

Oddělení Molekulární embryologie  
Ústavu experimentální medicíny, Brno

estools

Biologický ústav Lékařské fakulty  
Masarykovy Univerzity, Brno

The background of the slide is a fluorescence microscopy image showing numerous cells. The cells are stained with a green fluorescent marker, likely a GFP reporter, and their nuclei are stained with a blue marker, likely DAPI. The cells are scattered across the field of view. In the bottom right corner, there is a scale bar labeled "50.0µm".

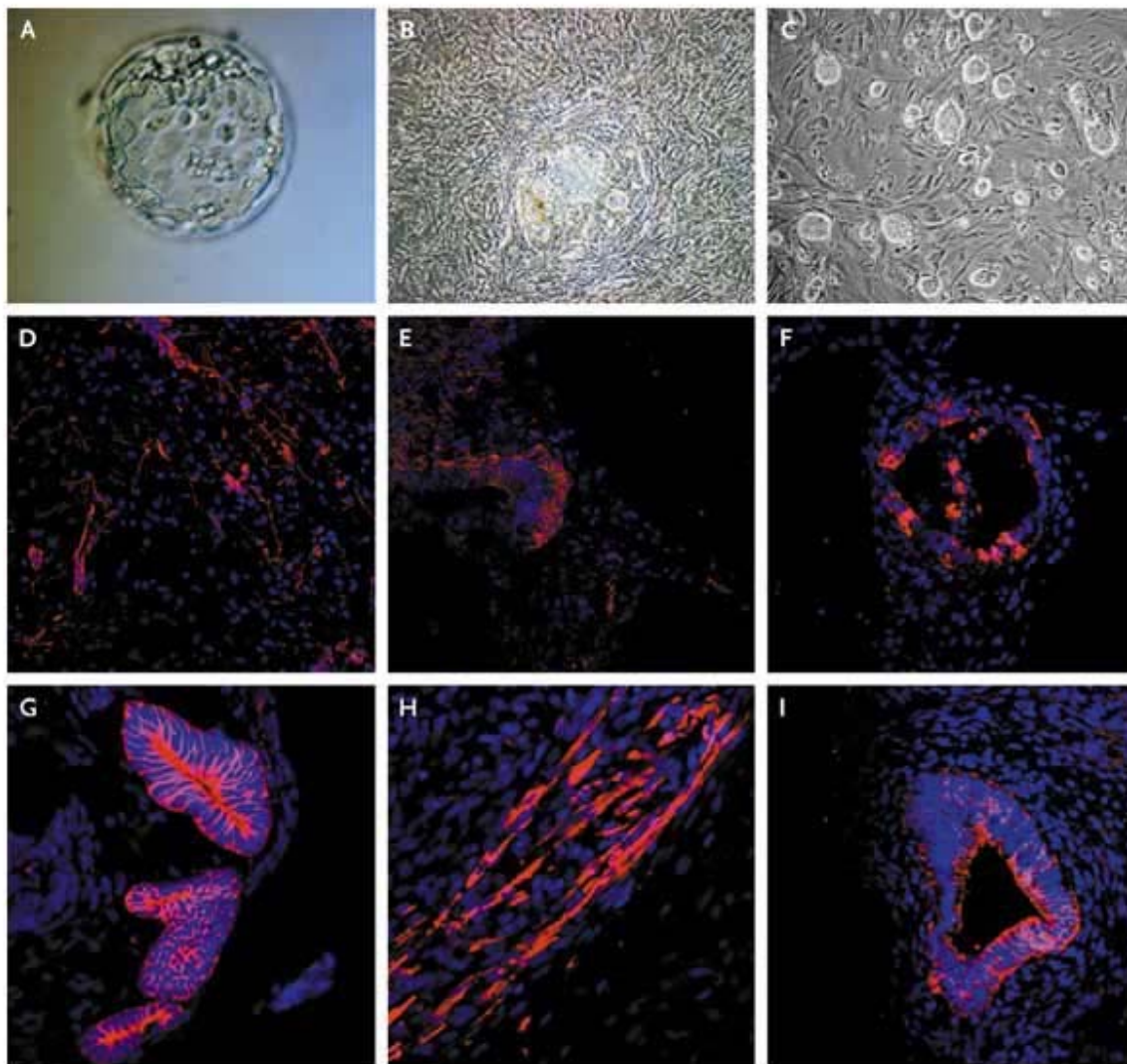
# Genomová nestabilita kmenových buněk:

Od stárnoucích zárodečných k embryonálním kmenovým buňkám

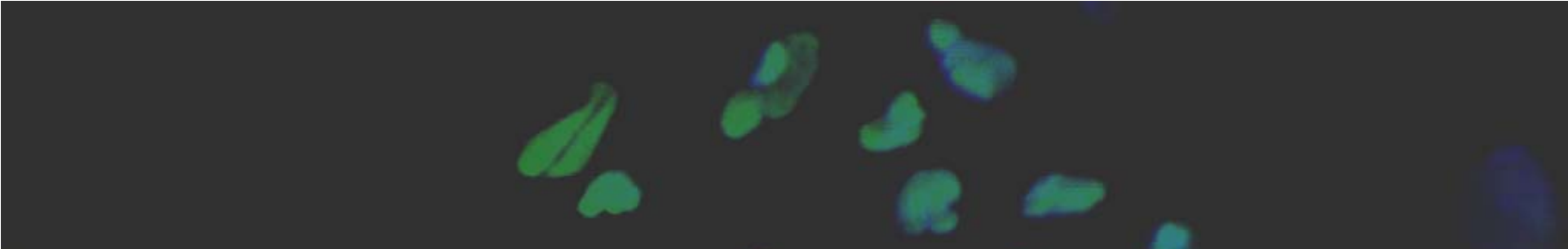
Vladimír Rotrekl & Petr Dvořák & Aleš Hampl

50.0µm

# Izolace embryonálních kmenových buněk

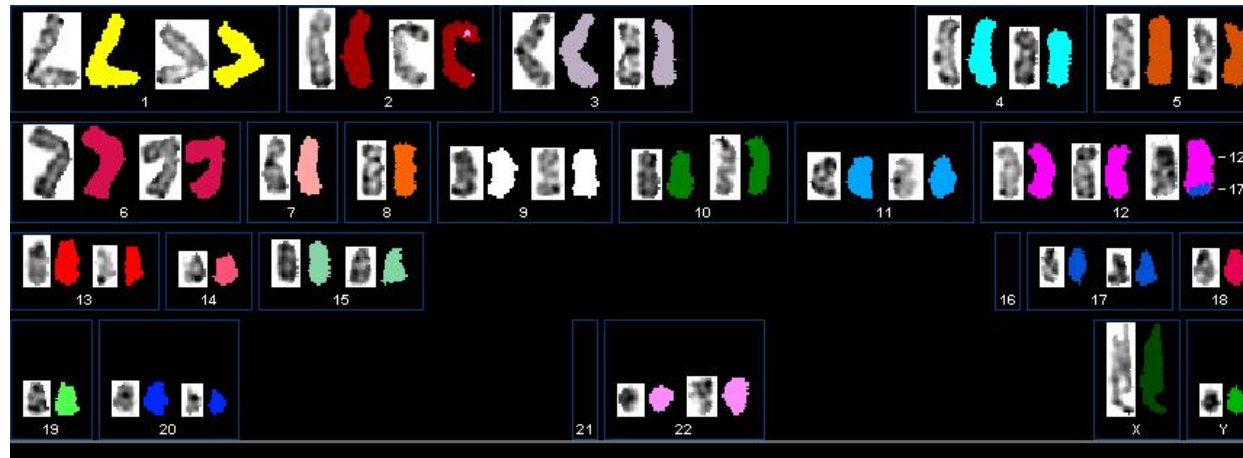


Cowan  
New England Journal of Medicine, 2004

- 
- Léčba degenerativních onemocnění
    - Regenerativní medicína
  - Podpůrná léčba (chemoterapie atd.)
  - Modelový systém ve farmakologii

ALE!...

