

УДК 611-013; 57.086.835;577.218

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА SC5, SC6, SC7 и SC3a¹

© 2011 г. А. М. Кольцова¹, О. Ф. Гордеева², Т. А. Крылова¹, Н. В. Лифанцева², А. С. Мусорина¹, Т. К. Яковлева¹, Г. Г. Полянская¹

¹Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

E-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

Поступила в редакцию 21.01.11

Окончательный вариант получен 14.02.11

Большой спектр линий эмбриональных стволовых клеток человека с различными генотипами широко используется в качестве клеточных моделей для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований. Новые линии эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК) SC5, SC6, SC7 и SC3a были получены из предимплантационных бластоцист и поддерживаются на митотически инактивированных фидерных клетках человека. Все полученные линии ЭСК прошли более 120 удвоений клеточной популяции, сохранили нормальный диплоидный кариотип и способность дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Эти линии экспрессируют маркеры недифференцированных ЭСК: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, щелочную фосфатазу. Кроме того, недифференцированные клетки линий SC5, SC6 и SC7 экспрессируют гены *DPPA3/STELLA*, *DAZL*, специфические для линии половых клеток, и не экспрессируют соматические маркеры дифференцировки. Напротив, недифференцированные клетки линии SC3a экспрессируют маркеры внезародышевой энтодермы GATA4 и AFP и не экспрессируют *DPPA3/STELLA* и *DAZL*. Результаты двойного иммунофлуоресцентного окрашивания колоний клеток SC5 и SC3a с помощью антител против Oct-4 и GATA4 показали, что большинство клеток линии SC3a были одновременно позитивны по обоим маркерным факторам. Кроме того, SC5, SC6 и SC7, но не SC3a, образовывали тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков. Эти результаты свидетельствуют о том, что клетки линии SC3a, в отличие от линий SC5, SC6 и SC7, представляют собой клеточную популяцию ранних коммитированных клеток. Кроме того, с помощью иммунофлуоресцентного и ПЦР анализа обнаружена экспрессия гена транспортера множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* в недифференцированных ЭСК всех линий и эмбрионидных тельцах, дифференцирующихся в течение 10 дней, тогда как экспрессия транспортера *ABCB1* выявлена с помощью ПЦР анализа только в дифференцирующихся эмбрионидных тельцах линий SC5, SC6 и SC7. Таким образом, полученные результаты демонстрируют различия в свойствах и потенциале к дифференцировке линий ЭСК SC5, SC6, SC7 и SC3a, которые были получены в разных условиях культивирования.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки человека, экспрессия маркеров, дифференцировка, кариотип.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, являются уникальными плюрипотентными клеточными популяциями *in vitro*, обладающими способностью к самообновлению, т.е. к неограниченной пролиферации, и одновременно способностью дифференцироваться во все типы соматических клеток и в линию половых клеток. Линии ЭСК являются уникальной экспериментальной моделью для фундаментальных исследований в

разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований в области регенеративной медицины, фармакологии и токсикологии.

Первые постоянные линии ЭСК человека были получены в США (Thomson et al., 1998). В настоящее время в разных странах мира существуют уже более 600 постоянных линий ЭСК (Cowan et al., 2004; Inzunza et al., 2005; Oh et al., 2005; Ellerstrom et al., 2006; Chavez et al., 2008; Крылова и др. 2009; Aguilar-Gallardo et al., 2010; Englund et al., 2010; Priddle et al., 2010; Skottman, 2010; Strom et al., 2010). Основные характеристики, которые должна иметь постоянная линия ЭСК человека по крите-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 11-04-00379-а) и Научной программой СПб Научного Центра РАН Государственным Контрактом Минобрнауки РФ № 16.M04.11.0002.

риям регистра Национального Института здоровья (НИН) США, следующие: 1) неограниченная пролиферация клеток, значительно превышающая 60 удвоений клеточной популяции (число Хейфлика); 2) высокая теломеразная активность, обеспечивающая поддержание стабильной длины теломера, необходимую для сохранения высокой пролиферативной активности; 3) нормальный диплоидный кариотип; 4) экспрессия специфических поверхностных эмбриональных антигенов и специфических транскрипционных факторов OCT-4 и NANOG; 5) способность к дифференцировке в производные трех зародышевых листков *in vitro* и *in vivo*.

Для поддержания линий ЭСК человека в недифференцированном плюрипотентном состоянии разработаны различные системы культивирования. Исходно для поддержания самообновления ЭСК человека *in vitro* клеточные линии культивировали на слое фидерных клеток, которые экспрессируют факторы роста, способствующие пролиферации ЭСК и блокирующие их дифференцировку. В качестве фидерных клеток используют фибробласты разного происхождения. В настоящее время многие исследователи используют в качестве фидерных клеток фибробласты человека, чтобы избежать заражения ЭСК человека ретровирусами или другими патогенами грызунов (Martin et al., 2005; Skottman et al., 2006; Kubikova et al., 2009). Было показано, что морфология колоний ЭСК и их гетерогенность в значительной степени зависят от свойств используемого фидера (Skottman, Novatta, 2006; Stewart et al., 2006; Laursen et al., 2007; Richards et al., 2003;).

Многие исследователи разрабатывают бесфидерную систему культивирования с разными бесфидерными субстратами, включающими белки внеклеточного матрикса, при этом в культуральную среду добавляют ростовые факторы и другие агенты, стимулирующие клеточную пролиферацию (Xu et al., 2001; Amit et al., 2004; Rosler et al., 2004; Klimanskaya et al., 2005; Wang et al., 2005; Miyazaki et al., 2008; Promse et al., 2010). Бесфидерные субстраты, как и фидеры, различаются по метаболическим, адгезивным и секреторным функциям, благодаря которым ЭСК человека сохраняют статус пролиферирующих плюрипотентных популяций.

Для потенциального использования ЭСК человека в регенеративных медицинских технологиях необходимо исключить все ингредиенты животного происхождения при культивировании ЭСК, а также исключить любые фидерные клетки как субстрат, свойства которого существенно зависят от условий культивирования. В связи с этим, использование бесфидерных субстратов и среды определенного химического состава без добавок животного происхождения (Liu et al., 2006; Lu et al., 2006;

Ludwig et al., 2006) является необходимым условием технологии получения линий ЭСК, которые будут применяться в дальнейшем при трансплантациях. Недавно появились работы по успешному культивированию ЭСК в суспензионной и 3D системах (Mohr et al., 2006; Amit et al., 2010; Vazin, Freed, 2010; Steiner et al., 2010). Таким образом, в настоящее время продолжается разработка оптимальных технологий для получения и поддержания линий ЭСК человека с учетом их возможного клинического использования в перспективе. Однако несмотря на интенсивные исследования в этой области, оптимальные условия для культивирования линий ЭСК человека, позволяющие сохранять их основные биологические свойства в течение длительного периода, не разработаны до сих пор (Rajala et al., 2007 Hasegawa et al., 2010; Vazin, Freed, 2010).

Известно, что в течение длительного культивирования многие постоянные линии ЭСК претерпевают генетические и эпигенетические изменения в процессе адаптации линии к условиям *in vitro*. Некоторые генетические изменения способствуют злокачественной трансформации ЭСК (Drapet et al., 2004; Heins et al., 2006; Imreh et al., 2006; Baker et al., 2007; Harrison et al., 2007; Spits et al., 2008; Yang et al., 2008; Gopalakrishna-Pillai, Iverson, 2010; Yang et al., 2010). Возможно, изначальная иммортализация ЭСК человека, связанная, в частности, с наличием теломеразной активности, которая является обязательным условием иммортализации большинства типов клеток, также стимулирует начало канцерогенеза. Кроме того, нестабильные условия культивирования также могут приводить к злокачественной трансформации. В связи с перспективой клинического применения ЭСК человека необходима постоянная проверка стабильности генетического аппарата ЭСК.

Несмотря на различные этические и правовые ограничения в разных странах, получение новых постоянных линий ЭСК человека продолжается, т.к. линии ЭСК из разных генетических источников, т.е. бластоцист разных индивидуумов, характеризуются большим генетическим разнообразием. Для широкомасштабных фундаментальных и биомедицинских исследований с использованием ЭСК человека необходимо большое число линий с индивидуальной вариабельностью. Существуют данные, указывающие на различия между линиями и клонами ЭСК, связанные с иммунным и эпигенетическим профилем ЭСК, экспрессией отдельных генов и, в частности, генов, ответственных за разные направления дифференцировки, с морфологией колоний и скоростью роста (Drukker et al., 2002; Abeyta et al., 2004; Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004; Lagarkova et al., 2006; Sidhu and Tuch, 2006; Allegrucci, Young, 2007; Kim et al., 2007; Pal et al., 2009; Tavakoli et al., 2009). Причем выяв-

ленные различия не затрагивают основные характерные свойства, присущие всем линиям ЭСК.

