

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Преемственность цитогенетических характеристик в пассажах эмбриональной герминативной клеточной линии мыши G1

Т.Т. Глазко<sup>1</sup>, А.П. Яцышина<sup>2</sup>, О.В. Пидпала<sup>2</sup>, Л.Л. Лукаш<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РСХА–МСХУ им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина

#### Continuity of cytogenetic characteristics in passages of mice embryonic germ cell line G1

T.T. Glazko<sup>1</sup>, A.P. Yacishina<sup>2</sup>, O.V. Pidpala<sup>2</sup>, L.L. Lukash<sup>2</sup>

<sup>1</sup>RGAU–MAA of K.A.Timirjazev's name, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of molecular biology and genetics NASU, Kiev, Ukraine

Выполнен сравнительный анализ цитогенетических характеристик в популяциях клеток разных пассажей эмбриональной герминативной клеточной линии G1, полученной из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c. Обнаружено, что несмотря на выраженную гетерогенность клеток по числу хромосом, робертсоновским транслокациям, для них характерны некоторые линейноспецифические черты кариотипа, в частности, близость числа хромосом к пента- и гексаплоидным наборам, а также присутствие транслокации t(6;12). Обсуждается возможность связи выявленных кариотипических особенностей с линейноспецифическими механизмами поддержания полипотентности и пролиферации эмбриональных герминативных клеток в культуральных условиях.

**Ключевые слова:** эмбриональные герминативные клетки, робертсоновская транслокация.

#### Введение

Исследования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и эмбриональных герминативных (ЭГ) клеток занимают центральное место в изучении молекулярных основ ранних этапов эмбриогенеза и в разработках новых методов клеточной терапии. ЭС клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцист, ЭГ – потомки примордиальных герминативных клеток. Эти клетки имеют общие характеристики плюрипотентности, к которым относятся неограниченная пролиферация, экспрессия ряда маркеров эмбриональных клеток, в частности, щелочной фосфатазы, Oct-4, а также способность дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков [1]. Считается, что кариотипическая эволюция таких эмбриональных клеток под влиянием условий культивирования может быть одной из причин снижения плюрипотентных свойств на более поздних пассажах [2].

В то же время, ранние события формирования линий эмбриональных клеток, специфика селекции клеточных клонов после прохождения «кризиса», типичного для адаптации клеток к новым условиям их культивирования *in vitro* [3], до сих пор остаются недостаточно исследованными в связи с ограниченностью количества клеток на этих пассажах. Важность изучения ранних событий обусловлена тем, что традиционно кариотипический анализ выполняется на

The comparative analysis of cytogenetic characteristics in populations of cells of different passages of mice embryonic germ cell line G1 received from sexual puff of 12,5 days of embryo of the mouse of line BALB/c was carried out. It was revealed, that despite of the expressed heterogeneity of cells on number of chromosomes, Robertsonian translocation, some line specific karyotype features were characteristic for all investigated cell populations. It was, in particular, the closest of the chromosome numbers to penta- and hexaploidies, and also the presence of translocation t(6;12). The possible connections between revealing karyotype traits and the mechanisms of maintenance of cell polypotency and proliferation in cultural condition were discussed.

**Key words:** embryonic germ cell, Robertsonian translocation.

преобладающих («модальных») клеточных клонах, успешно переживших такой «кризис», что не исключает присутствия «минорных» вариантов и изменений их соотношений в процессах пассирования клеток. Так, кариотипирование независимо полученных 88 ЭСК линий мышей показало, что «нормальный» кариотип, как модальный в большинстве клеток, обнаруживается только в 53 из них, причем в 52 линиях состав половых хромосом был XY, а у одной линии – XX; все остальные ЭСК линий несли различные типы цитогенетических аномалий [4].

В целях исследований преемственности кариотипических характеристик в разных пассажах ЭГ клеток в настоящей работе выполнен анализ клеточных популяций ЭГ G1, полученных из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c [5, 6].