# Ohrožení genomové stability hESCs při dlouhodobé kultivaci in vitro



Linie	Délka pasáže	Pasáž	Karyotyp
CCTL-14		16	46, XX
	6.2	25	46, XX
	5.1	61	47, XX, +na
	3.8	76	46, XX mix 47, XX, +der.(12)t(17;12)
	4.7	100	47, XX, +der.12
	3.7	139	47, XX, +der.12
	5.0	160	47, XX, +der.12
	4.1	196	47, XX, +der.12
	3.8	216	47, XX, +der.12
	3.6	315	47, XX, +der.12, der.21
			46, XX, -?, +der.12, +der.21

# Nestabilní genom

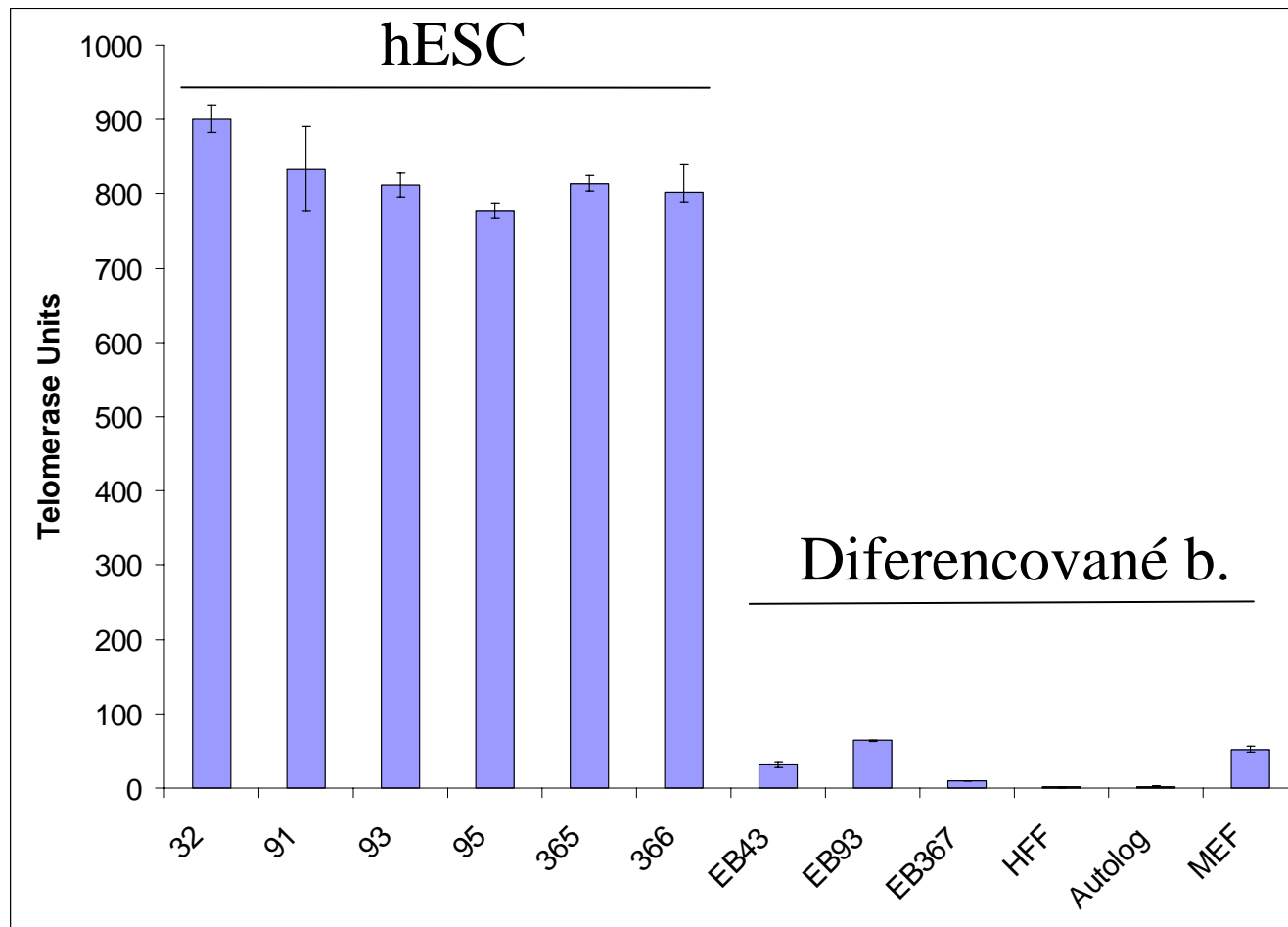


Nefunkční  
oprava DNA

Neúčinná kontrola  
v kontrolním bodě  
(checkpoint)

Zkracování  
telomer

# Vysoká aktivita telomerázy je nezávislá na délce kultivace



# Nestabilní genom

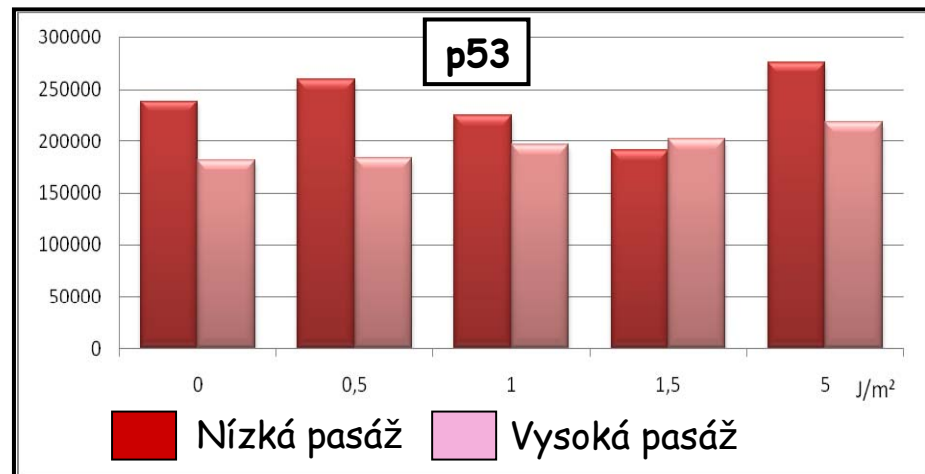
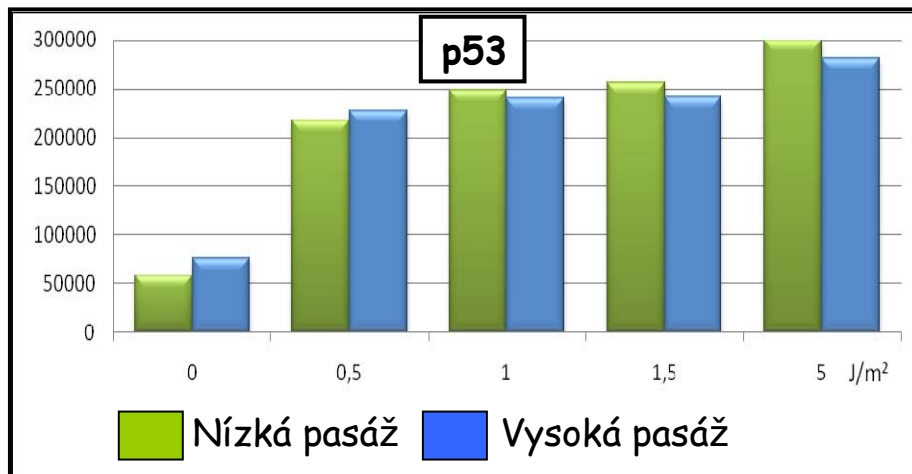
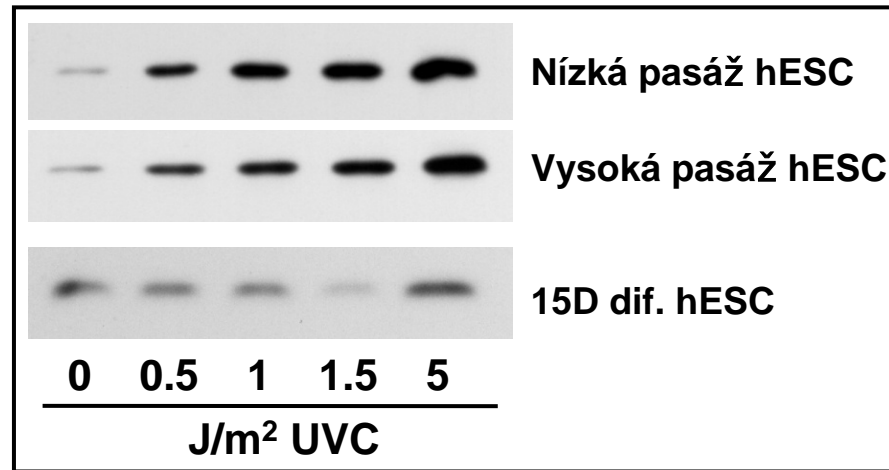
Nefunkční  
oprava DNA

Neúčinná kontrola  
v kontrolním bodě  
(checkpoint)

