

Изучение ломкости хромосом в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках человека

Жегло Д.Г.¹, Пожитнова В.О.¹, Адильгереева Э.П.¹, Фефелова Е. И.¹, Кислова А.В.^{1,2}, Демченко А.¹, Устинов К.Д.², Ясиновский М. И.², Воронина Е.С.¹
¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Введение

Изучение генетической стабильности и специфики мутационного процесса в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК) актуально для применения этих клеток в регенеративной медицине, при моделировании генетических заболеваний и в фармакологических исследованиях.

Одним из ведущих факторов мутагенеза в иПСК считается **стресс репликации**, т.е. замедление или остановка продвижения репликационной вилки, потенциально приводящее к локально незавершенной репликации, возникновению разрывов ДНК и перестройкам.

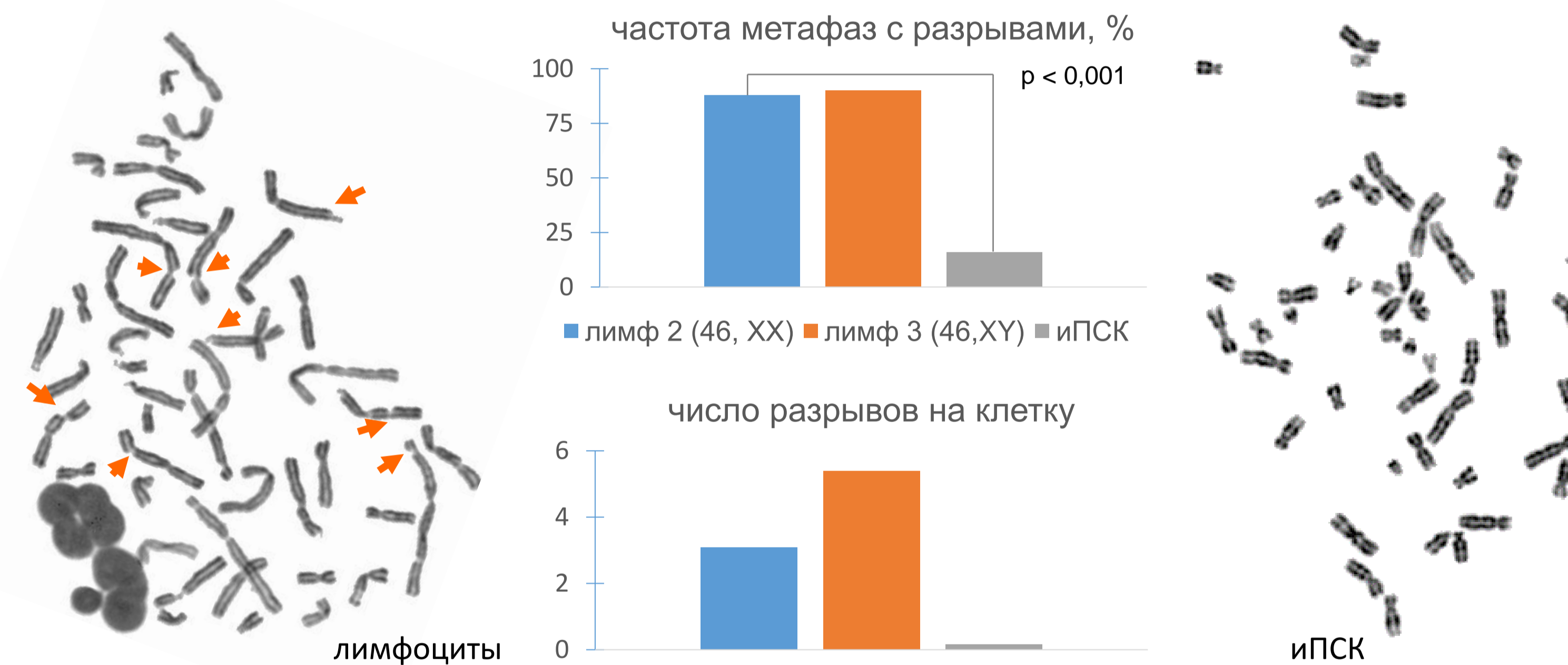
Геномные локусы, наиболее уязвимые к стрессу репликации, называются **конститутивными (common) ломкими сайтами** (кЛС) и могут быть выявлены как повторяющиеся хроматидные и хромосомные разрывы и пробелы на цитогенетических препаратах метафаз при культивировании в условиях стресса репликации. Цитогенетическое картирование кЛС в иПСК через индукцию хромосомных/хроматидных разрывов на метафазных хромосомах осложнено особенностями регуляции клеточного цикла, репарации и апоптоза в этих клетках.