#### Материал и методы

В анализ включены популяции клеток G1, полученные на 15-м и 75-м пассажах после их выделения из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мыши линии BALB/c, а также три пассажа (35/14, 35/26 и 35/40) сублинии G1–0A, выделенной из G1 на 35-м пассаже путем селекции на независимый рост от сывороточных факторов (1%) [5, 6]. Методика получения метафазных пластинок детально описана

в работе [6]. Клетки суспендировали и инкубировали 30 мин в растворе KCl (0,56%) при +37°C. Хромосомы фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1), трижды меняя фиксирующий раствор. Препараты раскпывали на холодные мокрые стекла, высушивали и окрашивали красителем Гимза («Merck», Германия). Окрашенные цитогенетические препараты анализировали с помощью микроскопа Carl Zeiss при увеличении в 1000 раз. Метафазные пластинки фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата Canon (PowerShot G6, Great Britain). Индивидуальное типирование хромосом проводили в соответствии с данными Cowell J.K. [7]. Анализировали количество хромосом и их качественный состав; для отдельных метафазных пластинок составляли кариограммы. Подсчет количества хромосом (Xp) в клетках выполняли на фотографиях метафазных пластинок.

Изменчивость клеточных популяций по числу Xp характеризовали по следующим показателям: пределам варьирования, доле клеток с модальным числом Xp и шириной модального класса. В связи с выраженным разнообразием ЭС клеток по количеству Xp учитывали количество клеток (в процентах от общего количества рассмотренных клеток) с близкими числами Xp, которые встречались чаще, чем другие, и обозначали его как условно модальное число Xp.

### Результаты и обсуждение

Анализ распределения клеток по числу хромосом позволил выявить их широкое разнообразие во всех исследованных пассажах клеток (табл. 1). По данным, представленным в этой таблице, видно, что клетки на протяжении 75 пассажей сохраняют высокий уровень гетерогенности по присутствию различных клонов, отличающихся по числу Xp. Тем не менее, наблюдается определенная предпочтительность по представленности среди них клеток с гиперпента- и гипогексаплоидным набором Xp (см. табл. 1).

Наиболее гетерогенной по присутствию клеток с разным числом Xp оказалась клеточная популяция линии G1 самого раннего из исследованных пассажей, G1 15. По сравнению с другими пассажами в ней выявляется относительно повышенная частота встречаемости гипергексаплоидных клеток (см. табл. 1). В пассажах сублинии G1-ОА, полученной путем селекции клеток на среде, обедненной сывороточными факторами, по сравнению с 15-м и 75-м пассажами линии G1, обнаруживается некоторая стабилизация клеток по числу Xp с тенденцией к увеличению доли гипотетраплоидных – гипопентаплоидных клеток к 35/40-му пассажу сублинии G1-ОА.

Во всех рассмотренных клеточных популяциях наблюдается высокая частота центрических слияний Xp (робертсоновских транслокаций, РБ). В исходной линии ЭСК G1 на 15-м пассаже они встречались с частотой  $2,1 \pm 0,3$  на одну клетку. Не уменьшалась частота их встречаемости и у сублинии ОА на 14-м, 26-м и 40-м пассажах ( $2,2 \pm 0,3$ ;  $2,2 \pm 0,2$ ;  $1,9 \pm 0,2$  соответственно).

В некоторых работах высказываются предположения о том, что повышенная частота таких центрических слияний может быть связана с гиперплоидностью клеток [6]. Однако в наших исследованиях не обнаружено прямой связи между числом Xp в клетках и присутствием робертсоновских транслокаций (табл. 2).

Как правило, центрические слияния наблюдались между гетерологичными хромосомами, только в одной клетке сублинии G1 ОА на 14-м пассаже была обнаружена изохромосома РБ (8;8) (рис. 1). В гетерологичных центрических слияниях принимали участие все без исключения хромосомы; в сублинии G1-ОА на 35/14-м пассаже относительно чаще, чем другие, в таких слияниях участвовали Xp 5, 8, 9, 10, 12 и 14 (см. рис. 1).

Для того, чтобы оценить особенности хромосомного состава, отдельные клетки каждого пассажа были кариотипированы. Пример результата кариотипирования метафаз сублинии G1-ОА на 35/14-м пассаже представлен в таблице 3. Видно, что в большинстве случаев Xp присутствуют в метафазных пластинках в 4–6 копиях, за исключением Xp 6, 7 и 12, по которым обнаруживается определенный дефицит копий по сравнению с другими Xp (табл. 3). В относительно избыточном количестве копий представлена Xp 11 (см. табл. 3). Сходные тенденции наблюдаются и в кариотипированных клетках других клеточных популяций линии G1.



