

Источники гетерогенности культивируемых *in vitro* популяций эмбриональных клеток мыши линии BALB/c

Т. Т. Глазко, А. П. Яцышина, О. В. Пидпала, И. В. Вавилина, Л. Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

glazko@yahoo.com

Выполнен детальный хромосомный анализ клеток линии G1 мыши эмбрионального происхождения на 15-м пассаже культивирования in vitro. Обсуждаются возможные механизмы гетерогенности исследуемой клеточной линии. В некоторых метафазных пластинках наблюдали спонтанное дифференциальное окрашивание хромосом, а также обнаружили опережающее расщепление сестринских центромер по сравнению с остальными участками сестринских хроматид. Распределение перестроенных хромосом, в том числе и робертсоновских транслокаций, наличие автономных кластеров хромосом, ассоциированных в перицентромерных участках, и деспирализация перицентромерных гетерохроматиновых блоков указывают на сходство метафазных хромосом новой клеточной линии G1 мыши с эмбриональными стволовыми клетками и эмбриональными герминативными клетками мышевидных грызунов.

Ключевые слова: стволовые, эмбриональные, герминативные клетки, кариотипическая гетерогенность.

Введение. Плюрипотентные стволовые клетки эмбрионального происхождения занимают центральное место в исследованиях молекулярных механизмов клеточной дифференцировки, разработке методов клеточной терапии, а также в получении трансгенных млекопитающих, основным источником чего служат внутренняя клеточная масса бластоцистов и примордиальные клетки зачатков генеративных органов. Центральная проблема использования стволовых клеток связана с тем, что до сих пор не удается разработать методы и найти идентификационные признаки, позволяющие предсказывать направление их эволюции в условиях *in vitro*, динамику утраты полипотентности и ограничений их способности формировать клетки генеративного ряда при получении химерных животных с их

участием. В связи с этим особый интерес представляют постоянные клеточные линии, выделенные из популяций эмбриональных герминативных клеток (ЭГК).

Следует подчеркнуть, что если количество известных линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и мыши, изучаемых в разных лабораториях мира, достигает нескольких десятков, то постоянных линий ЭГК к настоящему времени получено совсем немного, в частности, выделены единичные линии ЭГК у человека [1, 2].

К одной из тканеспецифических особенностей герминативных клеток у мышевидных грызунов в перинатальном периоде, по данным некоторых исследователей [3], относится расщепление сестринских центромерных участков хромосом, опережающее расщепление соответствующих хроматид. Имеются экспериментальные доказательства того, что

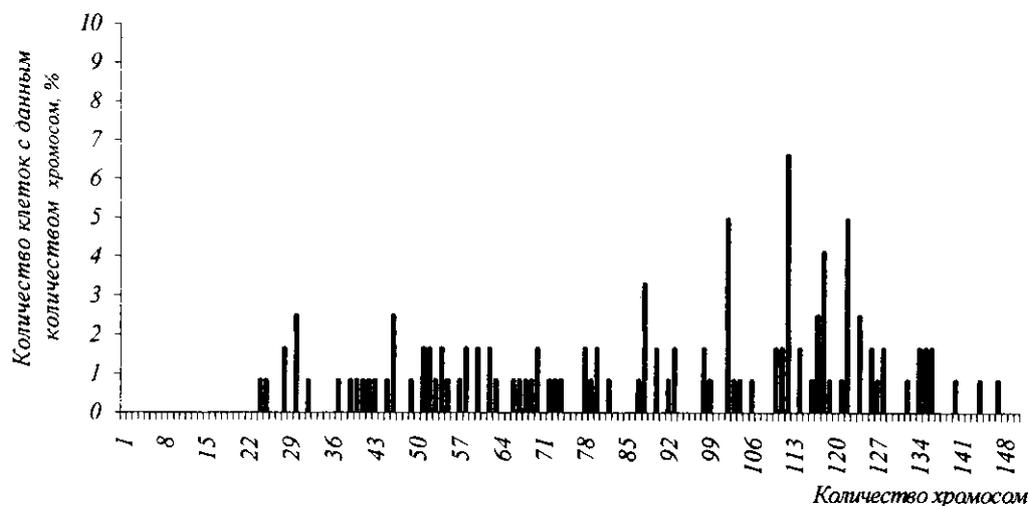


Рис. 1. Распределение клеток линии G1 на 15-м пассаже по количеству хромосом

определенный вклад в этот феномен вносят тканеспецифические особенности рисунка метилирования ДНК хромосом в этих клетках: гипометилирование центромер и гиперметилирование остальных районов [4—6].