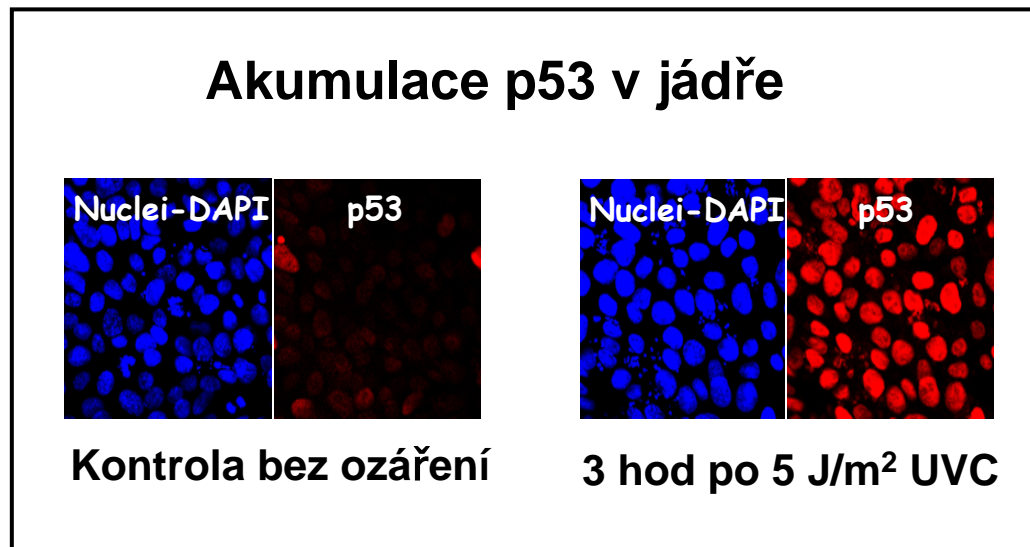


Zkracování  
telomer

# hESC akumulují p53 po ozáření UVC

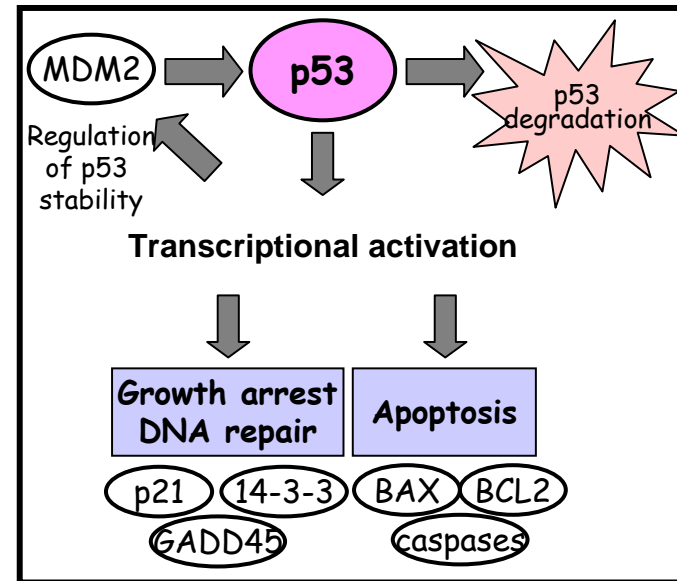


# Lokalizace P53 indukovaná UVC odpovídá somatickým buňkám

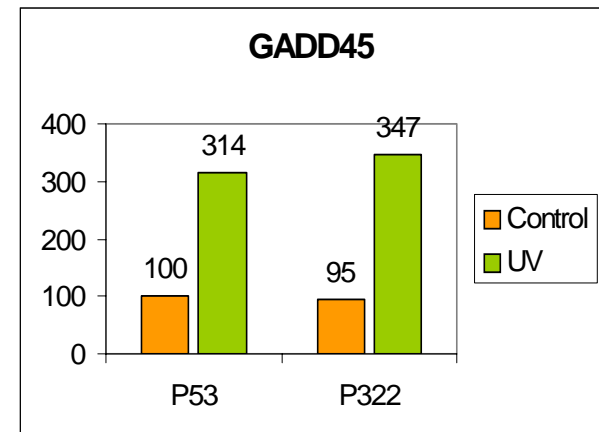
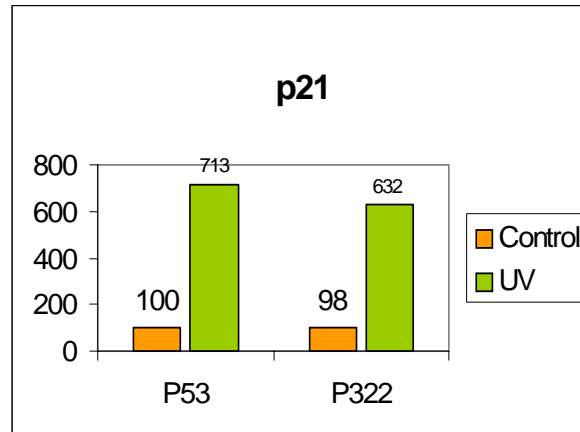
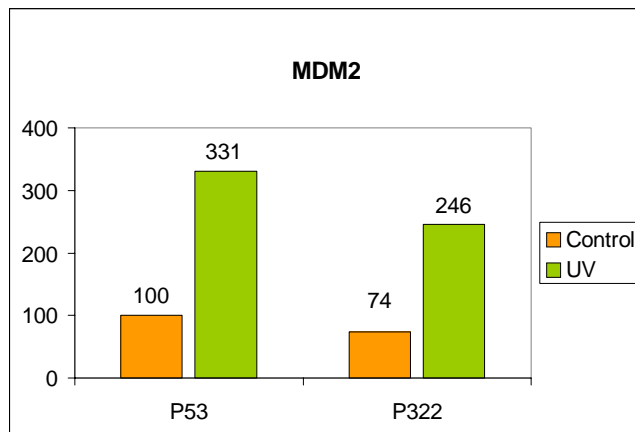


**Funkce p53 není ovlivněna mutací v hESC**  
(2 hESC linie; nízká a vysoká pasáž)  
Stanoveno funkční analýzou v kvasinkách (FASAY)

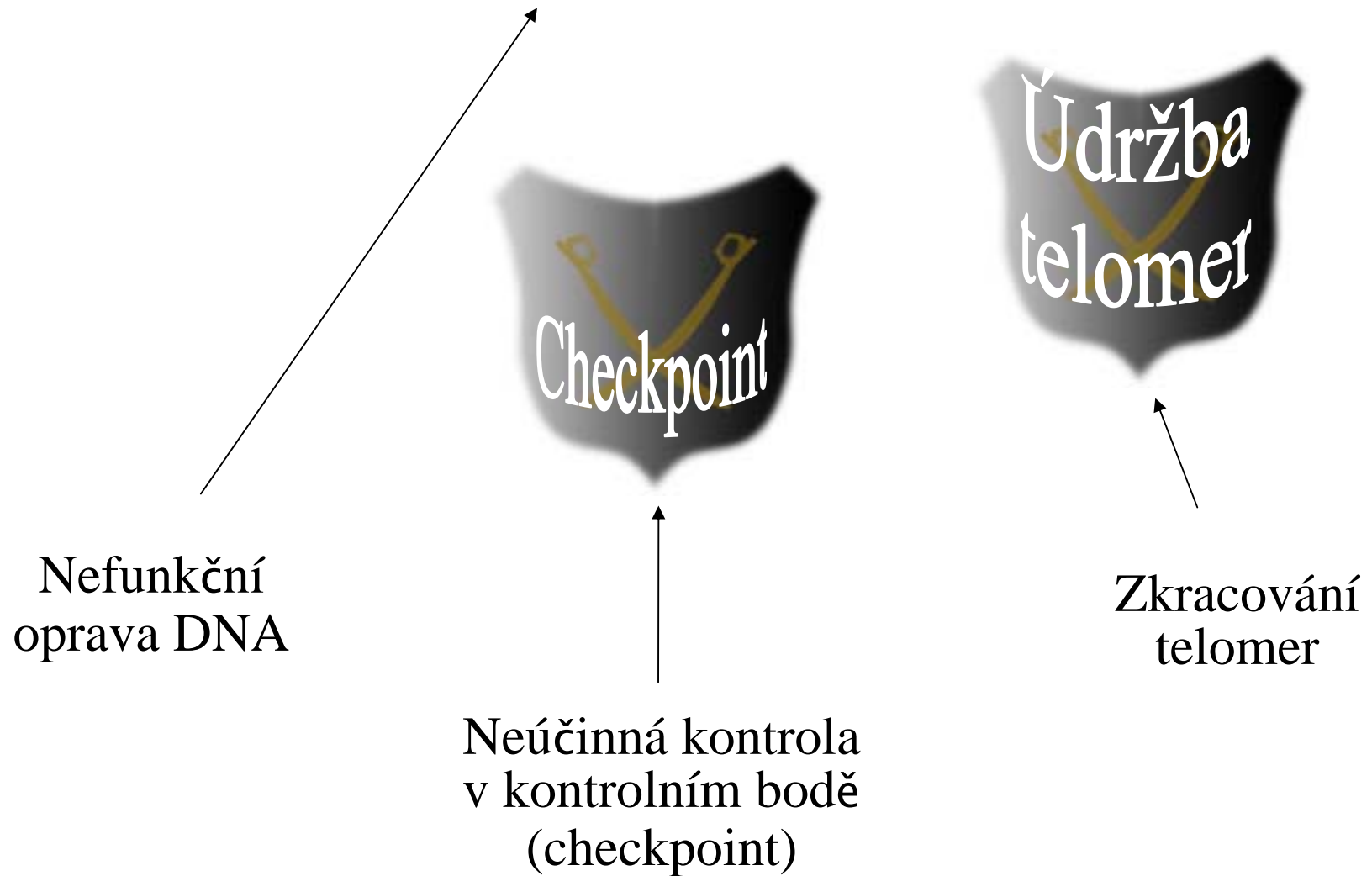
# P53 v hESC aktivuje cílové molekuly bez ohledu na pasáž



mRNA:



# Nestabilní genom



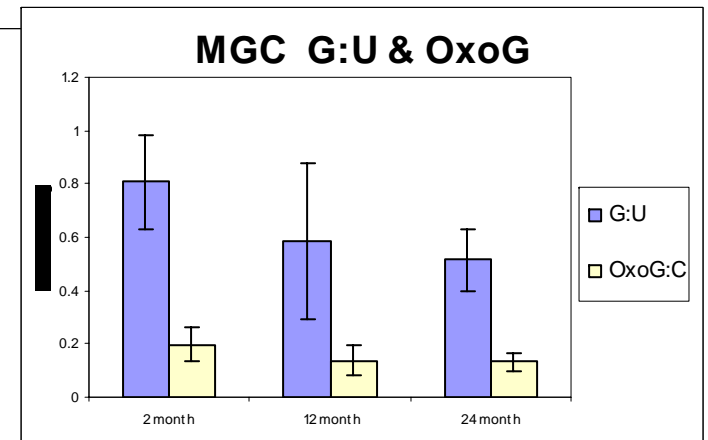
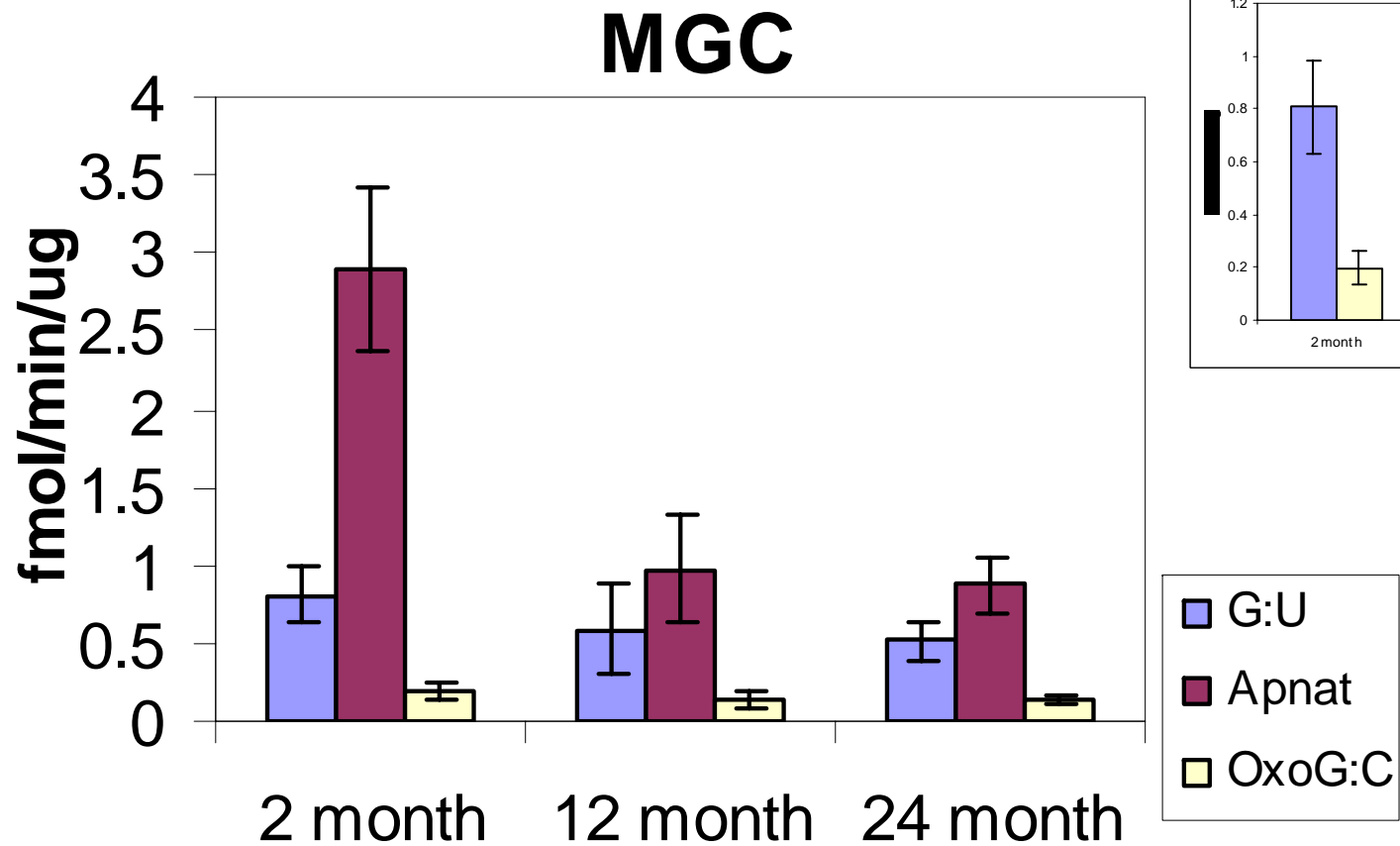
# Odhadnuté dávky poškození DNA

<b>Damage</b>	<b>Amount/cell/day</b>
<b>SSB</b>	<b>20,000-40,000</b>
<b>apurinic sites</b>	<b>10,000-50.000*</b>
<b>deamination</b>	<b>100-300</b>
<b>oxidative base damage (total)</b>	<b>10,000</b>
<b>N<sup>7</sup>meG</b>	<b>4,000</b>
<b>N<sup>3</sup>meA</b>	<b>600</b>
<b>O<sup>6</sup>meG</b>	<b>10-30</b>

**Recent findings\*\* up to 50.000 - 500.000 AP sites per cell per day**

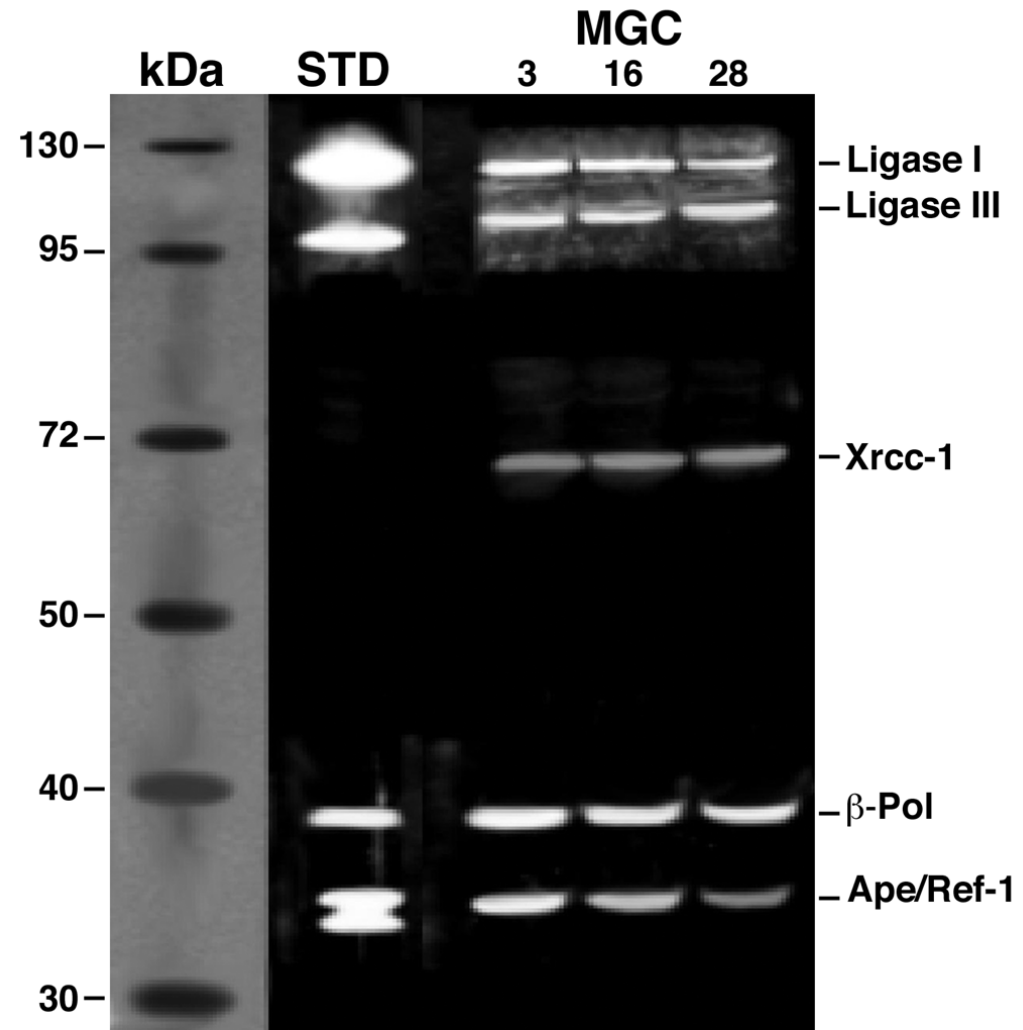
\* Lindahl et al. 1972\*\* Nakamura et al. 1999