В данной работе мы исследовали характеристики и потенциал к дифференцировке четырех новых линий ЭСК человека, выделенных из предимплантационных бластоцист от разных доноров. В этих линиях была исследована экспрессия генов, специфических для плюрипотентных клеток, а также линий соматических и половых клеток, в процессе дифференцировки *in vitro*. Помимо характеристик новых линий ЭСК, мы изучали характер экспрессии генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости ABCG2 и ABCB1, обеспечивающих в разных клеточных типах, включая и ЭСК, механизм защиты от повреждающих воздействий различных химических факторов (Bhattacharya et al., 2004; Ginis et al., 2004; Sarkadi et al., 2006, 2009; Apati et al., 2008; Pal et al., 2009).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a были использованы не подвергавшиеся заморозке бластоцисты (5–6 день развития), полученные в результате искусственного оплодотворения (*in vitro fertilization* – IVF) и оставшиеся невостребованными при трансплантации. Эмбриональный материал был предоставлен Международным центром репродуктивной медицины (Россия) с согласия доноров.

Внутреннюю клеточную массу (ВКМ) бластоцисты изолировали механически при помощи двух игл от одноразовых стерильных шприцов (23G, BD, Испания). Помещенную в каплю культуральной среды бластоцисту придерживали одной иглой, а при помощи второй освобождали от блестящей зоны (*zona pellucida*) и трофэктодермы. Полученные в результате этого клетки ВКМ переносили на слой митотически инактивированных фидерных клеток. В качестве фидерных клеток использовали постнатальные фибробласты крайней плоти человека (*human foreskin fibroblasts*) (CRL–2429, ATCC) и эмбриональные мезенхимные фибробласты человека (полученные в нашей лаборатории). При культивировании фидерных клеток использовали среды IMDM (Invitrogen, США) и DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone, США). Для блокирования пролиферации монослой фибробластов обрабатывали митомицином-C (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 2.5 часов.

Для получения и культивирования линий ЭСК человека использовали ростовую среду, включающую следующие компоненты: 80% Knockout Dulbecco's modified Eagles medium (Gibco, США), 20%

Knockout Serum Replacement (Gibco, США), 2 mM L-глутамина, 1% заменимых аминокислот NEAA, 0.1 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma), 8 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Chemicon, США). ЭСК человека культивировали в условиях 5% CO₂, 37°C и 90% влажности. Для криоконсервации использовали среду, состоящую из 90% ростовой среды для ЭСК и 10% диметилсульфоксида (Sigma).

Важно отметить, что линию SC3a в течение нескольких пассажей после ее выделения культивировали в атмосфере 5% O₂ вместо обычных 20% O₂. Далее клетки содержали в криоконсервированном состоянии в течение 6 месяцев, затем они были разморожены и поддерживались в условиях, идентичных для остальных трех линий ЭСК SC5, SC6, SC7.

Механический пересев культуры ЭСК осуществляли под контролем микроскопа путем деления колонии на фрагменты при помощи одноразового скальпеля и их переноса на новый слой фидерных клеток. Смену среды проводили ежедневно. Колонии ЭСК пересеивали каждые 5–6 дней.

Для расчета времени удвоения клеточной популяции измеряли площадь не менее 10 колоний в течение 4–5 дней вплоть до окончания логарифмической фазы роста. Колонии ЭСК фотографировали ежедневно при одинаковом увеличении, а их площадь определяли при помощи компьютерной программы WCIF ImageJ.

Кариотипический анализ 4-х клеточных линий ЭСК был проведен на 25-ом пассаже культивирования. Для получения препаратов метафазных хромосом за 4 ч до фиксации в культуру ЭСК вводили колцемид KaryoMAX (0.1 мкг/мл, Gibco), клетки диссоциировали с помощью смеси трипси-на и версена (1 : 3) и проводили гипотоническую обработку смесью 0.075 M раствора KCl и 1% раствора цитрата натрия. Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1, Реактив, Россия). Для количественного кариотипического анализа метафазных пластинок хромосомы окрашивали водным раствором Гимза (1 : 50, Sigma). Модальное число хромосом и пределы изменчивости клеток по числу хромосом определяли при анализе 260 метафаз в SC5, 215 – в SC6, 120 – в SC7 и 110 – в SC3a; долю полиплоидных клеток определяли при анализе 500 метафаз в каждой клеточной линии. Для структурного кариотипического анализа проводили дифференциальное G-окрашивание хромосом в соответствии с ранее описанной методикой (Ozkinay, Mitelman, 1979). Анализировали не менее 30 метафаз в каждой линии ЭСК (30, 55, 50 и 32 в линиях SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно). Кариотипы линий анализировали с помощью микроскопа Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, ФРГ) с системой автоматического ка-

протипирования Ikaros 4 Karyotyping System (Meta-Systems, Germany) и описывали в соответствии с Международной системой для цитогенетической номенклатуры хромосом человека ISCN (2009).

Для характеристики линий ЭСК проводили гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы (FRV-alkaline AP substrate, Sigma) и иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционных факторов с использованием моноклональных антител против Oct-4 (Santa Cruz, США) и Nanog (BD Pharmingen, США). Для видовой идентификации ЭСК проводили иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностных антигенов, свойственных только ЭСК человека, SSEA-4 и TRA-1-60. Для этого использовали моноклональные антитела Mc813-70 (SSEA-4) и TRA-1-60 (Chemicon International, США). Для уточнения статуса линий ЭСК проводили дополнительное двойное окрашивание с использованием антител против транскрипционных факторов Oct-4 и GATA4 (Santa Cruz, США). Для выявления Р-гликопротеина, АТФ-связывающего ABCG2 транспортера были использованы моноклональные антитела VXP-21 (Alexis Biochemical, США). В качестве вторых антител были использованы иммуноглобулины кролика, козы и курицы, конъюгированные с флуоресцеином, FITC (Millipore, США), Alexa 488 и Alexa 594 (Molecular Probes, США).

Для определения активности щелочной фосфатазы, клетки в течение 20 мин фиксировали 4% параформальдегидом, а затем в течение 30 мин обрабатывали BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma) при температуре 37°C. Анализ проводили под световым микроскопом (Nicon eclipse TS 100, Япония).

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре и блокировали неспецифическое связывание 1% раствором бычьего сывороточного альбумина, BSA (Sigma, США), в течение 1 ч. Пермеабиллизацию клеток (для транскрипционных факторов) проводили с использованием 0.1% раствора Triton-X100 при комнатной температуре в течение 15 мин. Инкубирование клеток в растворе первых антител (1 : 50 или 1 : 100) проводили в течение ночи при температуре +4°C, препараты промывали раствором фосфатно-солевого буфера, PBS (Биолот), три раза. Вторые антитела разводили в соотношении 1 : 500 (Millipore, США) или 1 : 800 (Molecular Probes, США) и препараты инкубировали с ними в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. После отмывок препараты докрашивали ядерным красителем Hoechst 33342 (2 мкг/мл, Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали фидерные клетки и ЭСК, обработанные только вторыми антителами. Двойную иммунофлуорес-

центную окраску проводили в соответствии с приведенной выше методикой. Пары первых и вторых антител были подобраны, учитывая возможность совместной инкубации с исключением перекрестных реакций. Анализ проводили под микроскопом Zeiss LSM 5 Pascal.

Для подтверждения плюрипотентности полученных клеточных линий ЭСК кластеры колоний клеток SC5, SC6, SC7 и SC3a индуцировали к спонтанной дифференцировке путем изоляции от фидерных клеток и переноса в культуральные чашки с низкой адгезией (Медполимер, Россия). Образовавшиеся в суспензионной культуре эмбриоидные тельца (ЭТ) культивировали в среде для ЭСК без добавления фактора bFGF в течение 10 дней. ЭТ диссоциировали до единичных клеток, высевали на стекла, покрытые желатином, и культивировали в течение 2 недель в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Для выявления дифференцированных клеток-производных трех зародышевых листков проводили иммуногистохимический анализ экспрессии маркерных белков. Для определения экспрессии маркеров, ассоциированных с дифференцировкой в производные трех зародышевых листков, использовали первые антитела против β -тубулина III (разведение 1 : 50; Sigma) и нестина (1 : 50; Chemicon), характеризующих клетки эктодермального происхождения, α -фетопротеина (AFP, 1 : 50; Sigma), характеризующего энтодермальные клетки, и α -актина (1 : 50; Sigma), характеризующего клетки мезодермального происхождения. Иммунофлуоресцентный анализ проводили по методу, описанному выше.

Для изучения потенциала полученных линий ЭСК человека к дифференцировке *in vivo* был использован метод получения экспериментальных тератом. В качестве реципиентов использовали иммунодефицитных мышей (Nu/Nu) из питомника "Пушино" (Филиал Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова). Все протоколы по работе с животными одобрены Комитетом по биоэтике ИБХ РАН. Кластеры колоний ЭСК человека (1–2 $\times 10^6$) инъецировали мышам подкожно. Через 12 недель экспериментальных животных усыпляли и извлекали развившиеся тератомы. Образцы опухолевой ткани фиксировали в фиксаторе Буэна и заключали в парафин для дальнейшего приготовления гистологических срезов. Полученные гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином (Sigma, США).