В наших предыдущих исследованиях мышинных ЭСК линии R1 выявлены метафазные пластинки, в которых отчетливо наблюдалось опережающее расщепление сестринских центромерных районов по отношению к другим участкам сестринских хроматид. Обнаружена выраженная гетерогенность клеточных субпопуляций по этому признаку, несмотря на их общее происхождение и вне зависимости от принадлежности к разным пассажам, прошедшим после выделения этих ЭСК из внутренней клеточной массы бластоциста мыши линии 129 [7, 8]. Чтобы оценить наличие этого феномена в эмбриональных клеточных популяциях различного происхождения, в том числе и в популяциях ЭГК, а также его возможное влияние на кариотипическую эволюцию клеток при их пассировании *in vitro*, в данной работе выполнен анализ метафазных пластинок, полученных из клеточной популяции 15-го пассажа линии G1, описанной нами ранее [9].

Материалы и методы. Исходно клетки G1 выделены нами из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c [9]. Методика получения метафазных пластинок детально приведена в работе [10]. Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью бинокулярного микроскопа «Carl Zeiss» (Австрия) при увеличении в 1000 раз. Метафазные пластинки фотогра-

фировали при помощи цифрового фотоаппарата Сапоп («Power Shot G6», Великобритания).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований [10] получены данные о том, что клеточные популяции линии G1 на 15-м пассаже характеризуются широким разнообразием клеток с разным количеством хромосом (рис. 1). Непростым оказался вопрос о механизмах возникновения полиплоидов. В полиплоидных клетках встречаются от одной до семи робертсоновских транслокаций (РБ) или центрических слияний между акроцентрическими хромосомами. В отдельных гипердиплоидных клетках, число хромосом в которых колебалось от 57 до 120 (то есть они были близки к три-, тетра-, пента- и гексаплоидам), обнаруживается одновременное присутствие нечетного числа РБ разного происхождения, примеры которых представлены на рис. 2. Благодаря тому, что в некоторых метафазных пластинках наблюдалось спонтанное дифференциальное окрашивание хромосом (G-бендинг), это позволило типировать индивидуальные хромосомы. В отдельных клетках отмечалось присутствие двух копий гомологичных РБ, например, РБ (12; 18), в других клетках выявлена та же перестроенная хромосома РБ (12; 18) в одной копии и дополнительные РБ — другого происхождения и тоже в одной копии. Полученные данные позволяют предположить, что в рассмотренных клеточных популяциях полиплоидизация происходит, по крайней мере, двумя путями: 1) исключением цитокинеза, из-за чего должны удваиваться маркерные хромосомы и 2) межклеточным

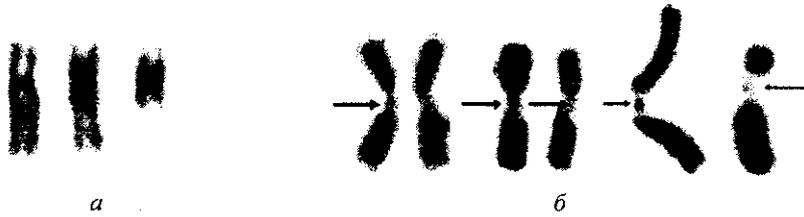


Рис. 2. Деспирализация перицентромерного гетерохроматина и опережающее расщепление сестринских центромер в разных метафазных пластинках 15-го пассажа линии G1: *a* — у акроцентрических хромосом мыши; *б* — в робертсоновских транслокациях (стрелками указаны гетерохроматиновые блоки в участках слияния)

слиянием, в результате чего в клетках одной копии присутствуют маркерные хромосомы, возникшие в разных клеточных клонах.

Обращает на себя внимание тот факт, что как в мышинных ЭСК линии R1, исследованных нами ранее [7, 8], так и в клеточных популяциях линии G1 на 15-м пассаже наблюдаются метафазы со спонтанным G-бендингом. Например, на рис. 3 представлена такая метафаза, большинство хромосом которой удалось типировать. Она содержит 121 хромосому (с учетом плеч трех РБ), из которых 28 — перестроенные. Неперестроенные аутосомы в основном представлены 5—6 копиями, за исключением самых крупных, таких как хромосомы 1—7, количество копий у них варьирует от одного до четырех (рис. 3). Еще одна общая черта для метафазных хромосом ЭСК линии R1 и ЭГК линии G1 на 15-м пассаже прослеживалась в том, что в некоторых метафазных пластинках отмечено опережающее расщепление сестринских центромер по сравнению с остальными участками сестринских хроматид (рис. 2, *a*). Это типично для перинатальных генеративных клеток мышевидных грызунов [3]. Из данных рис. 2, где представлены хромосомы из разных метафазных пластинок, видно, что в большинстве случаев связь между сестринскими хроматидами сохраняется благодаря наличию гетерохроматиновых блоков по длине сестринских хроматид, как и было описано в работе [3]. Деспирализация центромерных районов обнаруживается и в отсутствие типичных для центромерных районов хромосом мыши крупных перицентромерных гетерохроматиновых блоков. Так, например, выявлены две хромосомы 5 из одной и той же метафазной пластинки, отличающиеся по присутствию/отсутствию перицентромерного гетерохроматинового блока и центромерного расщепления. Деспирализация перицентромерного гетерохроматина отчетливо видна и в ряде РБ, представленных на рис. 2, *б*. Более того, в деспирализованном участке, объединяющем две хромосомы в РБ, просматриваются уплотненные блоки (на рис. 2 они показаны стрелками).