# BER v zárodečných buňkách slábne s rostoucím věkem

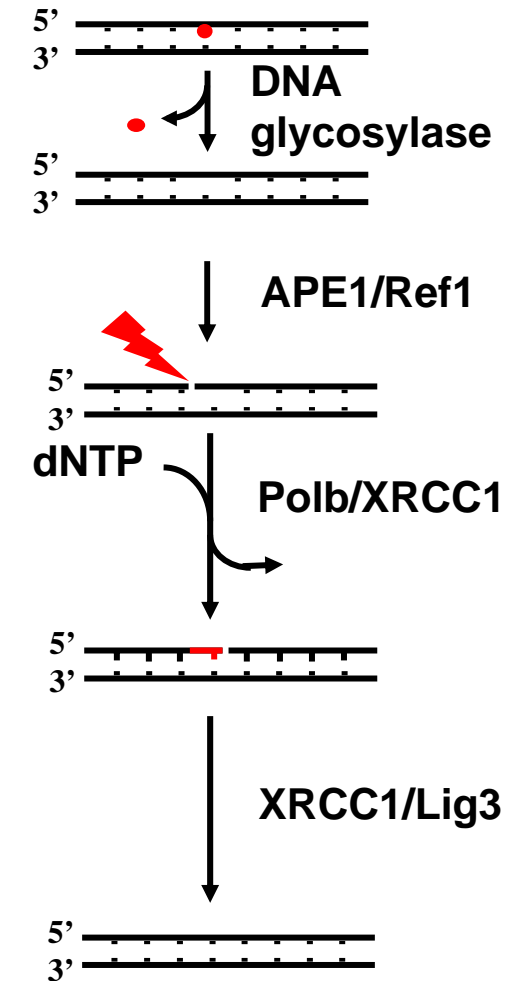
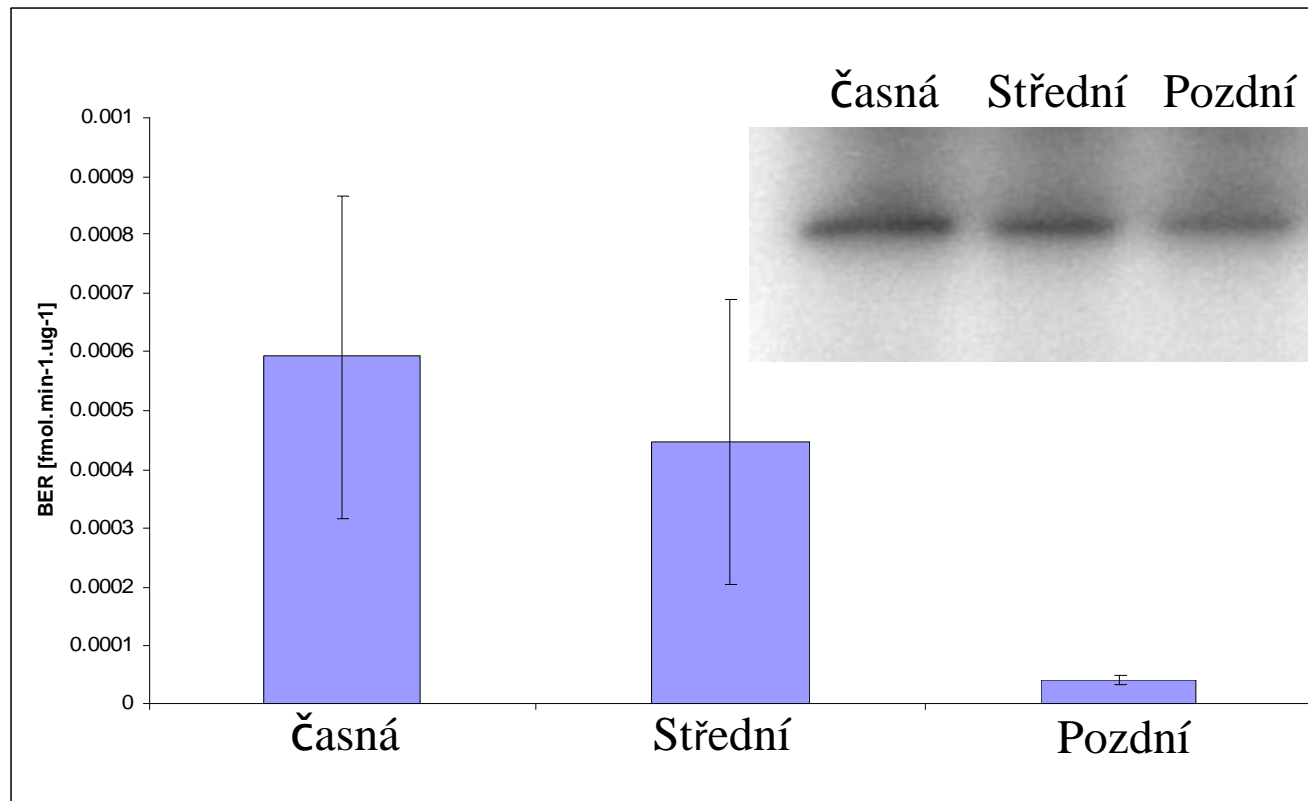