Для анализа генной экспрессии тотальную РНК из недифференцированных ЭСК и ЭТ выделяли с использованием TRIzol® Reagent (Invitrogen) по протоколу, рекомендованному производителем. Каждый образец РНК обрабатывали ДНКазой (Ambion, США) для предотвращения конта-

Структура праймеров, используемых для анализа генной экспрессии

Ген	Размер (пн)	Прямой и обратный праймеры	Номер последовательности GenBank
<i>OCT4/POU5F1</i>	259	5'gggtggaggaagctgacaac3' forward 5'gcatagtcgctgcttgatcg3' reverse	NM_002701 NM_203289
<i>NANOG</i>	368	5'tgcctcacacggagactgtc3' forward 5'ctgcgtcacaccattgctattc3' reverse	NM_024865
<i>DPPA3</i>	520	5'gcctagtgtgtgtcaagac3' forward 5'ggtgcaagaataagatttatggc3' reverse	NM_199286
<i>DAZL</i>	480	5'catcctcctccaccacagtt3' forward 5'aagcattgcccgacttcttc3' reverse	NM_001351
<i>GATA4</i>	352	5'tcceaaccagaaaacggaag3' forward 5'aagaccaggtgttccaaga3' reverse	NM_002052
<i>AFP</i>	312	5'ggcctcttccagaaacta3' forward 5'tttcatccaccaccaagctg3' reverse	NM_001134
<i>BRY</i>	353	5'agcatcccttgctcacacct3' forward 5'acattctaggggagagca3' reverse	NM_003181
<i>PAX6</i>	346/304	5'cagaagatttagagctagc3' forward 5'gaagaactctgtttattgatgac3' reverse	NM_000280 NM_001604 NM_001127612
<i>ABCG2</i>	160	5'tacctgtatagtgacttcat3' forward 5'ggtcatgagaagtgttgcta3' reverse	NM_004827
<i>ABCB1</i>	541	5'gcctggcagctggaagacaaatac3' forward 5'ccataccagaaggccagagcataa3' reverse	NM_000927
<i>RPL19</i>	326	5'agggtacagccaatgccga3' forward 5'cctggataaagtcttgatgac3' reverse	NM_000981

минации геномной ДНК. Для синтеза кДНК библиотек использовали 0.5 мкг тотальной РНК из каждого клеточного образца, ревертазу RevertAid M-MuLV и случайные олигонуклеотидные последовательности (random hexamer oligonucleotide primers) в соответствии с протоколом производителя (Fermentas, Канада/Литва). Пробы для ПЦР-реакции были подготовлены в соответствии с протоколом производителя Taq ДНК-полимеразы (Silex, Россия). Температура отжига праймеров была адаптирована к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары праймеров. ПЦР-анализ экспрессии изучаемых генов проводили на амплификаторе Eppendorf (Германия) по следующей программе: начальная денатурация: 94°C – 5'; отжиг праймеров: 45"; элонгация: 72°C – 45"; денатурация 94°C – 45", 35 циклов; завершающее удлинение цепи: 72°C – 5'. Библиотеки кДНК из разных образцов нормализовали по уровню экспрессии гена общего метаболизма рибосомального белка RPL19. Последовательности использованных праймеров сконструированы на основе данных GenBank, размеры ПЦР-продуктов приведены в таблице.

Все представленные характеристики новых линий ЭСК были получены в интервале 25–30 пассажей (более 120 удвоений клеточной популяции).

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы, $P < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При получении линий ЭСК всего было использовано 20 бластоцист. После изоляции клетки ВКМ из 4-х бластоцист прикрепились к фидерному слою, начали активно пролиферировать и образовали колонии, типичные для ЭСК человека. Для поддержания линий ЭСК SC5, SC6 и SC7 их культивировали на фидере из мезенхимных клеток эмбриона человека. Линию SC3а культивировали на постнатальных фибробластах крайней плоти человека. Все клеточные линии ЭСК прошли более 120 удвоений клеточной популяции. Среднее время одного удвоения клеточной популяции для этих линий составляет: 28.2 ± 0.6 ч; 21.0 ± 0.6 ч; 24.0 ± 2.4 ч и 22.5 ± 1.4 для SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно. Для линии SC5 время удвоения было достоверно больше, чем для SC6 и SC3а ($P < 0.01$). Ранее в литературе также были описаны различия между линиями ЭСК человека по этому параметру (Cowan et al., 2004).

Количественный кариотипический анализ полученных линий SC5, SC6, SC7 и SC3а показал,

что эти линии характеризуются высокой частотой клеток с модальным числом хромосом, равным 46 (98.0 ± 0.9 ; 98.6 ± 0.8 ; 99.2 ± 0.8 и $99.0 \pm 0.9\%$), и низкой долей полиплоидных клеток (0.2 ± 0.2 ; 2.8 ± 0.7 ; 3.0 ± 0.8 ; $1.0 \pm 0.9\%$, соответственно). Структурные изменения хромосом были выявлены в 3 из 50 проанализированных клеток только в линии SC7: парацентрическая инверсия хромосомы 10 inv(10)(q11.2q24) в одной клетке и аномальный характер G-бандирования коротких плеч хромосом 1 и 7 в двух других метафазах (рис. 1, в). Измененный рисунок дифференциального G-окрашивания короткого плеча хромосомы 1, по-видимому, является результатом парацентрической инверсии [inv(1)(p21~22p36.1)], сопровождаемой дупликациями хромосомного материала. Хромосомная нестабильность, наблюдаемая при G-окрашивании, FISH анализе и использовании молекулярных методов наиболее часто связана с анеуплоидией, дупликациями, делециями и транслокациями, тогда как инверсии наблюдаются значительно реже (Cowan et al., 2004). Обнаруженные нами структурные хромосомные изменения носят единичный характер в изученных пластинках 50 клеток, тем более, что рекомендуемая выборка для G-кариотипирования составляет 20 метафаз, из которых нормальными должны быть не менее 90% (Meisner, Johnson, 2008). Наши результаты свидетельствуют, что частота нормальных метафаз в SC7 линии составляет 94.0%. Только дальнейшее культивирование этих клеток может определить, случайны эти изменения или существенны для клеточной популяции. Таким образом, судя по характеру дифференциального G-окрашивания хромосом при уровне разрешения 400–550 дисков на гаплоидный набор хромосом, кариотипы клеточных линий ЭСК не имели отличий от нормального кариотипа человека 46XX – SC5, SC6 и SC3a и 46XY – SC7 (рис. 1).

Для подтверждения сохранения плюрипотентного статуса полученных линий ЭСК при длительном культивировании был проведен гистохимический анализ активности щелочной фосфатазы (рис. 2) и иммунофлуоресцентный анализ экспрессии транскрипционных факторов Oct-4, Nanog и поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1-60 (рис. 3, а–л, м–у). Как показали результаты этих тестов, все линии экспрессируют маркерные факторы, которые являются ключевыми для плюрипотентных клеток человека (Draper et al., 2002; Ginis et al., 2004).

Как было отмечено выше, основным характеристикой ЭСК является плюрипотентность, т.е. способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты по изучению потенциала к дифференцировке *in vitro* показали, что все четыре линии ЭСК человека способны дифференцироваться в клетки экто-, эндо- и мезо-

дермального происхождения. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил присутствие белков, специфических для клеток-производных трех зародышевых листков (рис. 4).

Результаты исследования экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и дифференцированных клеток различных типов, в процессе дифференцировки полученных линий ЭСК *in vitro* представлены на рис. 5. В нашей работе мы исследовали экспрессию генов *OCT4*, *NANOG*, генов *GATA4*, *AFP*, *BRY*, *PAX6*, специфических для соматических клеток-производных трех зародышевых листков, а также генов, специфичных для линии половых клеток, *DPPA3/STELLA*, *DAZL*. Было обнаружено, что недифференцированные клетки линий ЭСК SC5, SC6 и SC7 экспрессируют *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL* и не экспрессируют гены-маркеры соматических клеток. Как показал ПЦР-анализ, в процессе дифференцировки ЭТ, образованных клетками этих линий, увеличивается экспрессия генов *GATA4* и *AFP*, специфических для внезародышевой и зародышевой энтодермы, и генов *BRY* и *PAX6*, специфических для ранних мезодермальных и нейроэктодермальных клеток соответственно. В то же время уровень экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *DPPA3/STELLA* и *DAZL*, специфических для плюрипотентных клеток и линии половых клеток, постепенно снижался.