Рис. 1. Робертсоновские транслокации (РБ) в разных метафазах эмбриональной герминативной клеточной сублинии G1-ОА на 35/14 пассаже. Слева направо – РБ (8;8), РБ (5;?), РБ (5;?), РБ (5;?), РБ (5;16), РБ (5;8), РБ (9;14), РБ (12;?)

Таблица 1. Гетерогенность клеток по количеству хромосом в исследованных клеточных популяциях

Линия или сублиния	Число исследованных клеток	Число хромосом в клетке		Доля клеток с условно модальным числом хромосом, %
		Пределы варьирования	Условно модальное	
Линия G1, пассаж 15	50	40–173	40; 108; 117; 126–127	6; 8; 6; 18
Линия G1, пассаж 75	30	47–247	96–103; 108–116	16; 23
Сублиния G1-ОА:				
Пассаж 35/14	74	58–126	110–112; 114–117; 123–126	14; 35; 12
Пассаж 35/26	43	50–125	110–111; 113–115	21; 26
Пассаж 35/40	70	55–134	71–79; 90–95	23; 19

Таблица 2. Количество хромосом и робертсоновских транслокаций (РБ) в G1 15 и в G1-OA 35/14

Число хромосом	G1 15 пассаж (50 метафаз)		G1-OA 35/14 пассаж (30 метафаз)	
	Кол-во клеток	Кол-во РБ в каждой клетке	Кол-во клеток	Кол-во РБ в каждой клетке
40	3	2РБ,	–	–
44	1	1РБ	–	–
54	1	–	–	–
58	–	–	1	2РБ
62	1	2РБ	–	–
63	1	–	–	–
65	1	4РБ	–	–
66	2	1РБ, 1РБ	–	–
68	1	2РБ	–	–
73	1	3РБ	2	2РБ, 2РБ
75	1	2РБ	–	–
80	–	–	1	2РБ
81	1	3РБ	–	–
87	–	–	1	2РБ
89	1	1РБ	–	–
91	2	2РБ, 2РБ	–	–
100	1	2РБ	1	1РБ
102	–	–	1	1РБ
103	–	–	1	2РБ
105	1	2РБ	1	3РБ
106	–	–	1	2РБ
107	1	3РБ	–	–
108	4	2РБ, 5РБ, 1РБ, 1РБ	–	–
110	1	2РБ	3	3РБ, 5РБ, 2РБ
111	1	3РБ	–	–
114	–	–	8	0 – 2РБ
115	1	3РБ	2	3РБ, 3РБ
116	1	2РБ	–	–
117	2	3РБ, 4РБ	1	1РБ
119	–	–	1	2РБ
120	–	–	1	3РБ
121	2	3РБ, 2РБ,	2	4РБ, 4РБ
123	1	5РБ	–	–
124	1	2РБ	1	1РБ
126	4	2РБ, 4РБ, 3РБ, 2РБ	1	1РБ
127	5	2РБ, 3РБ, 4РБ, 3РБ, 1РБ	–	–
130	1	1РБ	–	–
134	1	3РБ	–	–
135	2	1РБ, 2РБ	–	–
136	1	1РБ	–	–
141	1	2РБ	–	–
173	1	6РБ	–	–

**Примечание.** Знаком «–» отмечено отсутствие в рассмотренных пассажах клеток с указанным в первом столбце числом хромосом.

Таблица 3. Хромосомный состав метафазных пластинок сублинии G1-OA на 35/14 пассаже

Номера метафаз / Хромосомы	№1	№4	№9	№12	№22	№207	№8	№25
1	5	4	4	5	6	6	5	5
2	5	4	3	5	5	4	5	5
3	5	4	5	6	5	5	4	5
4	3	4	4	5	4	5	5	4
5	5	5	6	6	6	5	6	6
6	2	3	5	5	4	3	4	6
7	4	3	2	2	4	3	3	4
8	4	4	6	5	6	4	5	4
9	6	4	6	6	5	4	6	5
10	3	4	6	6	6	4	5	4
11	7	4	6	6	6	7	7	6
12	3	3	6	3	4	2	3	4
13	6	3	5	6	6	4	5	3
14	4	3	6	5	5	4	5	4
15	4	3	5	4	4	5	3	6
16	5	3	6	5	6	5	6	5
17	6	4	7	5	5	5	5	5
18	6	4	5	6	6	6	6	5
19	7	4	6	6	6	5	6	6
X	4+2Y	4	4	1	1, 2Y	4	4+2Y	3
РБ	8; 19	10; ?	8;9	X;15	3;14	1;X	3;?	17;18
РБ	7; 18	5; ?		3;14	15;?	X;10	12;?	17;18
РБ				7;?	9;?	6;8	10;?	8;12
РБ				12;?		11;15	6;?	14;17
РБ				8;13		12;18		?;?
РБ				?;?		18;?		
РБ						15;?		
Перестроенные хромосомы	21+ 2РБ	11+ 2РБ	16+ 1РБ	13+ 6 РБ	13+ 3РБ	14+ 7РБ	19+ 4 РБ	19+ 5РБ
Суммарное количество плеч	125	89	126	121	121	120	125	124

