

## НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VITRO ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© Ю. М. Минина,<sup>1, 2</sup> Н. С. Жданова,<sup>1, 2</sup> А. Г. Шилов,<sup>1, 2</sup> Е. Н. Толкунова,<sup>3</sup>  
М. А. Лисковых,<sup>3</sup> А. Н. Томилин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, <sup>2</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,  
и <sup>3</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: <sup>1</sup>minina\_jul@mail.ru, <sup>3</sup>antom@mail.cytspb.rssi.ru

Ввиду открывшихся перспектив использования эмбриональных стволовых (ЭС) и индуцированных плюрипотентных стволовых (иПС) клеток в медико-биологических исследованиях возникла потребность в кариологическом анализе этих клеток. В данной работе с использованием методов классической и молекулярной цитогенетики был проведен анализ хромосомного состава ЭС клеток (В1-1 и В1-2) и иПС клеток (iPS1-1 и iPS3-1), полученных *de novo*. Мы обнаружили моносомию по X-хромосоме во всех исследуемых клеточных линиях ЭС и иПС, при этом модальное число хромосом в них составляло 39. В клеточных линиях иПС, полученных путем трансфекции, была выявлена хромосомная нестабильность, выражающаяся в анеуплоидии. Кроме того, в клетках клона iPS1-1 мы нашли хромосомные перестройки и фрагменты хромосом. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при получении плюрипотентных клеточных линий, особенно иПС клеточных линий, необходим их тщательный цитогенетический анализ.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, нестабильность кариотипа клеток ЭС и иПС, анеуплоидия, моносомия по X-хромосоме.

**Принятые сокращения:** дпо — дней после оплодотворения, иПС клетки — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, МЭФ — эмбриональные фибробласты мыши, ЭС клетки — эмбриональные стволовые клетки, DAPI — 4', 6-диамино-2-фенилиндола, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, hCG (human chorionic gonadotropin) — хорионический гонадотропин человека, PMS (pregnant mares serum) — сыворотка жеребой кобылы, Ха — активная X-хромосома, Xi — неактивная X-хромосома.

Биология стволовых клеток существенно продвинулась в течение двух последних десятилетий в основном благодаря открывшимся возможностям культивирования *in vitro* клеток внутренней массы бластоцист млекопитающих, клонированию, в том числе терапевтическому, и изучению транскрипционных и других факторов, являющихся регуляторами плюрипотентности и дифференцировки. В результате были сделаны революционные открытия в клеточной биологии и появилась возможность создания аутентичных моделей многих наследственных заболеваний человека и дополнительных способов лечения ряда тяжелых заболеваний и синдромов человека, таких как, например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, цирроз печени, диабет и т. д.

Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки являются прекрасной моделью для изучения клеточной дифференцировки. Впервые они были получены Ивенсом, Кауфманом и Мартином из бластоцист мыши (Evans, Kaufman, 1981; Hanna et al., 2007). Изучение ЭС клеток показало, что они не только сохраняют свойства плюрипотентности и способны дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков при длительном культивировании *in vitro*, но и могут участвовать в образовании хи-

мер, давая вклад в зародышевый путь (Martin, 1981). Эти их свойства позволили надеяться, что наряду с терапевтическим клонированием ЭС клетки могут быть использованы для заместительной клеточной терапии у человека. Однако длительные дискуссии по этому вопросу выявили ряд проблем.

Альтернативой ЭС клеткам явились индуцированные плюрипотентные стволовые (иПС) клетки, которые по своим свойствам, по-видимому, аналогичны ЭС клеткам, но могут быть получены для каждого индивидуума из его соматических клеток (Kuehn et al., 1987; Mali et al., 2008). Совершенно неожиданным оказалось то, что контроль над плюрипотентностью осуществляется всего несколькими транскрипционными факторами — Oct4, Sox2 и Nanog (Pei, 2009). Причем запуск первой волны механизма репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные может быть осуществлен, по-видимому, даже в результате временной экспрессии этих факторов (Okita et al., 2007; Nakagawa et al., 2008). Начавшись 3—4 года тому назад, работы по получению и анализу иПС-клеток, а также по созданию на их основе моделей тяжелых заболеваний человека продвигаются в настоящее время очень быстрыми темпами.