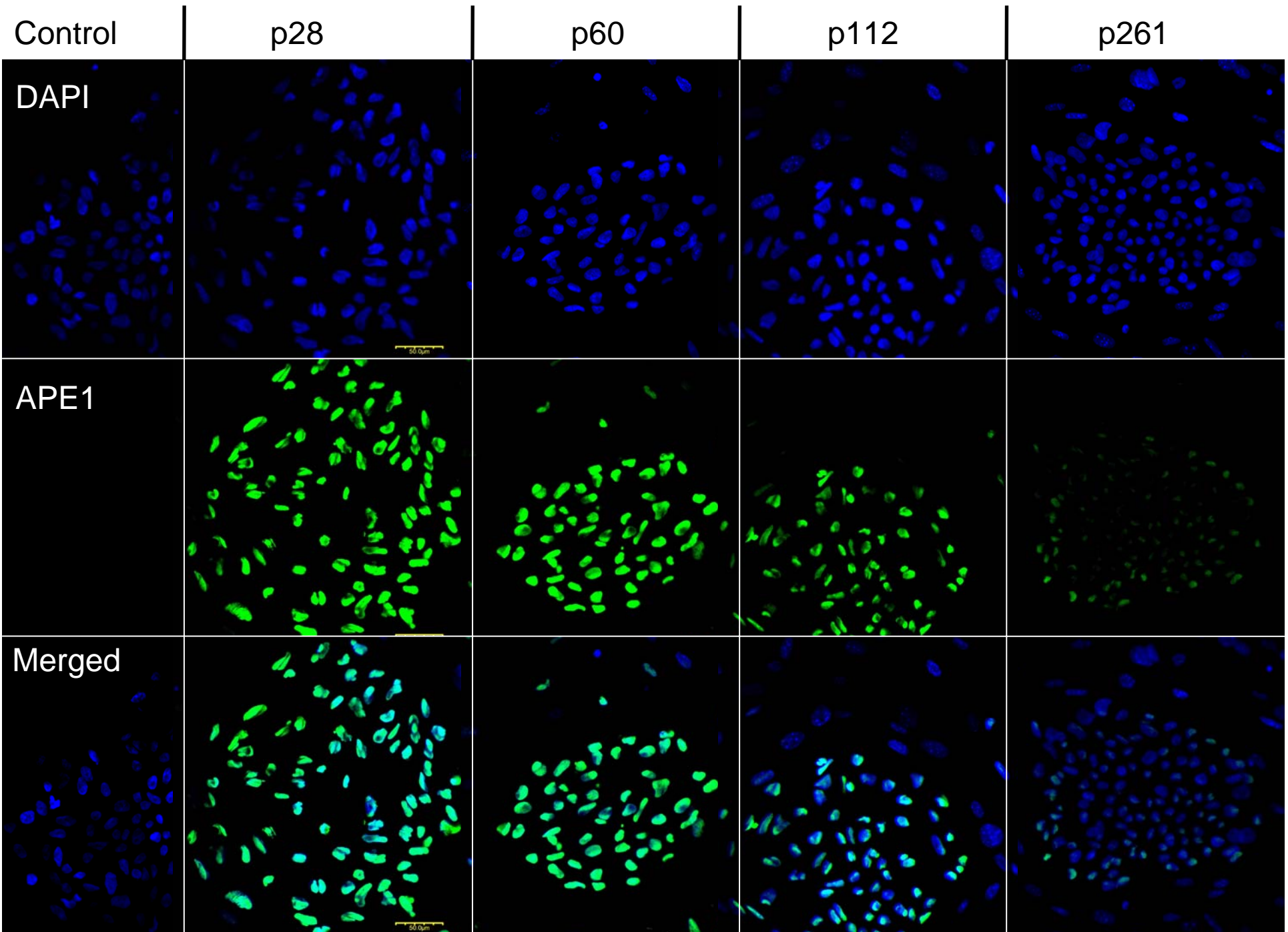
# BER

proteiny v  
jaderných  
extraktech  
zárodečných  
buněk

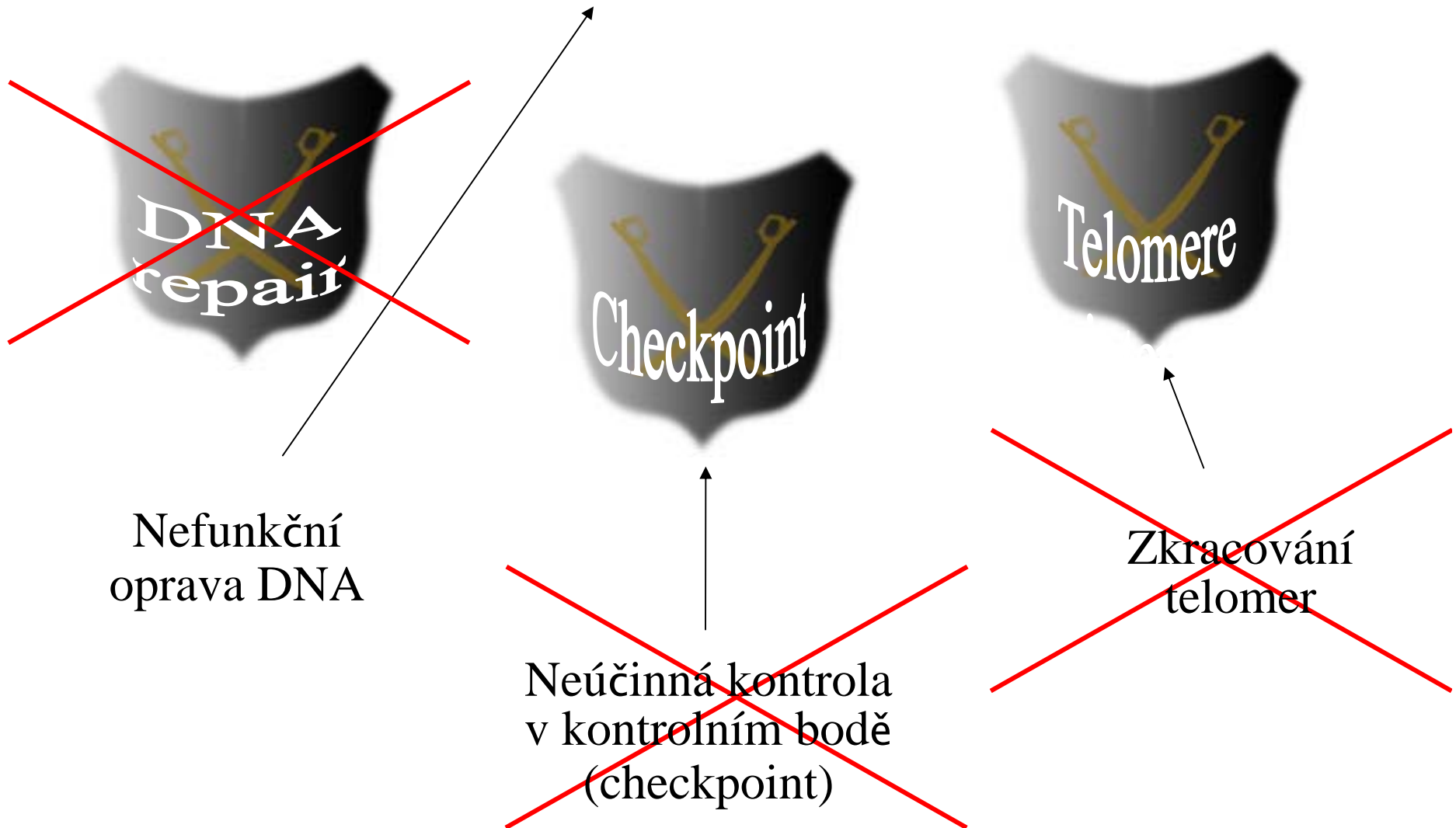


# Aktivita BER u hESC při dlouhodobé kultivaci

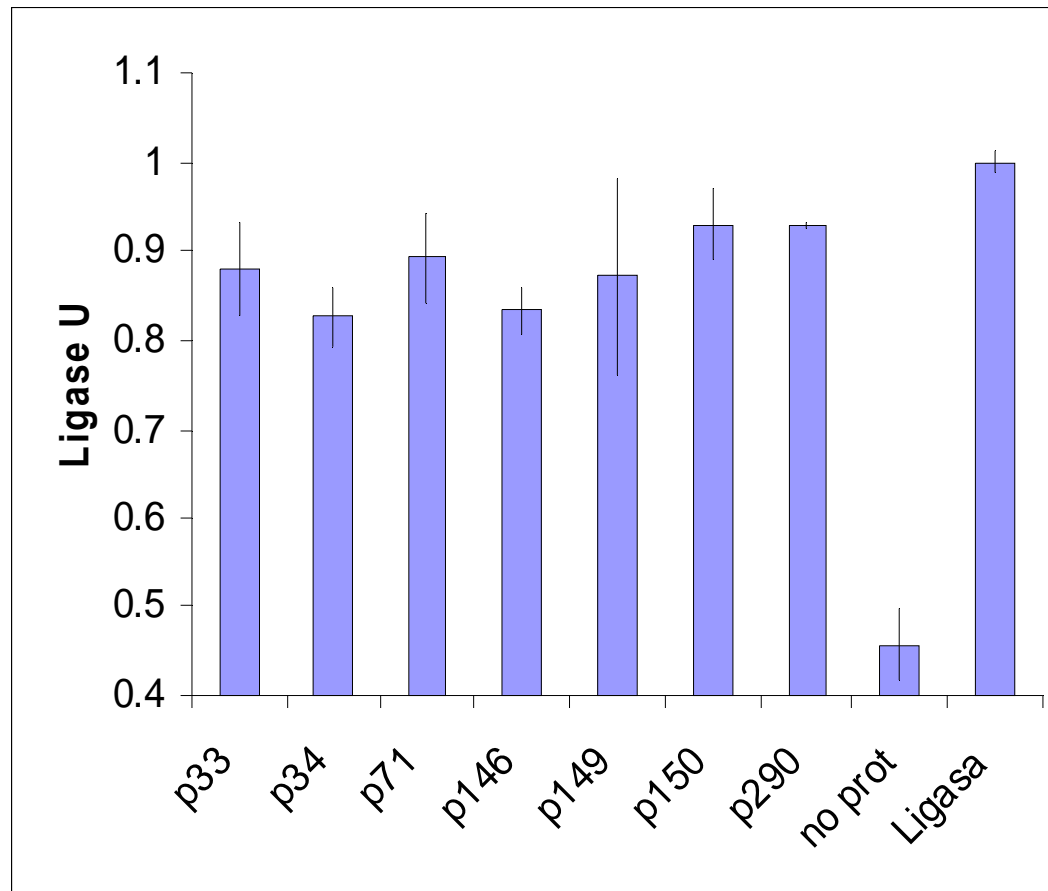




# Nestabilní genom

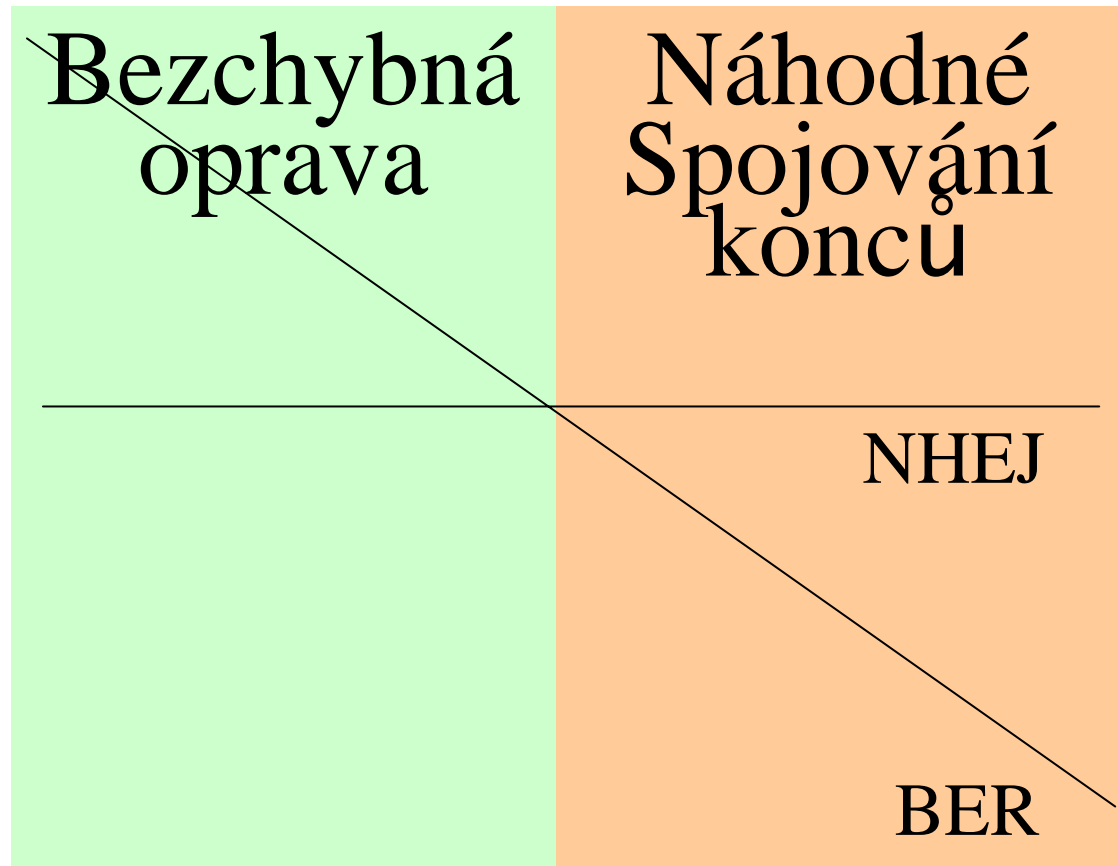


# Aktivita spojování konců je v hESC vysoká bez ohledu na pasáž

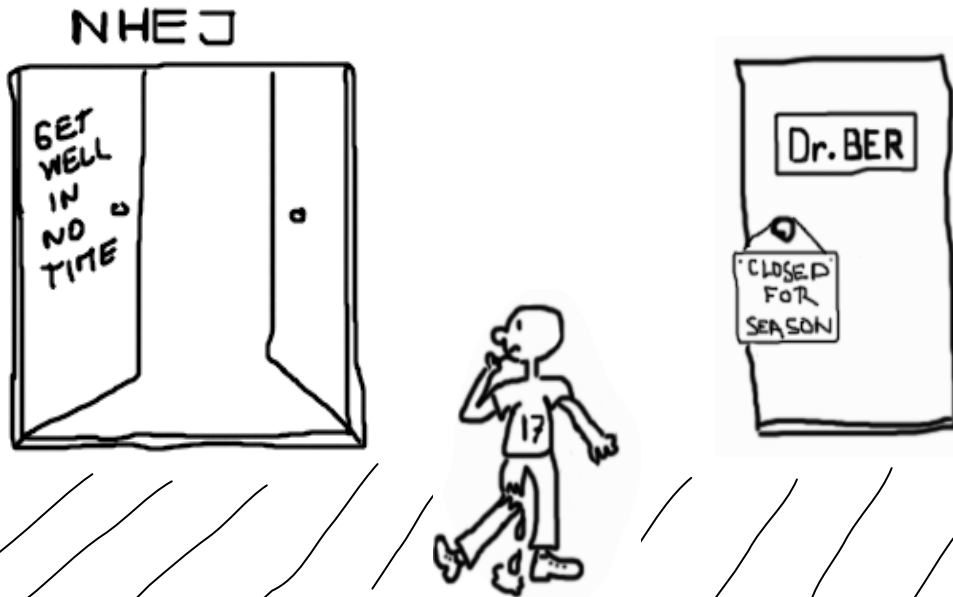


# Proposed Model

Selhání BER  
↓  
Akumulace oxidativního poškození  