Деспирализация центромер наблюдается и в метафазных хромосомах на препаратах ЭГК линии G1 на 15-м пассаже, несмотря на то, что клетки обрабатывали колхицином для накопления метафаз, который, как показано в работе [3], существенно снижает частоту случаев опережающего расщепления сестринских центромер в ЭГК. По данным этих же авторов [3], такая деспирализация центромер и их раннее расщепление сопровождалась существенным увеличением частоты центромерных слияний и сложных хромосомных перестроек, что обнаружено и в наших исследованиях. По-видимому, именно это обстоятельство и обуславливает известные ограничения в заселении ЭСК и ЭГК генеративных органов при получении химерных мышей с их использованием [11].

Очевидно, что для формирования межхромосомных перестроек обязательным условием является необходимость физического контакта между хромосомами. Принято считать, что РБ формируются в хромоцентрах интерфазного ядра, в которых центромерные районы акроцентрических хромосом оказываются близко расположенными. Остатки таких межхромосомных ассоциаций по перицентромерным гетерохроматиновым блокам наблюдаются и в метафазных пластинках клеток костного мозга мышей линии BALB/c, полученных без применения колхицина. В клеточных популяциях ЭГК линии G1 выявлены сходные ассоциации, в пределах которых происходят центромерные слияния и межхромосомные обмены (рис. 4). Среди рассмотренных нами гипердиплоидных клеток в 11 % случаев отмечены два фокуса межхромосомных ассоциаций, в которых происходят межхроматидные центромерные слияния.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы. Популяции ЭГК линии G1 на 15-м пассаже характеризуются высокой степенью гетерогенности как по числу хромосом, так и по присутствию перестроенных хромосом, в частности, робертсоновских транслокаций. Распределение перестроенных хромосом по гипердиплоидным клеткам позволяет предположить, что определен-



Рис. 3. Спонтанная дифференциальная окраска метафазных хромосом метафазной пластинки 15-го пассажа линии G1 (три робертсоновские транслокации, 121 плечо хромосом; арабскими цифрами обозначены неперестроенные хромосомы, римскими — перестроенные)



Рис. 4. Кластеризация хромосом, ассоциированных по центромерным участкам, в две автономные группы в метафазных пластинках 15-го пассажа линии G1

ный вклад в наблюдаемую гетерогенность вносит не только гиперплоидизация за счет выпадения стадии цитокинеза, но и межклеточные слияния.

Одним из признаков нестабильности хромосомного аппарата этих клеток является присутствие в метафазных пластинках автономных кластеров хромосом, ассоциированных по перичентромерным участкам, что, по-видимому, отражает предрасположенность к формированию многополюсных митозов. Еще одним источником внутривидовой изменчивости является отчетливо выявляемая в этих же клетках деспирализация перичентромерных гетерохроматиновых блоков, что способствует формированию робертсоновских транслокаций и сложных межхромосомных обменов, явно обнаруживаемых в группах хромосом, образующих кластеры по центромерным районам. Данные, свидетельствующие о присутствии метафаз со спонтанным G-бендингом в клеточных популяциях линии G1 на 15-м пассаже, совпадают с результатами исследований ЭСК мыши R1, а по присутствию хромосом с деспирализованным перичентромерным хроматином — с типичной морфологией перинатальных клеток генеративного ряда, описанной для мелких мышевидных грызунов.

В заключение следует отметить, что, по-видимому, именно в связи с тканеспецифичной деспирализацией перичентромерного гетерохроматина, сопровождающейся формированием сложных хромосомных дефектов, и возникают ограничения по заселению генеративных органов потомками эмбриональных стволовых клеток разных линий (ЭСК, ЭГК) при получении химерных животных с их использованием.