Получение иПС клеток и возможность их дальнейшей дифференцировки в производные разных тканей обычно связаны с тремя этапами трансформации. На каждом из этих этапов происходит встраивание вектора в ДНК, сопровождающееся разрывами ДНК. Кроме того, осуществляется клонирование, в результате которого, как правило, отбираются быстро растущие субклоны, часто полиплоидные или анеуплоидные. Таким образом, изучение хромосомного состава иПС и ЭС клеток является необходимым этапом для дальнейшего использования их как в регенеративной медицине, так и для изучения процессов клеточной дифференцировки/дедифференцировки.

В настоящем исследовании с использованием методов классической и молекулярной цитогенетики проведено изучение хромосомного состава нескольких вновь полученных линий ЭС и иПС клеток.

### Материал и методика

В работе были использованы: антифейд (Vector, США); бромистый этидий, глюкоза и колхицин (Sigma, Германия); конъюгированные с FITC антитела мыши к авидину и конъюгированные с СуЗ антитела мыши к дигоксигенину (Vector, США); краситель Гимза (Sigma, Германия); метанол 100 % (Вектон, Россия); пенициллин/стрептомицин, пепсин и РНКазы А (Sigma, Германия); уксусная кислота (Реахим, Россия); формамид (Sigma, Германия); хромосомоспецифичная проба к X-хромосоме мыши (Cambio, Англия); хромосомоспецифичная проба к Y-хромосоме мыши (Oncor, США); ЭС-сертифицированная сыворотка плодов коровы (РАА, Австрия); сыворотка жеребой кобылы (PMS) (Intervet, Германия); серия этанолов 70, 80, 90 и 96 % (Roth, Германия); этидиум бромид (Sigma, Германия);  $\beta$ -меркаптоэтанол (Sigma, Германия); DMEM, G418 и hCG (Intervet, Германия); KCl (Реахим, Россия); L-глутамин (Invitrogen); LIF (leukemia inhibitory factors) рекомбинантный, получен в нашей лаборатории путем экспрессии в бактериях и аффинной очистки; ингибитор MEK-киназы PD098,059 (Sigma, Германия).

Получение ЭС и иПС клеточных линий. У 4—6-недельных самок мышей линии В16 или FVB индуцировали суперовуляцию с использованием PMS и хорионического гонадотропина человека hCG (Hogan et al., 1994) и спаривали с самцами тех же линий. За 0 дней после оплодотворения (дпо) принимали начало суток, в которые происходило спаривание. Об успешном спаривании судили по наличию вагинальных пробок (0.5 дпо). Бластоцисты (3.5 дпо) вымывали из маток и помещали на подложку митотически инактивированных эмбриональных фибробластов (МЭФ) в стандартной среде для ЭС клеток (15%-ная ЭС-сертифицированная сыворотка плодов коровы, DMEM, 4500 мг/л глюкозы, 2 мМ L-глутамин, пенициллин/стрептомицин, 0.1 мМ заменимые аминокислоты и 0.1 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол), содержащую 500 ед./мл LIF (leukemia inhibitory factors). Далее следовали известной процедуре (Hogan et al., 1994), за исключением того, что в ходе первых пересевов в среду дополнительно вводили 12.5 мкМ PD098,059 — ингибитор MEK-киназы, повышающий эффективность получения ЭС клеток (Burdon et al., 1999). Полученные таким образом стабильные линии ES/В16-1 и -2 продолжали культивировать на МЭФ-подложке в стандартной среде для эмбриональных стволовых клеток с LIF, но уже без PD 098,059.

Полноразмерные кДНК Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 амплифицировали ПЦР из обратно транскрибированной *polyA* РНК ЭС клеток мыши и клонировали, замещая GFP-вставку, в лентивирусный вектор LVTHM, любезно предоставленный Д. Троне (Wiznerowicz, Trono, 2003). LVTHM представляет собой репликационно неактивный лентивирус, сконструированный на основе вируса иммунодефицита человека и экспрессирующий маркерный белок GFP (Wiznerowicz, Trono, 2003). Клетки линии 293T трансфицировали pMD2G (5 мкг), упаковочной pCMV-dR8.74psPAX2 (5 мкг) и по отдельности одной из созданных нами плазмид LVTHM-Oct4, -Sox2, -Klf4 или -cMyc (20 мкг) при помощи кальций-фосфатного метода. Лентивирусы из супернатанта клеток концентрировали ультрацентрифугированием, замораживали в аликвотах при  $-80^{\circ}\text{C}$ , а затем титровали с использованием клеток 293T по описанной методике (Wiznerowicz, Trono, 2003).