Цель

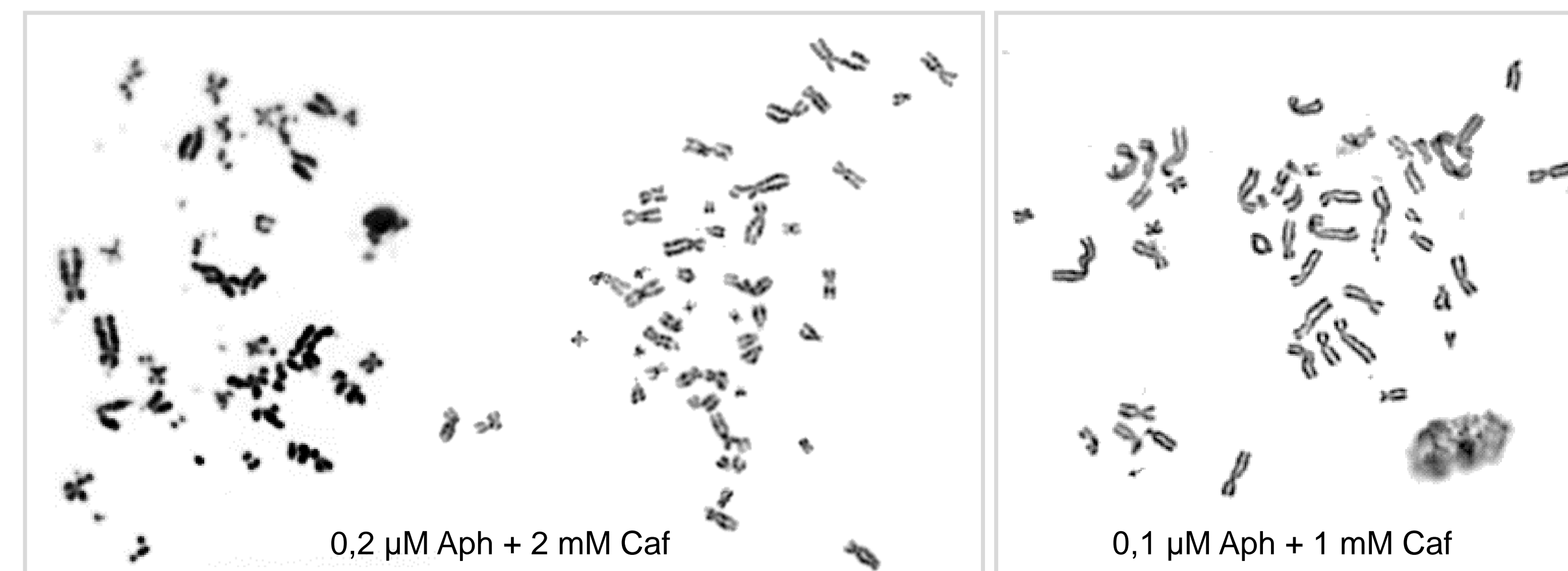
- Поиск условий стресса репликации, индуцирующих хромосомные и хроматидные разрывы в метафазных хромосомах иПСК человека
- цитогенетическое картирование кЛС в иПСК