Анализ транскрипционных профилей ЭСК линии SC3a показал, что в недифференцированных клетках и в дифференцирующихся ЭТ экспрессируются не только гены *OCT4* и *NANOG*, но также выявляется и низкий уровень экспрессии гена *GATA4* (рис. 5). Более того, экспрессия генов *DPPA3/STELLA* и *DAZL*, специфичных для линии половых клеток, не была выявлена ни в одном из анализируемых вариантов. Кроме этого, экспрессия гена *AFP* была обнаружена как в недифференцированных клетках, так и в дифференцирующихся ЭТ, что свидетельствует о присутствии в колониях коммитированных клеток внезародышевой энтодермы (рис. 5). Выявленные нами различия в транскрипционных профилях изучаемых линий ЭСК человека были также подтверждены с помощью сравнительного иммунофлуоресцентного анализа колоний клеток линий SC3a и SC5 при двойном окрашивании колоний моноклональными антителами против транскрипционных факторов Oct-4 и *GATA4* (рис. 6). Показано, что во всех проанализированных колониях линии SC3a, в отличие от линии SC5, все клетки одновременно экспрессируют Oct-4, и *GATA4*. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки в колониях линии SC3a, в отличие от остальных линий, являются преимущественно коммитированными в направлении дифференцировки во внезародышевую энтодерму. Таким образом, из полученных результатов по изучению транскрипционного профиля маркерных генов следует, что линии SC5, SC6, SC7

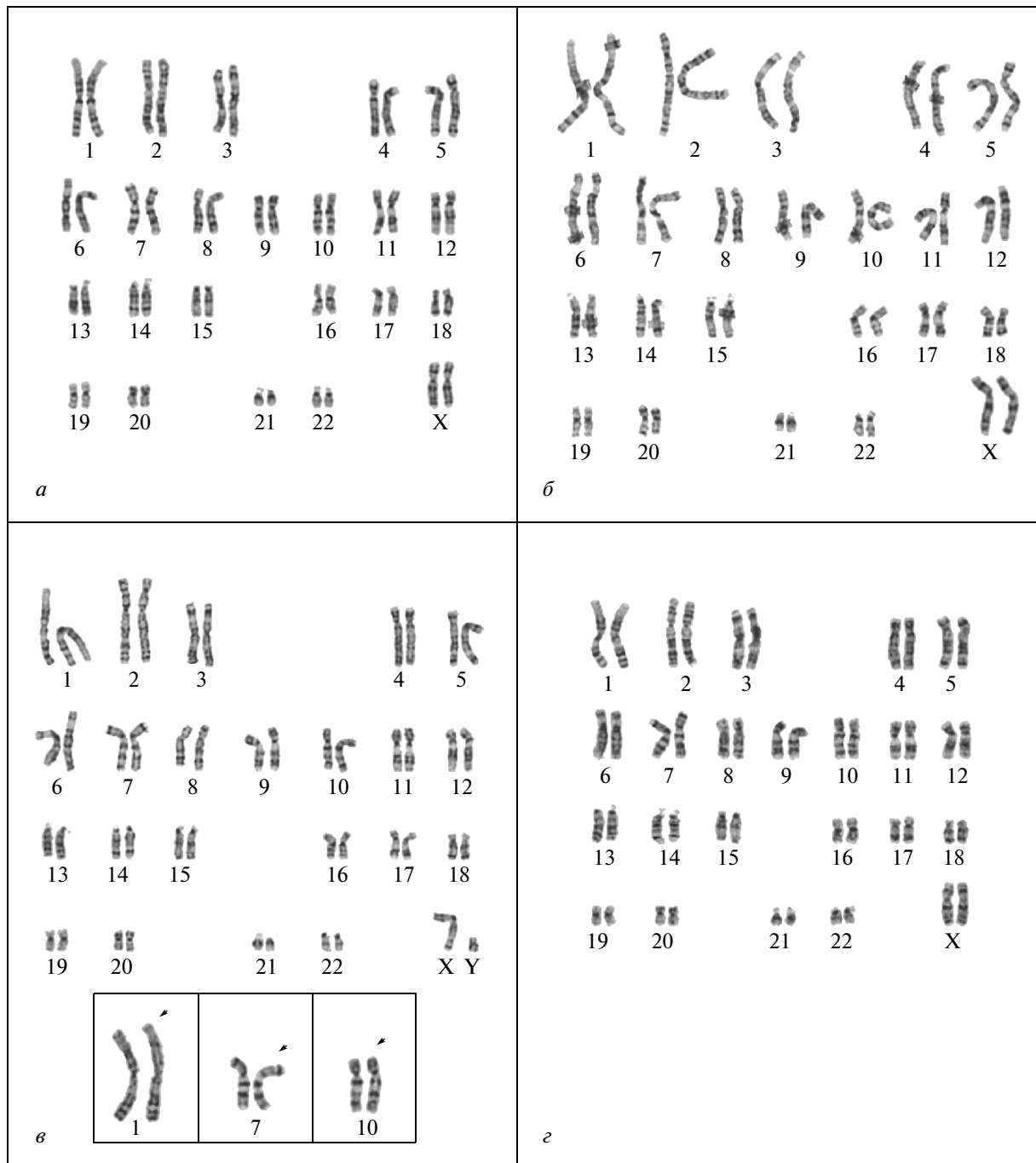


Рис. 1. Кариотипы линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3a.

a – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC5; *б* – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC6; *в* – нормальный 46XY кариотип клеточной линии SC7, в рамках случайные структурные хромосомные перестройки: аномальное G-бандирование 1p(*a*), 7p(*б*) и *inv*(10)(q11.2q24); *з* – нормальный 46XX кариотип клеточной линии SC3a.

удовлетворяют критериям для плюрипотентных линий ЭСК, тогда как линию SC3a можно рассматривать как самую раннюю стадию дифференцировки ЭСК.

Наши эксперименты по изучению потенциала полученных линий ЭСК к дифференцировке *in vivo* показали, что после трансплантации клеток

всех четырех линий иммунодефицитным мышам тератомы развивались только в линиях SC5, SC6, SC7. Гистологический анализ тератом выявил присутствие разных типов дифференцированных соматических клеток, являющихся производными эктодермы, мезодермы и энтодермы: клетки ороговевающего эпителия, гладкомышечные клетки,

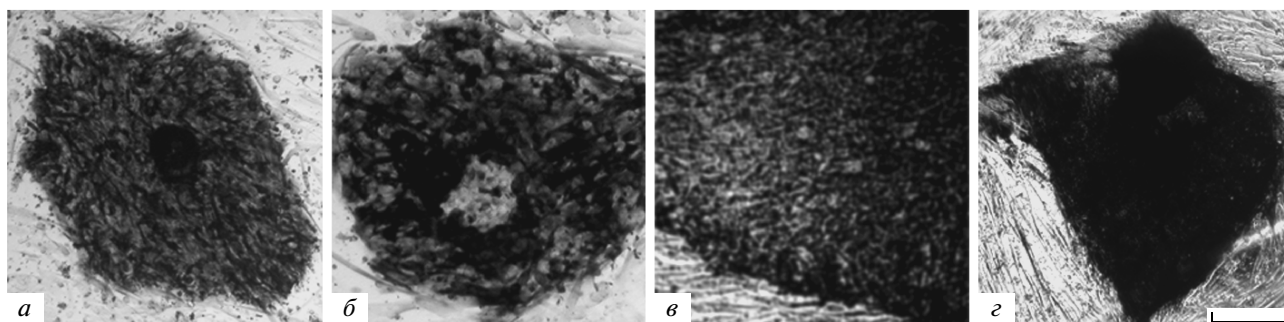


Рис. 2. Гистохимический анализ экспрессии щелочной фосфатазы в недифференцированных ЭСК человека. *а–г* – колонии линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно. Бар, 150 мкм.

клетки соединительной и жировой тканей, секретирующие эпителиальные клетки в зачатках крипт кишечника (рис. 7). Однако в тех же условиях эксперимента клетки линии SC3а не образовывали тератомы. Этот тест также демонстрирует различия в потенциале клеток линий SC5, SC6, SC7 и линии SC3а. Первые три линии обладают способностью дифференцироваться в производные трех зародышевых листков как *in vitro*, так и *in vivo*, тогда как линия SC3а имеет ограниченный потенциал к дифференцировке.

Для изучения механизмов, предохраняющих ЭСК человека от различных стрессорных факторов *in vitro*, мы также исследовали экспрессию генов транспортеров множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* и *ABCB1* во всех полученных линиях ЭСК. С помощью ПЦР-анализа была исследована экспрессия генов *ABCG2* и *ABCB1* в недифференцированных клетках и дифференцирующихся эмбрионидных тельцах (рис. 8). Экспрессия мРНК *ABCG2* транспортера наблюдалась во всех линиях на всех изученных стадиях. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ также выявил экспрессию *ABCG2* и на уровне белка (рис. 9). Полученные данные согласуются с результатами других авторов, также выявивших экспрессию гена *ABCG2* в ЭСК человека, как на уровне мРНК, так и на уровне белка (Bhattacharya et al., 2004; Ginis et al., 2004; Apati et al., 2008; Sarkadi et al., 2009; Pal et al., 2009).