Примерно  $150 \cdot 10^3$  МЭФ, полученных из 13.5-суточных эмбрионов, предварительно созданной нами линии мышей Selector (с введенным в 3'-нетранслируемую область Oct4 гена *iresGFPiresNeo* кассеты, позволяющей отбирать иПС-клетки при помощи селекции G418), одновременно заражали в течение ночи в чашках 3.5 см концентрированными вирусами LVTHM-Oct4, -Sox2, -Klf4 и -cMyc (по  $2 \cdot 10^3$ — $10 \cdot 10^3$  TU каждый). Через 5 дней клетки рассеивали в 25 раз на подложку из митотически инактивированных МЭФ в стандартной среде для эмбриональных стволовых клеток с 500 ед./мл LIF и 300 мкг/мл G418. Еще через 5 дней клетки опять рассеивали в 10 раз и культивировали в такой же среде в течение недели. иПС колонии индивидуально отбирали и культивировали в стандартной среде для эмбриональных стволовых клеток с LIF на обработанных желатином культуральных пластиковых чашках.

Цитогенетический анализ. Препараты метафазных хромосом готовили по общепринятой методике, используя гипотоническую обработку 0.56%-ным KCl в течение 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Анализируемые культуры клеток фиксировали на 3—5-м пассаже. Предварительно клеточную культуру в логарифмической фазе роста сначала инкубировали 1.5 ч с бромистым этидием (5 мкг/мл), а затем 1.5 ч с колхицином (0.3 мкг/мл). Для проведения рутинного цитогенетического анализа препараты метафазных хромосом окрашивали красителем Гимза. Подсчет числа хромосом проводили приблизительно в 100 метафазных пластинках. Для идентификации хромосом использовали окраску DAPI (200 нг/мл, в  $2 \times \text{SSC}$ ) в течение 5 мин. Анализировали не менее 15—20 метафаз с модальным числом хромосом. Идентификацию проводили согласно международной классификации (Radjabli et al., 2006).

Для выявления на метафазных пластинках мыши X- и Y-хромосом использовали хромосомоспецифичные пробы к X- (Cambio, Англия) и Y- (Oncor, США) хромосомам мыши, меченные соответственно биотином и дигоксигенином. FISH проводили по стандартной методике. Препараты обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл) в течение 60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , затем отмывали в  $2 \times \text{SSC}$  (3 раза по 5 мин) и обезвоживали в серии этанолов повышающейся концентрации. После высушивания препараты обрабатывали 3 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  0.02%-ным пепсином в 10 мМ HCl и промывали 2 раза по 5 мин в PBS. После повторного обезвоживания препаратов в серии спиртов и высушивания на препарат наносили пробу в концентрации, рекомендован-

ной фирмой-производителем, и денатурировали одновременно с ДНК препарата на термостойке 2 мин при 75 °С. Детекцию биотинилированной пробы к X-хромосоме проводили с помощью авидина-FITC; для усиления сигнала дополнительно наносили конъюгированные с FITC антитела мыши к авидину. Для детекции меченного дигоксигенином зонда к Y-хромосоме использовали конъюгированные с Cy3 антитела мыши к дигоксигенину. Окраску препаратов DAPI проводили, как описано выше.

Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioPlan2 Imaging (ZEISS, Германия), оснащенного CCD-камерой (CV M300, JAI Corporation, Япония) и набором фильтров Chroma, в Центре анализа микроскопических объектов Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск).