**Примечание.** Цифрами в столбцах указано количество копий неперестроенных хромосом в каждой из кариотипированных метафаз; X, Y – половые хромосомы; РБ – робертсоновские транслокации; знаком «?» отмечены случаи, когда в РБ участвует перестроенная нетипируемая хромосома.

Интересно отметить, что увеличение копиюности Хр 11 выявлено в большом количестве линий ЭСК мыши, что связывают с локализацией в этой Хр гена STAT3, участвующего в STAT3/JAK пути контроля клеточной пролиферации и, соответственно, накоплением клеток с увеличенной копиюностью Хр11 при их отборе в культуральных условиях на высокий уровень пролиферативной активности [8].

Одна из возможных причин относительного дефицита копий Хр 6 и 12 может быть обусловлена тем, что в клетках всех рассмотренных популяций встречается транслокация между этими двумя хромосомами (рис. 2). Необходимо отметить, что такая же транслокация была выявлена нами ранее в клетках миелом мышей той же линии BALB/c [9].

Транслокация t(6;12) не является типичной транслокацией для клеток миелом; как правило, в них встречаются варианты t(6;15), t(12;15) – транслокации между хромосомами, несущими гены иммуноглобулинов (Хр 6, 12) и тус онкоген (Хр 15) [10].

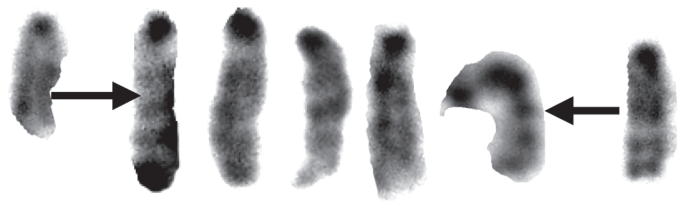


Рис. 2. Примеры транслокаций между хромосомой 12 (сегменты А–Е) и хромосомой 6 (сегменты С–G), присутствующих в клеточных популяциях эмбриональной герминативной клеточной линии G1 рассмотренных пассажей 15, 75, а также сублинии G1–0A пассажей 35/14, 35/26 и 35/40. Слева направо: хромосома 12,  $t(6;12)$ ,  $t(6;12)$ ,  $t(6;12)$ ,  $t(6;12)$ , хромосома 6. Стрелками указаны места разрыва при транслокации: на хромосоме 12 разрыв проходит в сегменте E, на хромосоме 6 – в сегменте C

В последние годы показано, что способность ЭСК к самокопированию без дифференцировки зависит от экспрессии комплекса генов, таких, как *Esrrb*, *Tbx3* и *Tcl1*, *Nanog*, *Oct4* и *Sox2*. Экспрессия *Oct4* необходима для предупреждения дифференцировки клеток в трофобластическом направлении. *Nanog* и *Sox2*, по-видимому, являются интегральными регуляторами, подавляющими многие дифференцировочные программы, а экспрессия генов *Esrrb*, *Tbx3* и *Tcl1* необходима для блокирования программ клеточной дифференцировки в клеточные линии, производные эпибласта [11].

*Nanog* локализован в сегменте F2 хромосомы 6, *Tcl1* – в сегменте E хромосомы 12, а *Esrrb* – в сегменте D2 хромосомы 12. *Tbx3* локализован в сегменте F Xp 5, а *Sox2* – в сегменте B Xp 3 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Таким образом, транслокация  $t(6;12)$  объединяет три ключевых гена из пяти имеющихся, блокирующих клеточную дифференцировку и способствующих самокопированию клеток в отношении сохранения плюрипотентности. Интересно отметить, что в сегменте C Xp 12 локализован псевдоген *Nanog* PS2.