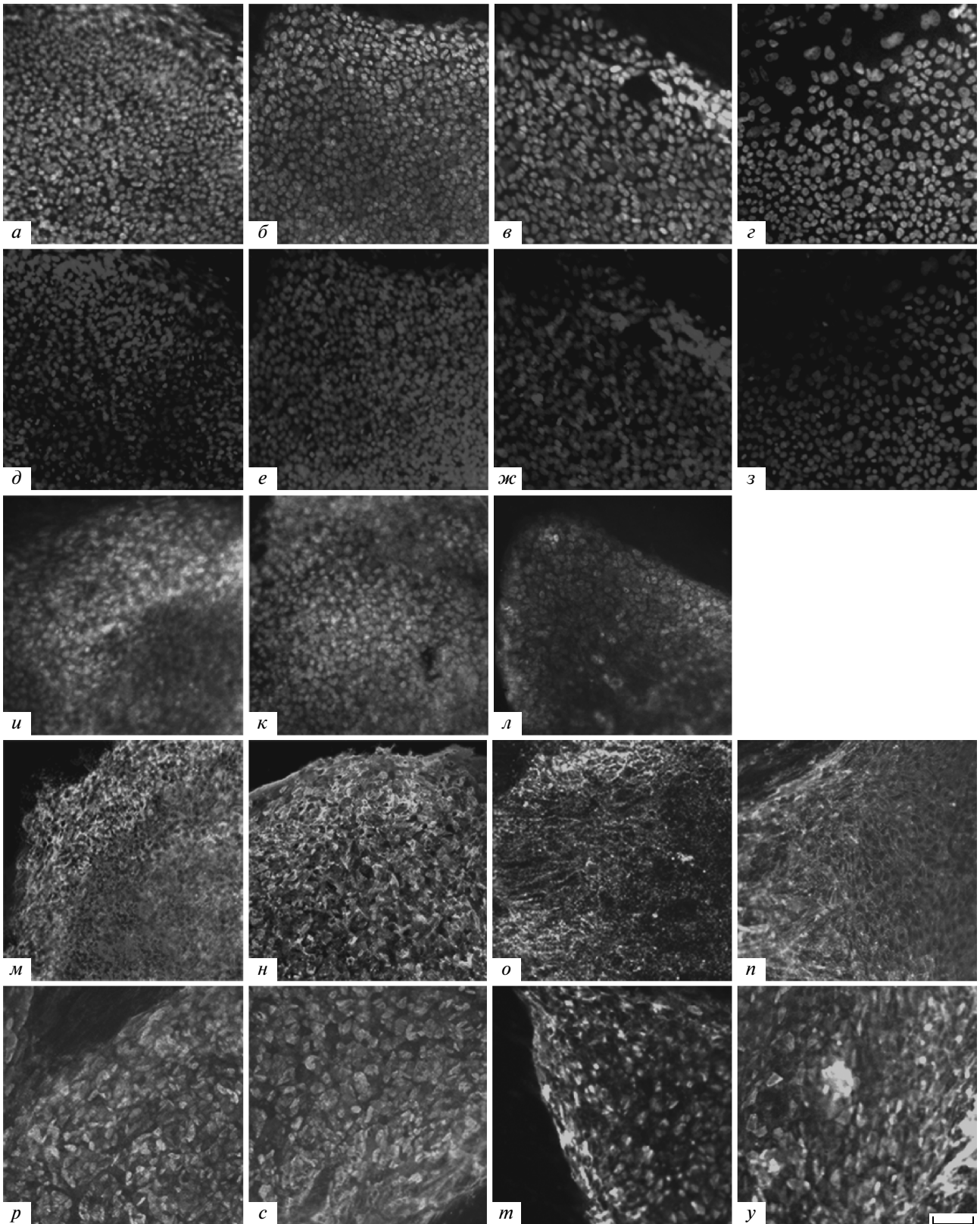
Существенно более низкий уровень экспрессии был обнаружен для гена транспортера *ABCB1* и только в трех клеточных линиях – SC5, SC6 и SC7. Экспрессия гена *ABCB1* транспортера не была выявлена в линии SC3а, в линии SC6 она имела место

на всех изученных стадиях, в линии SC5 только в дифференцирующихся ЭТ, а в SC7 она наблюдалась только на 10-е сут дифференцировки ЭТ. Кроме того, уровень экспрессии этого гена значительно повышался в процессе дифференцировки ЭТ (рис. 8). В работе Апати и др. (Apati et al., 2008) с помощью ПЦР-анализа также была выявлена экспрессия *ABCB1* транспортера в ЭСК человека. Однако иммунофлуоресцентный анализ с помощью моноклональных антител и анализ функционального действия этого транспортера не обнаружил экспрессии *ABCB1* на посттрансляционном уровне. В связи с низким уровнем экспрессии мРНК *ABCB1* мы не проводили иммунофлуоресцентный анализ его экспрессии, поэтому можно только констатировать наличие некоторых межлинейных различий между линиями SC5, SC6, SC7 и SC3а по экспрессии *ABCB1* и только на транскрипционном уровне. Необходимо отметить, что мРНК *ABCB1* транспортера экспрессируется в ЭСК человека на очень низком уровне и в некоторых случаях, возможно, он ниже уровня чувствительности используемого метода при описанных условиях. Поэтому наблюдаемые различия могут отражать как реальную межлинейную изменчивость, так и следствие конкретных условий культивирования этих линий. Возможно, функционирование этого транспортера в ЭСК человека проявляется не во всех условиях культивирования.

Следует отметить, что наблюдаемые различия между линиями SC5, SC6, SC7 и SC3а могут быть связаны с разными исходными условиями культивирования этих линий. Так, при получении и культивировании линий SC5, SC6 и SC7 мы использовали систему культивирования с высоким содер-

Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии маркеров плюрипотентных клеток в недифференцированных ЭСК человека линий SC5, SC6, SC7 и SC3а.

а–г – окрашивание колоний клеток антителами против Oct4 линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *д–з* – окрашивание Хехстом 33342 соответствующих колоний *а–г*; *и–л* – окрашивание антителами против Nanog колоний клеток линий SC5, SC6, и SC7 соответственно; *м–п* – окрашивание антителами против SSEA-4 колоний ЭСК линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *р–у* – окрашивание колоний клеток моноклональными антителами против TRA-1-60 линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; Бар, 50 мкм.



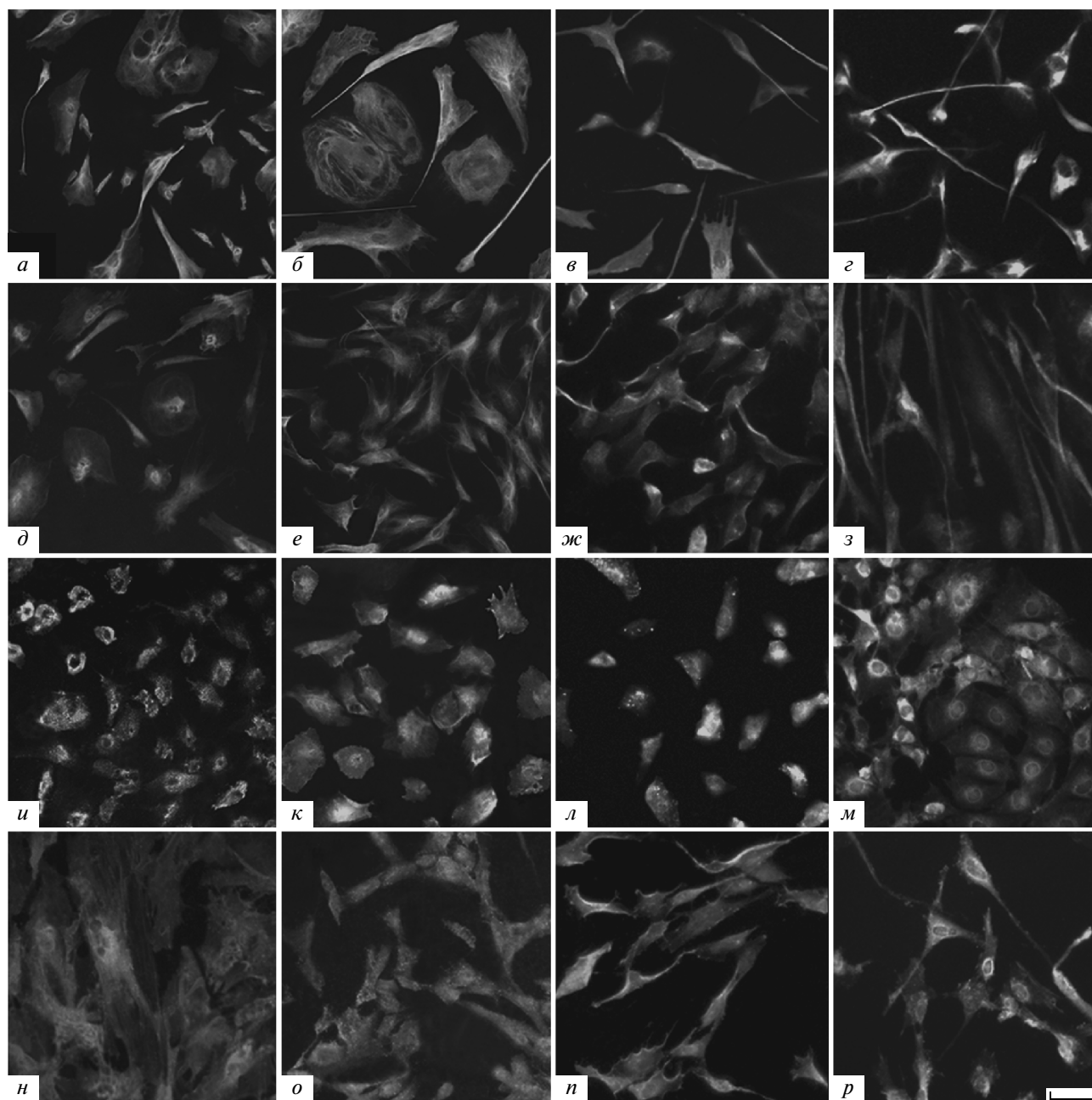


Рис. 4. *In vitro* дифференцировка линий ЭСК человека.

a–г и *д–з* – окрашивание клеток моноклональными антителами против нестина и β -тубулина III (маркеры эктодермы) линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *и–м* – окрашивание моноклональными антителами против α -фетопротейна (энтодермальный маркер) клеток линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно; *н–р* – окрашивание моноклональными антителами против α -актина (маркер мезодермы) клеток линий SC5, SC6, SC7 и SC3а соответственно. Бар, 50 мкм.