### Результаты

Цитогенетический анализ ЭС-клеток мыши. Морфология клонов исследуемых клеточных линий B16-1 и B16-2 соответствовала морфологии ЭС-клеток без каких-либо изменений (рис. 1, а). В таблице приведены данные о числе хромосом в клетках ЭС-линий. Модальное число хромосом в обеих линиях составляло 39. Число полиплоидных клеток в линии ES/B16-1 было 2 %, в линии ES/B16-2 они отсутствовали. Фрагментов и других хромосомных перестроек, а также маркерных хромосом выявлено не было. В обеих линиях во всех проанализированных с помощью DAPI-дифференциальной окраски метафазах присутствовала только одна X-хромосома, так что клетки с модальным числом хромосом имели кариотип 39,XO (рис. 2, а). Эти данные получили подтверждение методом FISH с хромосомоспецифичными пробами к X- и Y-хромосомам мыши (рис. 2, б).

Варьирование числа хромосом в ЭС (ES) и иПС (iPS) клеточных линиях мыши

Название клона	Число проанализированных метафаз	Доля метафаз (%) в клетках при разном числе хромосом					Полиплоидные
		37	38	39	40	41—42	
ES/B16-1	100	3	8	77.0	6	4.0	2.0
ES/B16-2	50	0	10	82.0	8	0	0
iPS/1-1	87	15	23	36.8	17.2	3.4	4.6
iPS/3-1	100	8	21.3	43.0	22.7	3.0	2.0

Цитогенетический анализ иПС линий мыши. Морфология клонов исследуемых иПС клеточных линий мыши соответствовала таковой ЭС клеток мыши (рис. 1, б). Данные о числе хромосом в клетках иПС линий приведены в таблице. В обеих линиях модальное число хромосом составляло 39. 39 хромосом в линии iPS1-1 содержало 36.8 % метафазных пластинок, а в линии iPS3-1 — 43 %. Число полиплоидных клеток в обеих линиях было незначительным — 4.6 и 2.0 % соответственно. Оказалось, что, как и в линиях ЭС клеток, в метафазах иПС клеток с модальным числом хромосом из половых хромосом присутствовала только одна X-хромосома, так что клетки с модальным числом хромосом имеют кариотип 39,XO. Несмотря на наличие в линиях значительного количества клеток с числом хромосом больше и меньше модального, они на данном этапе культивирования не представляли собой субклоны, поскольку в них отсутствовали разные хромосомы. Так, в клоне iPS1-1 встречались клетки, в которых отсутствовали хромосомы либо 1, либо 13, либо 15, либо 16, либо 18. Кроме того, в этом клоне были обнаружены клетки с хромосомными пере-