Судя по дифференциальной исчерченности перестроенной хромосомы (см. рис. 2), разрыв в Xp 12 проходит по сегменту E, в котором локализован ген *Tcl1*. В Xp 6 разрыв попадает на сегмент C, расположенный существенно выше локализации *Nanog*.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Park J.H., Kim S.J., Lee J.B. et al. Establishment of a human embryonic germ cell line and comparison with mouse and human embryonic stem cells. *Mol. Cells* 2004; 17(2): 309–15.
2. Mitalipov S.M., Mitalipova M.M., Ivanov V.I. The effect of the duration of culturing on the pluripotency of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro and in vivo. *Ontogenez* 1994; 25(6): 19–27.
3. Волгарева Г.М. Хромосомные маркеры мышиных гибридов. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 1986; 18(2): 69–73.
4. Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y. et al. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. *Comparative Medicine* 2006; 56(1): 33–6.
5. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В. и др. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість in vitro. *Фізіологія і біохімія культурних рослин* 2006; 38(2): 144–52.

На основании полученных данных можно предположить, что присутствие одной и той же транслокации  $t(6;12)$  в клетках миелом, а также во всех рассмотренных популяциях ЭГ G1 определенной степени может быть связано со способностью опухолевых и ЭГ клеток сохранять полипотентность и избегать терминальных стадий дифференцировки.

Миеломы состоят из клеток–потомков высокоспециализированных В–лимфоцитов, способных к таким специализированным клеточным синтезам, как продукция иммуноглобулинов. Если предполагать наличие определенной связи между транслокацией  $t(6;12)$  и нарушением событий цитодифференцировки, то речь может идти только о поздних ее этапах.

Не исключено, что присутствие транслокации  $t(6;12)$  в миеломах и ЭГ клеток связано с общим происхождением клеток от линии мышей BALB/c, а также с тем, что для ЭГ клеток этого происхождения присутствие  $t(6;12)$  типично только для исследованной линии клеток ЭГ G1. Выяснение этих вопросов является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в исследованных клеточных популяциях разных пассажей ЭГ G1, несмотря на селекцию в отношении независимости от сывороточных факторов, высокую гетерогенность по сочетанию клеток с разным числом Xp, постоянные процессы генерации популяционно–генетического разнообразия, о чем свидетельствуют широкие спектры робертсоновских транслокаций, а также наличие гипероктаплоидных клеток даже на 75–м пассаже ЭГ клеток G1, эта линия имеет свои кариотипические особенности. К основным из них, по-видимому, относятся высокая частота встречаемости робертсоновских транслокаций (около 2 на клетку), преемственность близости числа Xp к пента– и гексаплоидному набору, а также присутствие транслокации  $t(6;12)$ .

Можно предположить, что выявленные особенности свидетельствуют о наличии линейноспецифичных механизмов генерации генетической изменчивости, необходимой для адаптации клеток к росту в культуральных условиях в недифференцированном состоянии.

Работа выполнена при частичном финансировании Министерства образования и науки Украины (№ Ф18/11–2006).

6. Яцишина А.П., Підпала О.В., Кочубей Т.П., Лукаш Л.Л. Спонтанна каріотипічна еволюція клітин in vitro. Фактори експериментальної еволюції організмів 2004; Київ: КВІЦ: 88–92.

7. Cowell J.K. A photographic representation of the variability in the G–banded structure of the chromosomes in the mouse karyotype. A guide to the identification of the individual chromosomes. *Chromosoma* 1984; 89(4): 294–320.

8. Raz R., Lee C.–K., Cannizzaro L.A. et al. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96(6): 2846–51.

9. Глазко Т.Т. Каріотипічні особливості ряду клональних ліній міжвидової гібридомы мишь–норка. *Цитологія* 1988; 30(5): 597–605.

10. Silva S., Kovalchuk A.L., Kim J.S. et al. *BCL2* Accelerates inflammation–induced balb/c plasmacytomas and promotes novel tumors with coexisting  $t(12;15)$  and  $t(6;15)$  translocations. *Cancer Research* 2003; 63(24): 8656–63.

11. Ivanova N., Dobrin R., Lu R. et al. Dissecting self–renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006; 442(7102): 533–8.

Поступила: 11.06.2007