↓  
Akumulace jedno a dvouřetězcových zlomů

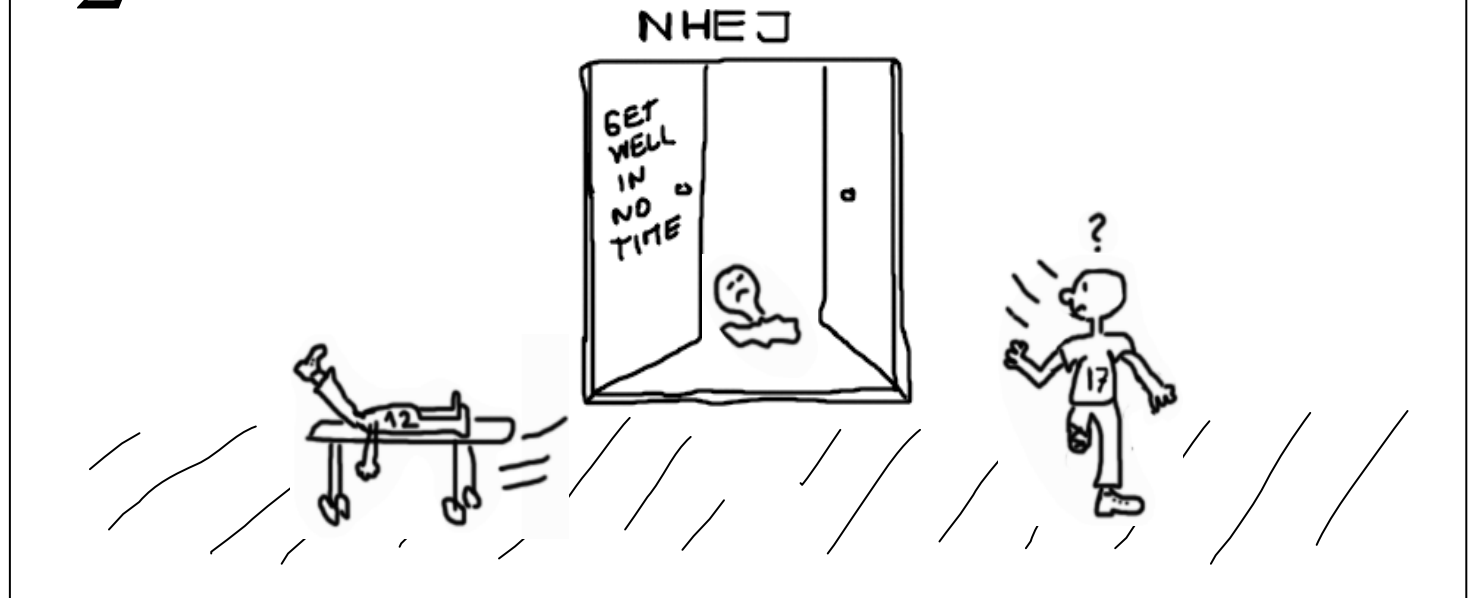


1



Xsome  
Clinic

2



# Shrnutí

- S rostoucí pasáží klesá stabilita genomu hESC
- Vysoká telomerázová aktivita bez ohledu na pasáž
- P53 kontrolní dráha pracuje korektně bez ohledu na pasáž
- Vysoká aktivita NHEJ bez ohledu na pasáž
- Aktivita BER klesá s rostoucí pasáží
- APE1 je korektně lokalizována v jádře  
pokles koncentrace APE1 stojí za poklesem BER