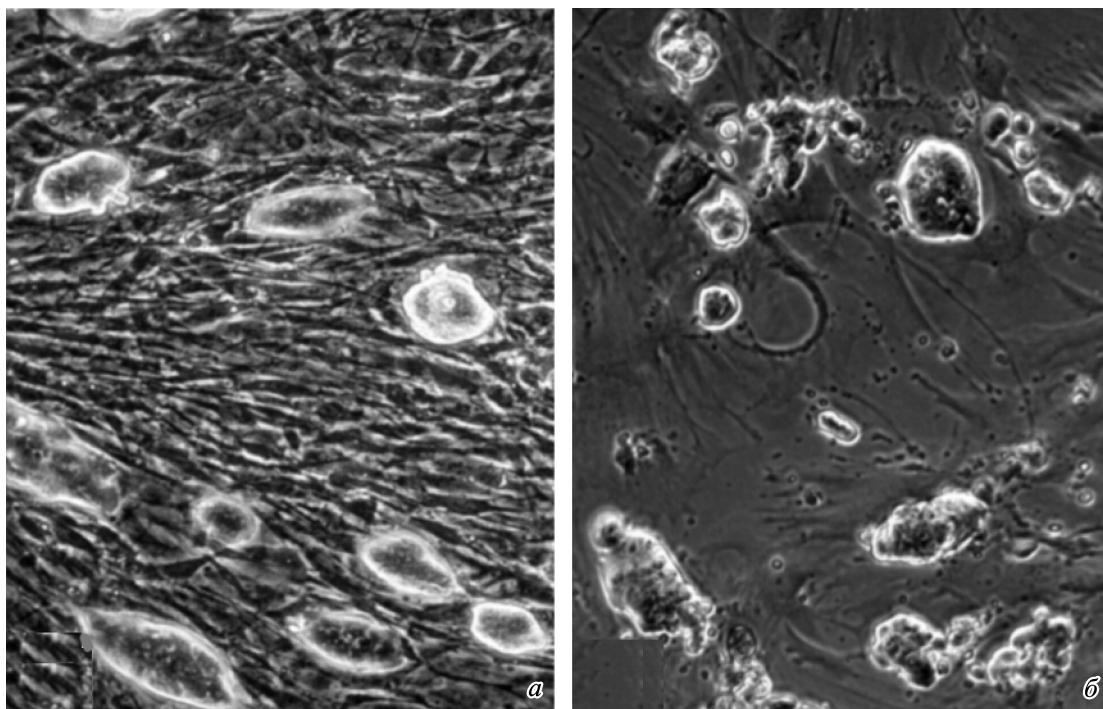


Рис. 1. Морфология исследуемых клонов ЭС (а) и иПС (б) линий мыши, растущих на подложке митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши.

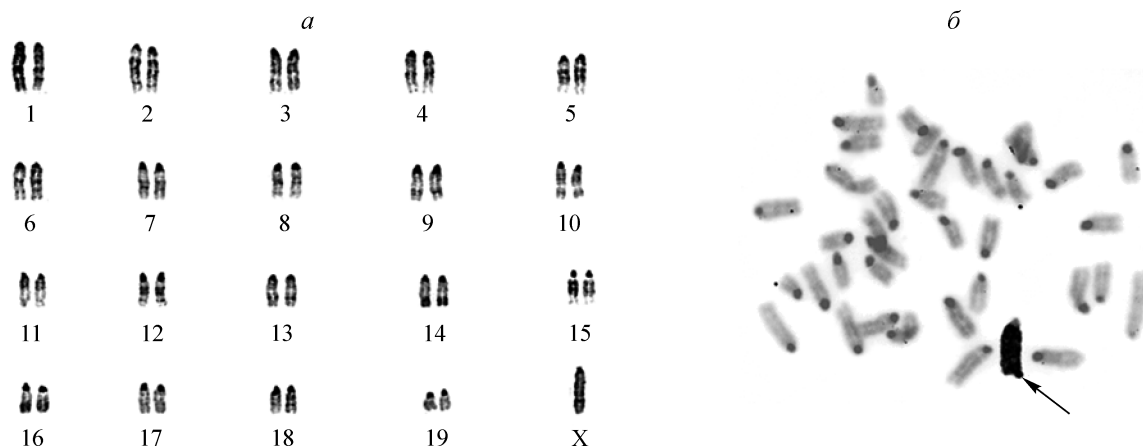


Рис. 2. Кариотип клеток линии ES/B16-1 (39,XO) (а) и метафазная пластинка клетки линии ES/B16-2 после FISH с хромосомоспецифичными пробами к X- и Y-хромосомам (б).

Стрелкой указана метка на X-хромосоме. Окраска хромосом DAPI.

стройками, например 39,XO, -15, -16, +t(15;16), и одна клетка с хромосомным фрагментом (рис. 3, а). Во второй линии хромосомных перестроек выявлено не было. Наличие в клетках данных линий только одной половой хромосомы, X-хромосомы, было подтверждено FISH с хромосомоспецифичными пробами к X- и Y-хромосомам мыши (рис. 3, б).

### Обсуждение

Проведенный анализ показал, что проанализированные ЭС и иПС линии мыши похожи по хромосомному составу: они потеряли одну из половых хромосом. Поскольку кариотип эмбриональных фибробластов, из которых они были получены, неизвестен, трудно сказать, была это неактивная X- или Y-хромосома. Кроме того, для иПС-линий была характерна достаточно высокая сте-

пень гипо- и гиперплоидии. Полученные данные свидетельствуют о нестабильности кариотипов плюрипотентных линий.

Поскольку с ЭС линиями клеток мыши работают уже более 20 лет, по поводу стабильности их кариотипов сложилось определенное мнение. Оказалось, что в ЭС линиях мыши, полученных из бластоцист или клеток внутренней массы эмбрионов самцов, как правило, сохраняется исходный кариотип. Однако если ЭС линии были получены из клеток самок, то довольно часто наблюдается потеря либо части, либо полностью одной из X-хромосом (Rastan, Robertson, 1985). Весьма вероятно, что взятые нами в анализ линии ЭС клеток мыши были получены из клеток самок. Тем не менее линии ЭС клеток мыши, в которых сохранились 2 активные X-хромосомы, известны и используются для изучения инактивации одной из X-хромосом в ходе дифференцировки плюрипотентных линий. Считается, что при длительном культивировании ЭС клеток в них могут на-