жанием кислорода (20%), в то время как при получении линии SC3а сразу после выделения из бластоцисты клетки ВКМ культивировали в атмосфере 5% O_2 . В ряде работ было рекомендовано снижение уровня кислорода до 4–5% с целью приближения к физиологическим условиям организма, которые способствуют стабилизации характеристик ЭСК (Ezashi et al., 2005; Forsyth et al., 2006).

Через несколько пассажей популяция предшественников линии SC3а была разделена на две части. Одна часть клеток была заморожена, а из другой части клеточного материала в условиях пониженной концентрации кислорода была получена линия SC3, которая обладала способностью к самообновлению и, согласно результатам иммунофлуоресцентного анализа, сохраняла плюрипо-

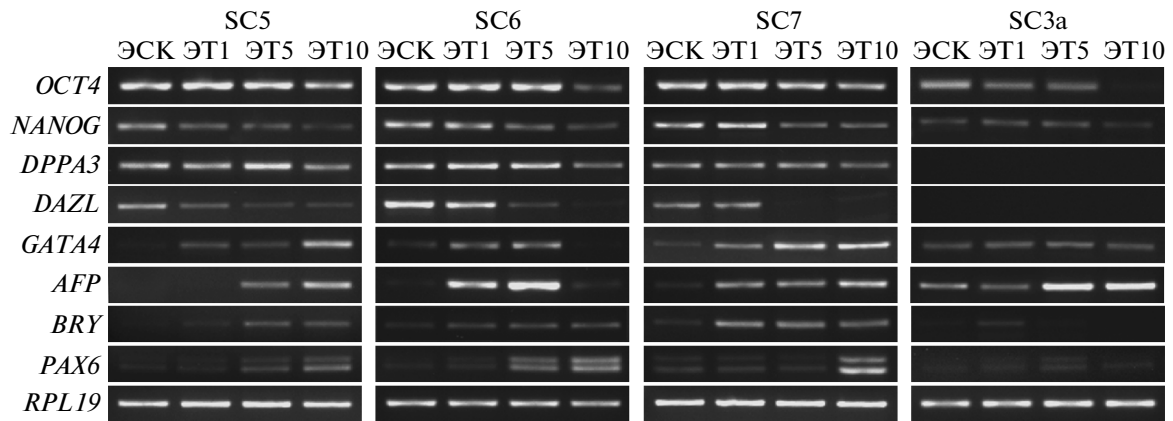


Рис. 5. Транскрипционный профиль недифференцированных ЭСК человека и эмбрионных телец (ЭТ) на 1, 5 и 10 сут дифференцировки линий SC5, SC6, SC7 и SC3a.

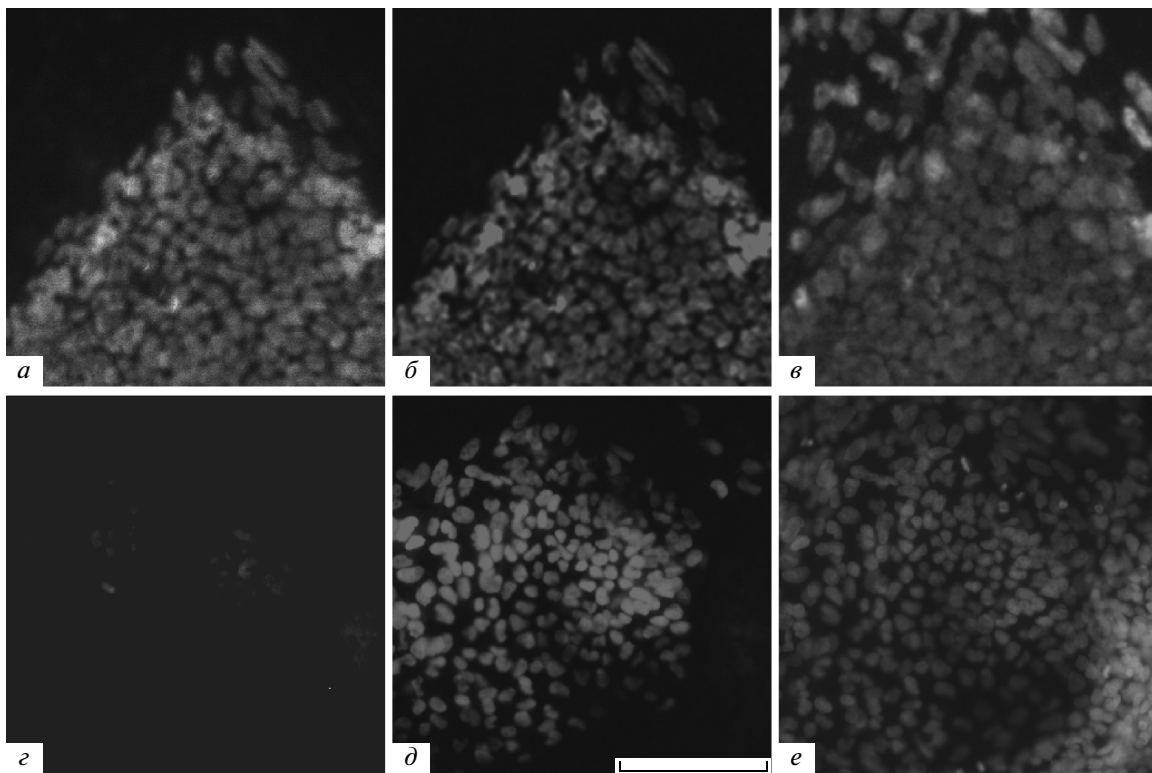


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Oct4 и GATA4 в линиях SC3a и SC5.

Окрашивание колоний клеток SC3a (a, б) и SC5 (г, д) моноклональными антителами против GATA4 и Oct4 соответственно; окрашивание ядер тех же колоний Хехстом 33342 (в, е). Бар, 100 мкм.

тентность при культивировании *in vitro* (Крылова и др., 2009). Однако при изменении условий культивирования, связанных с увеличением концентрации кислорода до 20%, клетки этой линии потеряли способность к активной пролиферации, причем эти изменения были необратимыми. Тем не менее, ЭСК, которые были декриоконсервированы на ранних пассажах после культивирования в атмосфере 5% O₂, оказались способными к росту

после размораживания и активному самообновлению при культивировании в атмосфере 20% O₂ до получения постоянной линии SC3a. Однако клетки данной линии имеют ряд отличий от трех других линий ЭСК. Причем, несмотря на селекцию недифференцированных клеток, проводящуюся при каждом механическом пересеве ЭСК, колонии линии SC3a, тем не менее, поддерживают устойчивую структуру с преобладанием коммити-