T. T. Glazko, A. P. Iatsyshyna, O. V. Pidpala, I. V. Vavilina, L. L. Lukash

The sources of heterogeneity of embryo cell populations of mouse line BALB/c cultured *in vitro*

Summary

Detailed chromosomal analysis of embryo mouse cell line G1 on the 15th passage of *in vitro* cultivation has been performed. Possible mechanisms of heterogeneity of the investigated cell line are discussed. Spontaneous chromosome G-staining has been observed in some metaphase plates. Premature disjunction of sister centromeres has been found, in comparison with other regions of sister chromatids. The distribution of rearranged chromosomes (including Robertsonian translocations), the presence of autonomous chromosome clusters, associated in pericentromeric regions, as well as despiralization of pericentromeric heterochromatin blocks designate the similarity of metaphase chromosomes of a novel mouse G1 cell line to embryonic stem cells and embryonic germ cells of rodents.

Keywords: stem cells, embryonic cells, germ stem cells, karyotypic heterogeneity.

T. T. Глазко, Г. П. Яцишина, О. В. Підпала, І. В. Вавіліна, Л. Л. Лукаш

Джерела гетерогенності культивованих *in vitro* популяцій ембріональних клітин миші лінії BALB/c

Резюме

Проведено детальний хромосомний аналіз клітин лінії G1 миші ембріонального походження на 15-му пасажі культивування *in vitro*. Обговорюються можливі механізми гетерогенності досліджуваної клітинної лінії. У деяких метафазних пластинках спостерігали спонтанне диференційне забарвлення хромосом, а також виявили передчасне роз'єднання сестринських центромер порівняно з іншими ділянками сестринських хроматид. Розподіл перебудованих хромосом, у тому числі і робертсонівських транслокацій, наявність автономних кластерів хромосом, асоційованих у перичентромерних ділянках, та деспіралізація перичентромерних гетерохроматинових блоків вказують на подібність метафазних хромосом нової клітинної лінії G1 миші до ембріональних стовбурових клітин і ембріональних гермінативних клітин мишоподібних гризунів.

Ключові слова: стовбурові, ембріональні, гермінативні клітини, каріотипічна гетерогенність.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Shambloott M. J., Axelman J., Wang Sh., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gerhart J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 13726—13731.
2. Park J. H., Kim S. J., Lee J. B., Song J. M., Kim C. G., Roh Sung H., Yoon H. S. Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells // Mol. Cells.—2004.—17.—P. 309—315.
3. Bernardino-Sgherri J., Chicheportiche A., Niveleau A., Dutrillaux B. Unusual chromosome cleavage dynamic in rodent neonatal germ cells // Chromosoma.—2002.—111.—P. 341—347.
4. Coffigny H., Bourgeois C., Ricoul M., Bernardino J., Vilain A., Niveleau A., Malfoy B., Dutrillaux B. Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis // Cytogenet. Cell Genet.—1999.—87.—4.—P. 175—181.
5. Bernardino J., Lombard M., Niveleau A., Dutrillaux B. Common methylation characteristics of sex chromosomes in somatic and germ cells from mouse, lemur and human // Chromosome Res.—2000.—8.—P. 513—525.
6. Flagiello D., Bernardino-Sgherri J., Dutrillaux B. Complex relationship between 5-aza-dC induced DNA demethylation and chromosome compaction at mitosis // Chromosoma.—2002.—111.—P. 37—44.
7. Глазко Т. Т., Межевикина Л. М., Бойко А. В. Каріотипічна гетерогенність ембріональної стовбової клітинної лінії миші // Клеточные культуры: Информ. бюл.—СПб: Ассоциация специалистов по клеточным культурам.—М.: Институт цитологии РАН, 2005.—Вып. 20.—С. 19—25.
8. Глазко Т. Т., Межевикина Л. М., Бойко А. В., Фесенко Е. Е. Цепная каріотипічна еволюція ембріональних стовбових кліток R1 *in vitro* // Цитология.—2005.—47, № 8.—С. 679—685.
9. Лукаш Л. Л., Яцишина А. П., Підпала О. В., Вагіна І. М., Кочубей Т. П. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений.—2006.—38, № 2.—С. 144—152.
10. Яцишина А. П., Підпала О. В., Кочубей Т. П., Лукаш Л. Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів.—Київ: КВІЦ, 2004.—С. 88—92.
11. Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y., Sofuni T., Ito T. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan // Comparative Med.—2006.—56.—P. 33—36.

УДК 576.5:576.316

Надійшла до редакції 19.06.06