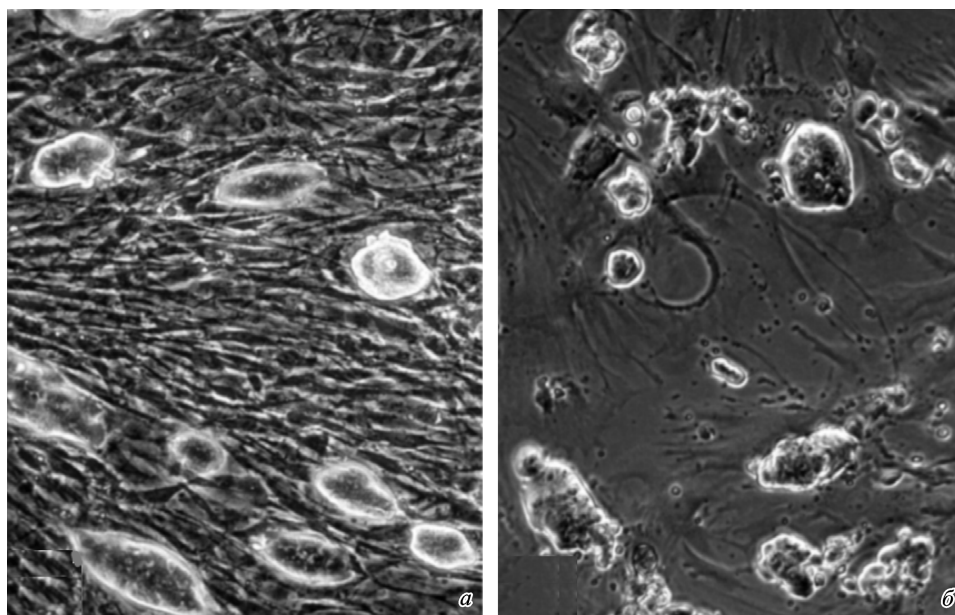


Рис. 3. Кариотип клетки линии iPS 1-1 с хромосомной перестройкой (39,XO,-15,-16,+t(15;16)) (а) и метафазная пластинка клетки линии iPS 3-1 после FISH с хромосомоспецифичными пробами к X- и Y-хромосомам (б).

Стрелкой указана метка на X-хромосоме. Окраска хромосом DAPI.

блюдаться ограничение плюрипотентных свойств и явления нестабильности кариотипа: полиплоидизация, моносомия и трисомия по отдельным хромосомам и даже хромосомные перестройки. Интенсивность этих процессов зависит, очевидно, как от свойств отдельных линий, так и от условий их культивирования (Liu et al., 1997).

Несомненно, в качестве моделей для медико-биологических исследований следует рекомендовать наиболее стабильные линии ЭС-клеток. В данном случае это ES/BI6-2. Наблюдаемая в ней моносомия по X-хромосоме не может быть причиной выбраковки линии, поскольку и мышиные, и человеческие особи XO вполне жизнеспособны, хотя и характеризуются отклонениями в развитии, связанными в основном с нарушениями полового развития.

Несмотря на то что начиная с 2006 г. прокатилась буквально волна по получению иПС клеточных линий из клеток разного происхождения и разной видовой принадлежности, исследований, в которых проводился бы тщательный анализ кариотипа клеточных иПС линий мыши, немного. Наиболее информативна в этом отношении первая работа по получению иПС-линий мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006), в которой приводятся данные по хромосомному анализу четырех полученных линий. Они имели кариотипы 40,ХаХа; 39,ХО; 40,ХО+10; 40,ХаХi. В других исследованиях описаны линии как с кариотипом 39,ХО (Hanna et al., 2007), так и с нормальным кариотипом (Shao et al., 2009). Следует заметить, что среди иПС-линий человека также описаны линии как с нормальным (Park et al., 2008), так и перестроенным (Mali et al., 2008) кариотипами. В последнем случае перестроенными были кариотипы в 18 из 20 линий. Причем перестройки касались как потери одной из хромосом, так и истинных хромосомных перестроек. Следует заметить, что в данной работе при получении иПС-линий применялись вирусные векторы, встраивающиеся в ДНК клетки-реципиента. Такие векторы могут провоцировать инсерционные мутации, которые нарушают нормальное функционирование клеток, влияют на стабильность генома, а в некоторых случаях могут приводить к канцерогенезу (Okita et al., 2007). В настоящее время ведутся исследования по разработке методов перепрограммирования соматических клеток без инсерционного трансгенеза (Stadtfeld et al., 2008). Возможно, что полученные таким способом плюрипотентные линии будут более стабильны и адекватны как для тканевой терапии, так и для изучения процессов клеточной дифференцировки и индукции плюрипотентности.