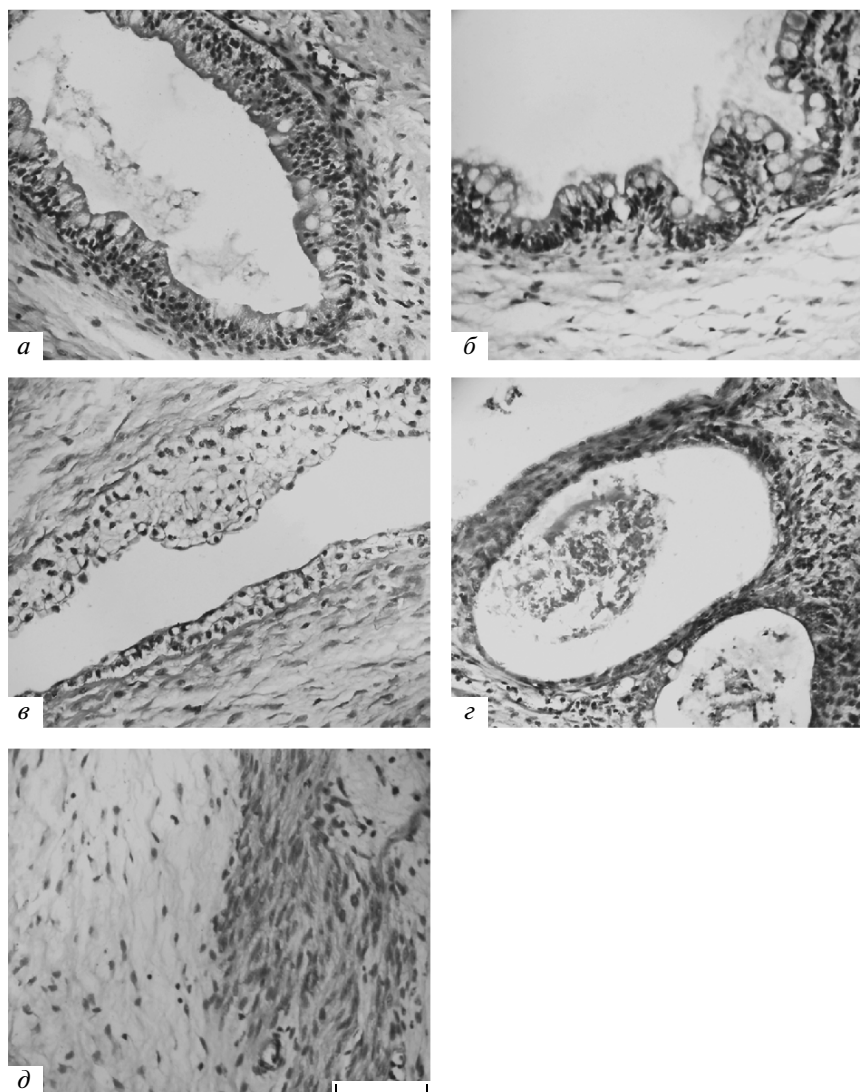


Рис. 7. Дифференцировка *in vivo* линий ЭСК человека в производные трех зародышевых листков в экспериментальных тератомах.

a, б – секреторный эпителий кишечного типа в зачатках кишечных крипт; *в* – клетки соединительной и жировой ткани; *г* – клетки ороговевающего эпителия; *д* – гладкомышечные клетки; в качестве примера представлена линия SC7. Бар, 100 мкм.

рованных клеток, которые, подобно недифференцированным клеткам, активно делятся, как показали наши данные по изучению скорости роста *in vitro* и данные кариотипического анализа этой линии ЭСК. Интересно отметить, что структура кариотипа линии SC3a не изменилась при переходе из одной системы культивирования в другую. Ранее в работах по клонированию ЭСК было показано восстановление гетерогенности в процессе роста колонии ЭСК человека в линиях H9 и H1. Так, в процессе роста колонии из одной клетки, экспрессирующей поверхностный антиген SSEA-3, также быстро возникали и SSEA-3-негативные клетки (Stewart et al., 2006). Таким образом, гетерогенность клеток в колониях является характерной

особенностью линий ЭСК, в отличие от ЭСК мыши. Вероятно, на самых ранних этапах образования линии ЭСК человека в определенных условиях культивирования устанавливается ее статус, который в большей или меньшей степени отличается от статуса клеток ВКМ бластоцисты. Изменение системы культивирования может приводить к необратимым изменениям характерных свойств или кариотипа линии ЭСК и, как следствие, ее потенциала к дифференцировке. Недавно было показано, что при получении и дальнейшем культивировании ЭСК человека в условиях с низким содержанием кислорода не происходит преждевременная и необратимая инактивация X-хромосомы, которая имеет место в линиях ЭСК человека, поддер-

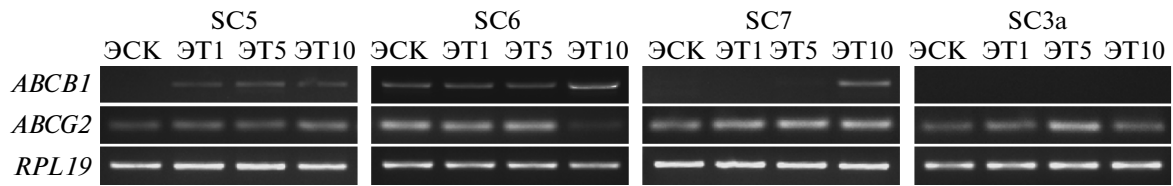


Рис. 8. Экспрессия генов транспортеров *ABCG2* и *ABCB1* в недифференцированных ЭСК человека и в эмбрионидных тельцах (ЭТ) на 1, 5 и 10 сут дифференцировки линий SC5, SC6, SC7 и SC3a.

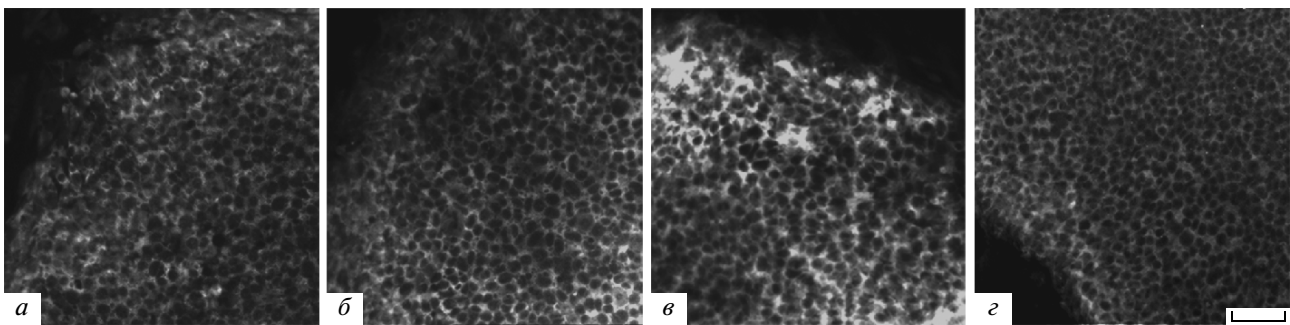


Рис. 9. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии гена транспортера множественной лекарственной устойчивости *ABCG2* в линиях ЭСК человека.

a–г – колонии линий ЭСК человека SC5, SC6, SC7 и SC3a соответственно. Бар, 65 мкм.

живаемых в традиционных системах культивирования с высоким содержанием кислорода (Lengner et al., 2010). Таким образом, полученные разными исследователями данные свидетельствуют о том, что характеристики и потенциал к дифференцировке линий ЭСК человека в значительной мере зависят от используемой системы культивирования, которая является искусственной нишей для ЭСК, обеспечивающей их стабильность. Изменение условий культивирования может привести к необратимому нарушению статуса линии.

Авторы выражают благодарность проф. Н.Н. Мамаеву и Т.Л. Гиндиной (СПб, Медицинский университет им. И.П. Павлова) за возможность использования Ikaros4 Karyotyping System for transmitted light (MetaSystems, Germany).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крылова Т.А., Кольцова А.М., Зенин В.В. и др. Характеристики и специфические особенности новых линий эмбриональных стволовых клеток человека // Цитология. 2009. Т. 51. № 7. С. 565–576.
- Abeyta M.J., Clark A.T., Rodrigues R.T. et al. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem lines // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. P. 601–608.
- Aguilar-Gallardo C., Poo M., Gomez E. et al. Derivation, characterization, differentiation, and registration of seven human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on human feeder // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2010. V. 46. P. 317–326.
- Allegrucci C., Young L.E. Differences between human embryonic stem cell lines // Hum. Reprod. Update. 2007. V. 13. P. 103–120.
- Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. Feeder and serum free culture of human embryonic stem cells // Biol. Reprod. 2004. V. 70. P. 837–845.
- Amit M., Chebath J., Margulets V. et al. Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells // Stem Cell Rev. 2010. V. 6. P. 248–259.
- Apati A., Orban T.I., Varga N. et al. High level functional expression of the *ABCG2* multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells // Biochimica et Biophysica Acta. 2008. V. 1778. P. 2700–2709.
- Baker D.E., Harrison N.J., Maltby E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vitro // Nature Biotechnol. 2007. V. 25. P. 207–215.
- Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R. et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature // Blood. 2004. V. 103. P. 2956–2961.
- Carpenter M.K., Rosler E.S., Fisk G.J. et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system // Dev. Dyn. 2004. V. 229. P. 243–258.
- Chavez S.L., Meneses J.J., Nguyen N.M. et al. Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions // Stem Cells Dev. 2008. V. 17. P. 535–546.
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. New Engl. J. Med. 2004. V. 350. P. 1353–1356.