Результаты

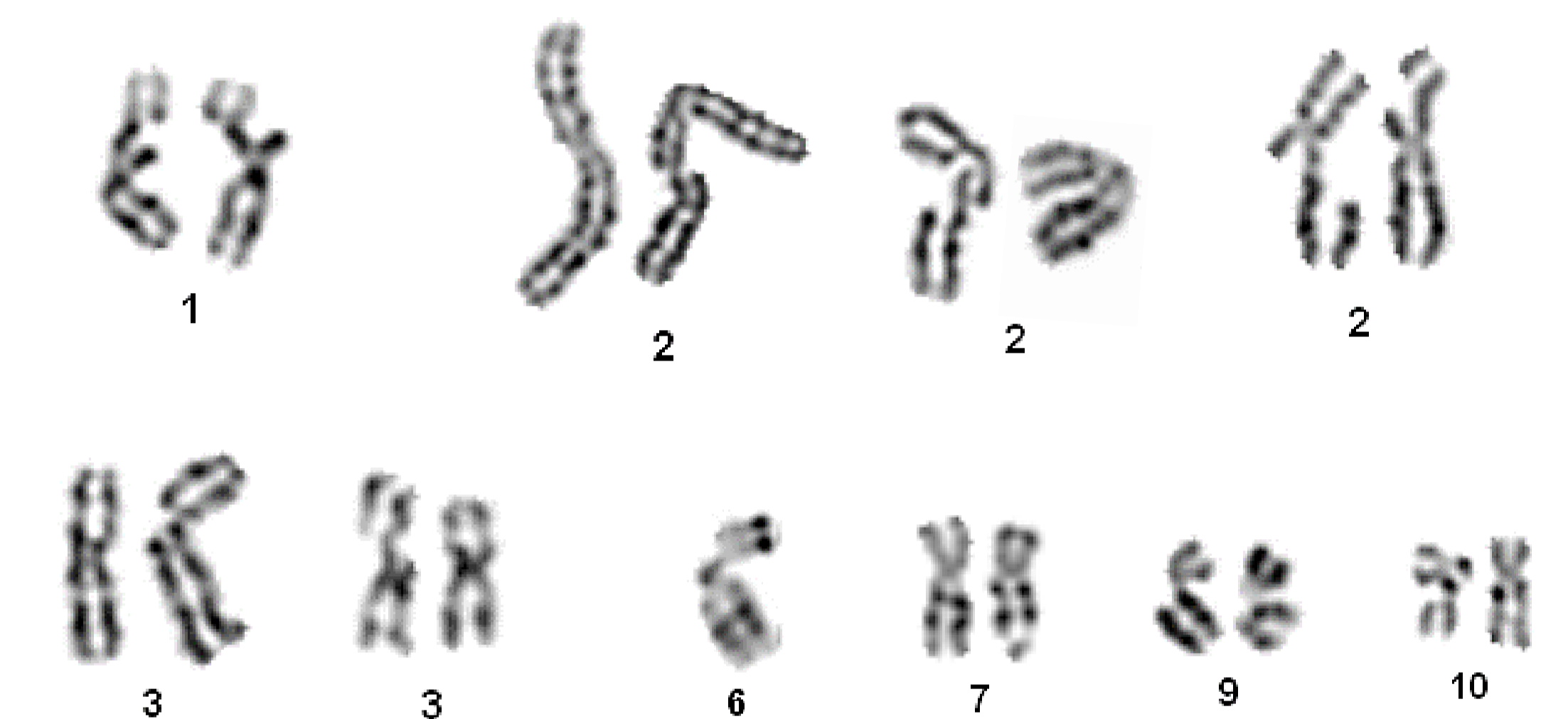
1. Стандартные для большинства дифференцированных клеток условия индукции кЛС (0,4 μ M афидиколин) практически не вызывают хромосомные разрывы в иПСК



2. Добавление к афидиколину комутагена, ингибирующего ATR и ATM, позволило индуцировать ломкость хромосом в иПСК и подобрать оптимальные условия мутагенного воздействия для дальнейшего цитогенетического картирования кЛС



3. Начато цитогенетическое картирование хромосомных и хроматидных разрывов в иПСК



Методы

Культура иПСК получена из фибробластов кожи пациента с муковисцидозом с гомозиготной мутацией *CFTR* F508del с помощью CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit. Клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности tra-1-60, tra-1-81, OKT4, SSEA, Nanog, дифференцируются в три зародышевых листка, имеют нормальный кариотип 46 XY. Клетки культивировали в планшетах, покрытых витронектином, в среде Essential 8™.

За сутки до внесения мутагенов клетки предсинхронизировали истощением среды. Время инкубации с мутагенами в свежей среде составляло 16-22 ч, за 1 ч до фиксации вносили нокодазол. Клетки снимали трипсинизацией, проводили гипотонизацию 0,55% KCl и фиксировали метанолом/ледяной уксусной кислотой. Для рутинного окрашивания хромосом использовали азур-эозин или DAPI, для дифференциального окрашивания использовали DAPI с Д-актиномицином