Полученные нами и приведенные данные свидетельствуют о том, что при получении плюрипотентных клеточных линий, особенно иПС клеточных линий, необходим их тщательный цитогенетический анализ. Необходим также тщательный цитогенетический анализ и клеточных линий, из которых планируется получать иПС-линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта (№ 02.512.11.2253 Н-212-08).

## Список литературы

- Burdon T., Stracey T., Chambers I., Nichols J., Smith A. 1999. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Develop.* 210 : 30—43.
- Evans M. J., Kaufman M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292 : 154—156.
- Hanna J., Wernig B., Markoulaki S., Sun S. W., Meissner A., Cassady J. P., Beard C., Brambrink T., Wu L. C., Townes T. M., Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 318 : 1920—1923.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. 1994. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.* Plainview; New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 497 p.
- Kuehn M. R., Bradley A., Robertson E. J., Evans M. J. 1987. A potential animal model for Lesch—Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature.* 326 : 295—298.
- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Distech C. M., Bornstein P., Jaenisch R. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Develop. Dyn.* 209 : 85—91.
- Mali P., Ye Z., Hommond H. H., Yu X., Lin J., Chen G., Zou J., Cheng L. 2008. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells.* 26 : 1998—2005.
- Martin G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 : 7634—7638.
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamanaka S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26 : 101—106.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. 2007. Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 448 : 260—262.
- Park I.-H., Arora H., Huo H., Maherali H., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M. W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G. G. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell.* 134 : 877—886.
- Pei D. 2009. Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J. Biol. Chem.* 284 : 3365—3369.
- Radjabli S. I., Sablina O. V., Graphodatsky A. S. 2006. Selected karyotypes. In: *ATLAS of mammalian karyotypes.* Chichester. John Wiley. 188 : 200—221.
- Rastan S., Robertson E. J. 1985. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90 : 379—388.
- Shao L., Feng W., Sun Y., Bai H., Liu J., Currie C., Kim J., Gama R., Wang Z., Qian Z., Liaw L., Wu W.-S. 2009. Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res.* 19 : 296—306.
- Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 322 : 945—949.
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126 : 663—667.
- Wiznerowicz M., Trono D. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* 77 : 8957—8961.

CHROMOSOMAL INSTABILITY OF *IN VITRO* CULTURED MOUSE ES AND IPS CELLS

Yu. M. Minina,<sup>1,2</sup> N. S. Zhdanova,<sup>1,2</sup> A. G. Shilov,<sup>1,2</sup> E. N. Tolkunova,<sup>3</sup> M. A. Liskovykh,<sup>3</sup> A. N. Tomilin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, <sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, and <sup>3</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: <sup>1</sup> minina\_jul@mail.ru, <sup>3</sup> antom@mail.tytspb.rssi.ru

A perspective of using embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells in clinical medicine makes karyological analysis of these cells an important issue. Using methods of classical and molecular cytogenetics chromosomal analysis, we have carried out karyological study of two mouse ES and two iPS cell lines derived *de novo*. We have found monosomy of X chromosome in all studied ES and iPS cell lines, thus making a modal number of chromosomes in these cell lines 39. A chromosomal instability (aneuploidy) was revealed in both studied iPS cell lines. Moreover, we have detected chromosomal rearrangements and chromosomal fragments in one of iPS cell line. Our findings underline the importance of careful cytogenetic evaluation of pluripotent cell lines, especially iPS cell lines, which should be carried out prior to any clinical use of these cells.

**Key words:** embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, karyotype instability of ES and iPS cells, aneuploidy, monosomy of X chromosome.

---