- Draper J.S., Smith K., Gokhale P. et al.* Recurrence gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 53–54.
- Drukker M., Katz G., Urbach A. et al.* Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 9864–9869.
- Ellerstrom C., Strehl R., Moya K. et al.* Derivation of a xenofree human ES cell line // *Stem cells.* 2006. V. 24. P. 2170–2176.
- Englund M.C., Caisander G., Noaksson K. et al.* The establishment of 20 different human embryonic stem cell lines and subclones; a report on derivation, culture, characterisation and banking // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 217–230.
- Ezashi T., Das P., Roberts R.M.* Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cell // *Proc. Natl. Acad. USA.* 2005. V. 102. P. 4783–4788.
- Forsyth N.R., Musio A., Vezzoni P. et al.* Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities // *Cloning and Stem Cells.* 2006. V. 8. P. 16–23.
- Ginis I., Luo Y., Takumi M. et al.* Differences between human and mouse embryonic stem cells // *Dev. Biol.* 2004. V. 269. P. 360–380.
- Gopalakrishna-Pillai S., Iverson L.E.* Astrocytes derived from trisomic human embryonic stem cells express markers of astrocytic cancer cells and premalignant stem-like progenitors // *BMC Med. Genomics.* 2010. V. 3. P. 12–30.
- Harrison N.J., Baker D., Andrews P.W.* Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy // *Int. J. Androl.* 2007. V. 30. P. 275–281.
- Hasegawa K., Pomeroy J.E., Pera M.F.* Current technology for the derivation of pluripotent stem cell lines from human embryos // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. P. 521–531.
- Heins N., Lindahl A., Karlsson U. et al.* Clonal derivation and characterization of human embryonic stem cell lines // *J. of Biotechnology.* 2006. V. 122. P. 511–520.
- Imreh M.P., Gertow K., Cederwall J. et al.* In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells // *J. Cell Biochemistry.* 2006. V. 99. P. 508–516.
- Inzunza J., Gertow K., Stromberg M.A. et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 544–549.
- Kim S.E., Kim B.K., Gil J.E. et al.* Comparative analysis of the developmental competence of three human embryonic stem cell lines in vitro // *Mol. Cells.* 2007. V. 23. P. 49–56.
- Klimanskaya I., Chung Y., Meisner L. et al.* Human embryonic stem cells derived without feeder cells // *Lancet.* 2005. V. 365. P. 1636–1641.
- Kubikova I., Konecna H., Sedo O. et al.* Proteomic profiling of human embryonic stem cell-derived microvesicles reveals a risk of transfer of proteins of bovine and mouse origin // *Cytotherapy.* 2009. V. 11. P. 330–340.
- Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V. et al.* Diverse epigenetic profile of novel human embryonic stem cell lines // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. P. 416–420.
- Laursen S.B., Møllgaard K., Olesen C. et al.* Regional differences in expression of specific markers for human embryonic stem cells // *Reprod. Biomed. Online.* 2007. V. 15. P. 89–98.
- Lengner C.J., Gimelbrant A.A., Erwin J.A. et al.* Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations // *Cell.* 2010. V. 141. P. 872–883.
- Liu Y., Song Z., Zhao Y. et al.* A novel chemical-defined medium with bFGF and N2 B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 346. P. 131–139.
- Lu J., Hou R., Booth C.J. et al.* Defined culture conditions of human embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. USA.* 2006. V. 103. P. 5688–5693.
- Ludwig T.E., Levenstein M.E., Jones M.J. et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 185–187.
- Martin M.J., Muotri A., Gage F., Varki A.* Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid // *Nat. Med.* 2005. V. 11. P. 228–232.
- Meisner L.F., Johnson J.A.* Protocols for cytogenetics studies of human embryonic stem cells // *Methods.* 2008. V. 45. P. 133–141.
- Miyazaki T., Futaki S., Hasegawa K. et al.* Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 375. P. 27–32.
- Mohr J.C., de Pablo J.J., Palecek S.P.* 3-D microwell culture of human embryonic stem cells // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 6032–6042.
- Oh S.K., Kim H.S., Ahn H.J. et al.* Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3 // *Stem cells.* 2005. V. 23. P. 211–219.
- Ozkinay C., Mitelman F.* A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes // *Hereditas.* 1979. V. 90. P. 1–4.
- Pal R., Totey S.S., Mamidi M.K. et al.* Propensity of human embryonic stem cell lines during early stage of lineage specification control their terminal differentiation into mature cell types // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2009. V. 234. P. 1230–1243.
- Priddle H., Allegrucci C., Burridge P. et al.* Derivation and characterisation of the human embryonic stem cell lines, NOTT1 and NOTT2 // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 367–375.
- Prowse A.B., Doran M.R., Cooper-White J.J. et al.* Long term culture of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin in ascorbate free media // *Biomaterials.* 2010. V. 31. P. 8281–8288.
- Rajala K., Hakala H., Panula S. et al.* Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. P. 1231–1238.
- Richards M., Tan S., Fong C.-Y. et al.* Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells // *Stem Cells.* 2003. V. 21. P. 546–556.
- Rosler E., Fisk G.J., Ares X. et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions // *Dev. Dyn.* 2004. V. 229. P. 259–274.

- Sarkadi B., Homolya L., Szakács G., Váradi A.* Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. P. 1179–1236.
- Sarkadi B., Orbán T.I., Szakács G. et al.* Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? // *Stem cells.* 2009. V. 28. P. 174–176.
- Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J.* (eds). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) // S. Karger, Basel. 2009.
- Sidhu K.S., Tuch B.E.* Derivation of clones from human embryonic stem cell lines by FACS sorting and their Characterization // *Stem cells and Development.* 2006. V. 15. P. 61–69.
- Skottman H., Hovatta O.* Culture conditions for human embryonic stem cells // *Reproduction.* 2006. V. 132. P. 691–698.
- Skottman H., Dilber M.S., Hovatta O.* The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines // *FEBS Letter.* 2006. V. 580. P. 2875–2878.
- Skottman H.* Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 206–209.
- Spits C., Mateizel I., Geens M. et al.* Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1361–1363.
- Steiner D., Khaner H., Cohen M. et al.* Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. P. 361–366.
- Stewart M.H., Bosse M., Cladwick K. et al.* Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment // *Nature Methods.* 2006. V. 3. P. 807–815.
- Ström S., Holm F., Bergström R. et al.* Derivation of 30 human embryonic stem cell lines—improving the quality // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2010. V. 46. P. 337–344.
- Tavakoli T., Xu X., Derby E. et al.* Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines 13, 16 and BG01V // *BMC Cell Biol.* 2009. V. 10. P. 44–58.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science.* 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Vazin T., Freed W.J.* Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review // *Restorative Neurology and Neuroscience.* 2010. V. 28. P. 589–603.
- Wang G., Zhang H., Zhao Y. et al.* Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 330. P. 934–942.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells // *Nature Biotechnology.* 2001. V. 19. P. 971–974.
- Yang S., Lin G., Tan Y.Q. et al.* Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture // *Genes Chromosomes Cancer.* 2008. V. 47. P. 665–679.
- Yang S., Lin G., Tan Y.Q. et al.* Differences between karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cells // *Cell Prolif.* 2010. V. 43. P. 195–206.

Comparative Characteristics of New Human Embryonic Stem Cell Lines SC5, SC6, SC7, and SC3a

A. M. Kol'tsova¹, O. F. Gordeeva², T. A. Krylova¹, N. V. Lifantseva²,
A. S. Musorina¹, T. K. Yakovleva¹, G. G. Poljanskaya^{1,*}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia 194064*

²*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 119334*

*E-mail: poljansk@mail.cytspb.rssi.ru

Abstract—Numerous human embryonic stem cell lines with different genetic background are widely used as cell models for fundamental, biomedical and pharmacological research. New hES cell lines SC5, SC6, SC7, and SC3a are derived from the blastocysts and maintained on mitotically inactivated human feeder cells. All derived hES cell lines passed through more than 120 cell population doublings, retained normal diploid karyotype and ability of *in vitro* differentiation in the derivatives of three germ layers. These lines express the markers of undifferentiated hES cells: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, and alkaline phosphatase. Moreover, undifferentiated cells of SC5, SC6, and SC7 lines expressed germ line specific genes *DPPA3/STELLA* and *DAZL* and did not express somatic lineages specific genes. In contrast, undifferentiated cells of SC3a line did not express *DPPA3/STELLA* and *DAZL* but expressed extra embryonic endoderm cell markers GATA4 and AFP. Double staining of SC5 and SC3a colonies by antibodies against transcription factors Oct-4 and GATA4 has demonstrated that most SC3a cells in colonies were positive for both factors. Furthermore, the cells of SC5, SC6, SC7 lines but not of SC3a line formed teratomas containing the derivatives of the three germ layers. These results indicate that, in contrast to the other cell lines, the cells in the SC3a colonies represent an early committed cell population. Moreover, expression of the multidrug resistance transporter gene *ABCG2* was detected in undifferentiated cells and differentiating embryonic bodies during 10 days of all lines by immunofluorescent and RT-PCR analyses, whereas RT-PCR analysis has revealed up-regulation of the *ABCB1* transporter gene expression in differentiating embryoid bodies of SC5, SC6, and SC7 cells only. Thus, these findings demonstrate different characteristics and differentiation potential of SC5, SC6, SC7, and SC3a hES cell lines which were derived in different conditions.

Keywords: human embryonic stem cells, marker expression, differentiation, karyotype