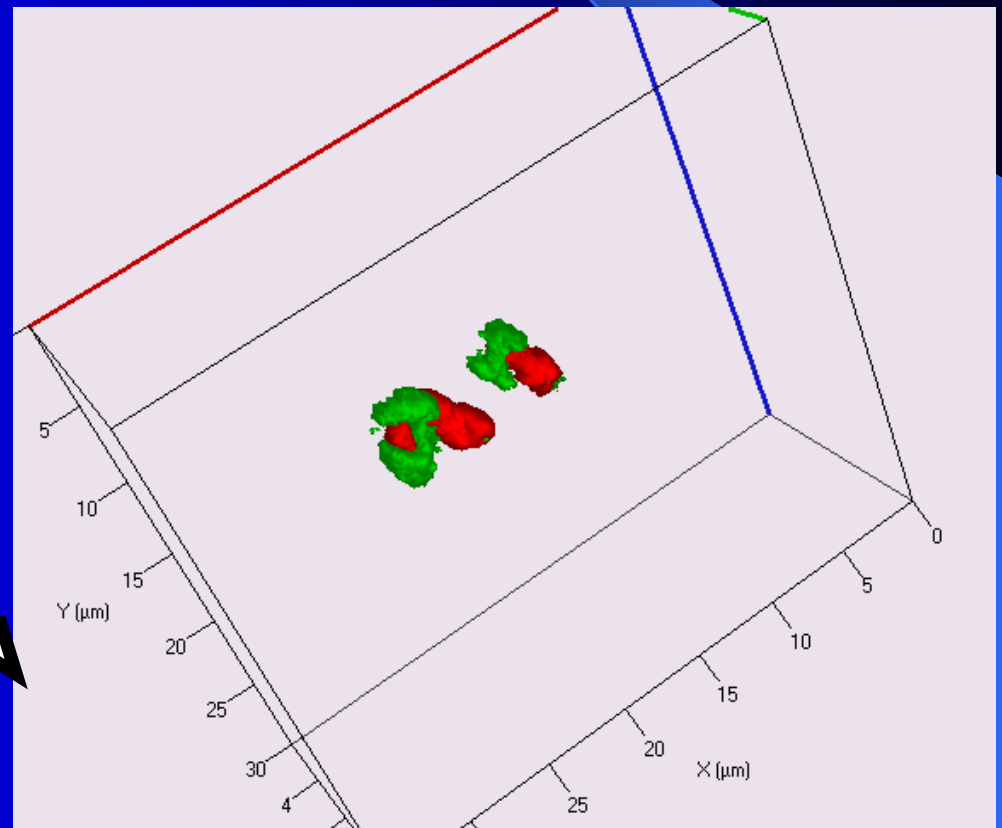
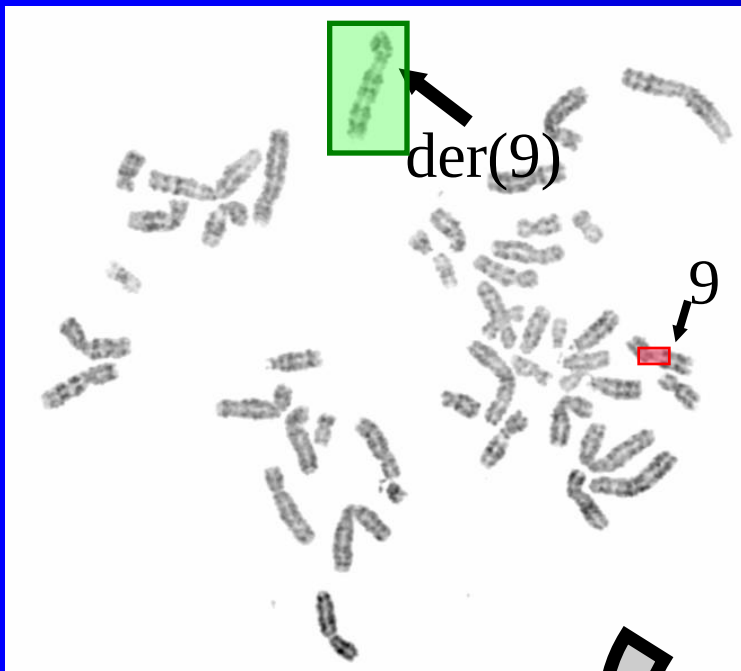
1. Хромосомная территории лежит в периферической области ядра с трёх сторон.
2. Хромосомная территории лежит в периферической области ядра с двух сторон.
3. Хромосомная территории касается ядрышка и лежит в периферической области ядра.
4. Хромосомная территории касается ядрышка.
5. Хромосомная территории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

Спасибо за внимание!