50.0µm

# Many thanks to...

Petr Dvorak & Ales Hampl

Tomas Barta

Josef Jaros

Vitezslav Kriz

Zuzana Holubcova

Martina Vodinska

Klara Koudelkova

Iveta Peterkova

Jiri Fajkus

Zuzana Kunicka

Vendula Vernerova

Vladimir Vinarsky

Jan Verner

Sarka Pospisilova



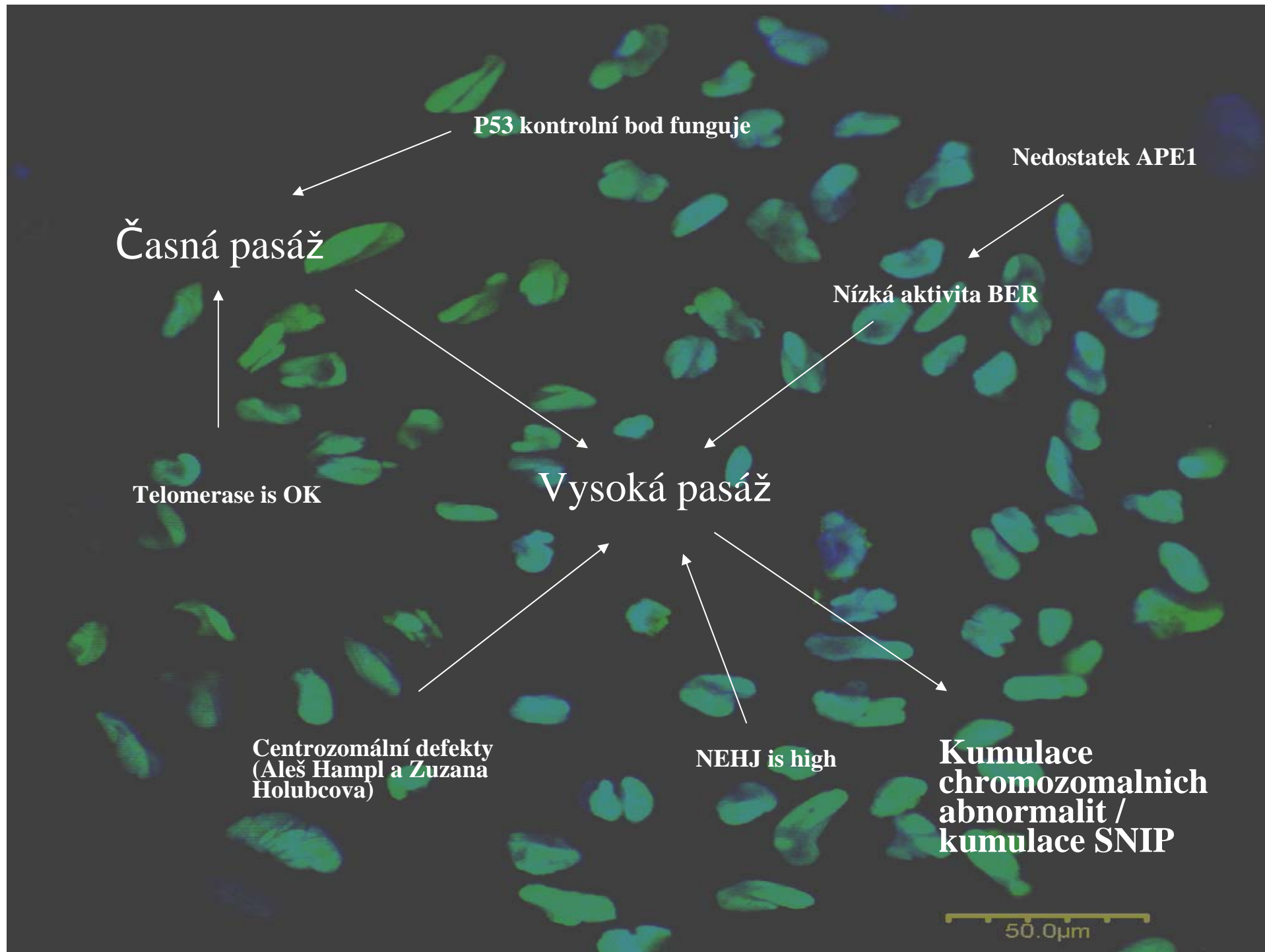
# Money thanks to:

- EU-6FP, Platforms for biomedical discovery with human
- ES cells – ESTOOLS, grant number 018739
- Centre for Chemical Genetics, Ministry of Education,
- Youth and Sports, grant number LC06077

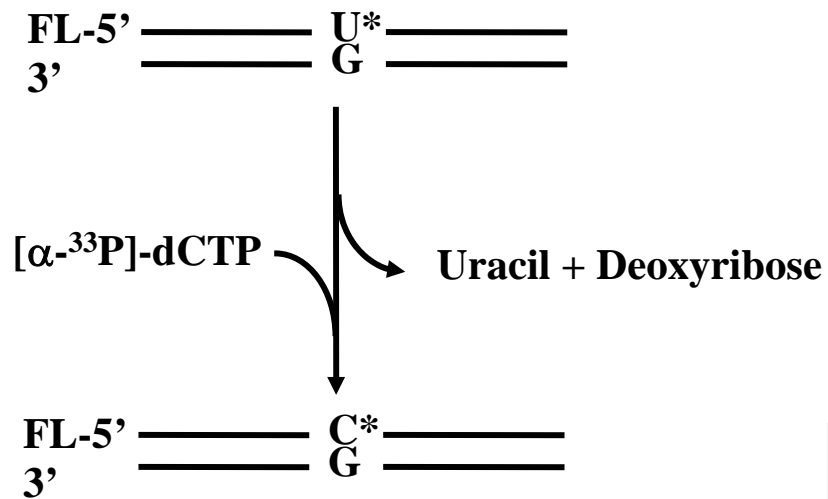
50.0µm

Konec

... elixír mládí až příště...

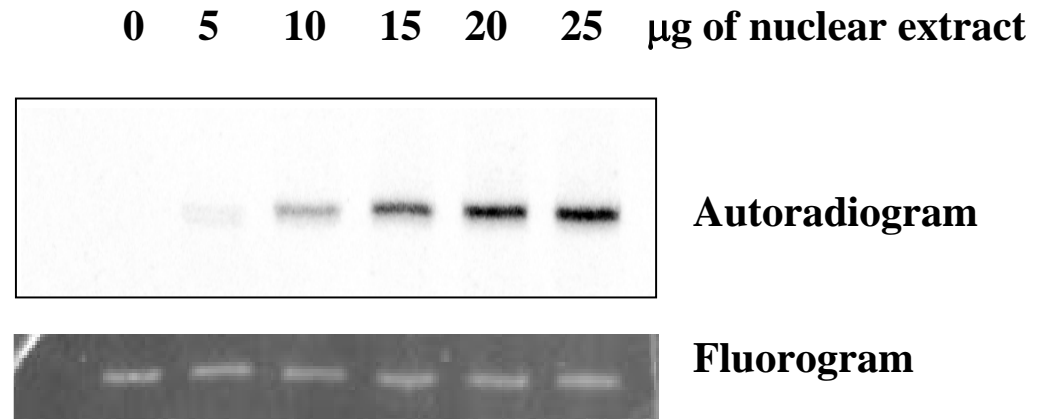


# Short Patch BER assay (G:U lesion)



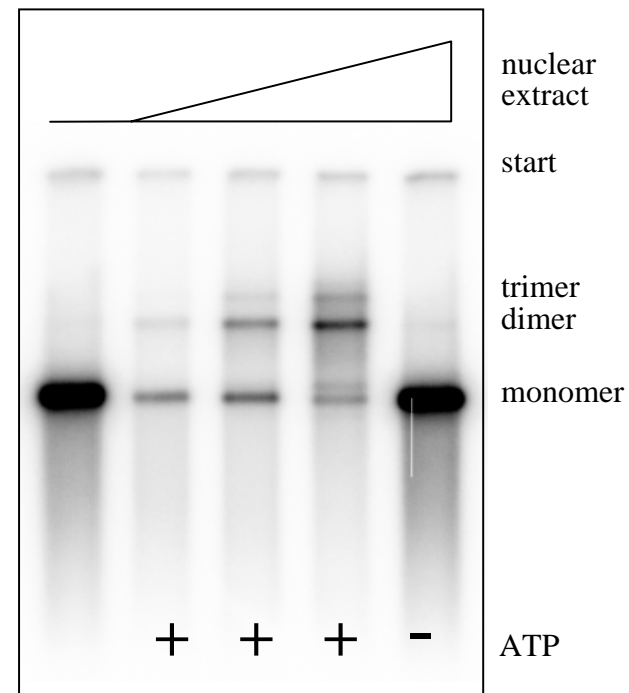
\* Oligonucleotides carrying different lesions were used in this study.

*In vitro* BER assay Using Purified Nuclear Extract



# Non...NHEJ in hESC

- Nuclear extract from hESC
- End labeled linear DNA
- ATP dependent



# Chromosome Clinic



# Chromosome Clinic

