

人类异倍性细胞的组学分析

- ◆ 成员：周旭：2012304110146、猿慧:2012304110072
- ◆ Ppt制作：周旭
- ◆ 学院：生命科学技术学院

LOGO

背景

人类染色体异倍性的定义：个体或系统所具有的染色体数目较之该种固有的基本染色体数 x 的整数多一条至数条，或少一条至数条的现象。

人类染色体通常是以二倍体这一整数存在，但在某些特定的情况下，也会出现异倍体的细胞或者个体，这样就会出现生理机能异常的个体与疾病。

现今最为常见的疾病便是21三体综合症，又称为唐氏综合症。

特征：发育迟缓、智力障碍、语言、运动发育障碍，并且大多伴随着畸形。

其次还有18三体综合症、13三体综合症、性染色体缺失或者增加等等。



21三体综合征（唐氏综合症，21号染色体多一条）



背景



A newborn male with full trisomy 13 (Patau syndrome). this baby has a cleft palate, atrial septal defect, inguinal hernia, and postaxial polydactyly of the left hand.

13三体综合征

+13三体综合征与21三体综合征非常近似，也是13号染色体多出一个，造成的异倍性，导致个体生理机能出现异常，形成的染色体疾病。

在13三体综合征的特征中，也是有着智力发育障碍、身体发育迟缓等等症状，但因为其生理机能变化更大，造成其畸形与生理机能残缺甚至比21三体综合征患者更为严重，内脏和脑、四肢的畸形更不少见，发病率也高于21三体综合征。而其余的染色体疾病导致的异倍性也是大多对人类有害，常染色体的异倍性大多导致人类生长发育障碍，畸形等等残疾。而性染色体的异倍性则是影响了第二性征的发育，造成发育不全，并且大多都是不孕不育。

背景

根据研究，对真核细胞而言异倍性是有害的，染色体数目的改变是婴儿自发流产以及残疾儿诞生的主要原因，在现代医学上研究和统计中，婴儿的自然流产中有近60%左右都是染色体异常造成。但染色体组的改变对生命体正常成长的影响的因素和原因至今还是并不清楚，并且在最新的研究之中发现，癌症细胞中，异倍性的影响并不如正常细胞那么巨大，很多的细胞研究分析中，染色体异倍性并不影响肿瘤细胞的增殖。

所以在研究异倍性细胞的生理机能变化，并且全面的从基因组、转录组和蛋白组对异倍性细胞的生理变化等等情况分析，就显得极为重要，不仅能明确异倍性细胞的基因组变化特点，也能对其转录过程和蛋白质含量和生理作用变化，进行分析研究，研究其潜在的机理。

研究方法 with 结论

首先人为建立了两条来自于人类细胞稳定遗传的三倍体和四倍体细胞系：**HCT116 和RPE-1。**

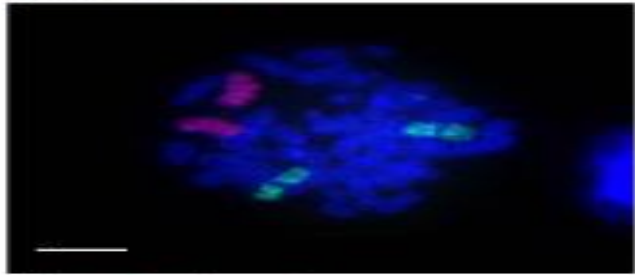
然后对其内细胞中改变的基因组、转录组和蛋白组以及相应的细胞通路进行量化，然后与二倍体的比较，进而了解相应的变化，对其变化的生理机能进行分析。

再通过相应的**多色荧光原位杂交**、荧光蛋白表达分析、比较基因组杂交分析等等方法来定位蛋白与基因组，并且进行细胞之中异倍性的相应定量分析。通过分析，得出**所有三染色体的和4染色体的细胞行都显示出显著的生长障碍现象**，四倍体的细胞系生长速度明显慢于三倍体的细胞系。并且在转录和蛋白组的分析中，得出相应的结果，表明异倍性的细胞相比于二倍体的细胞，转录水平反应了染色体拷贝数的变化，其中异倍体细胞中的一些蛋白，尤其是二级蛋白亚基和蛋白激酶，相比于二倍体细胞中含量要低，而在细胞新陈代谢中的通路途径也有所改变，其中异倍体细胞DNA和RNA的代谢途径都收到了抑制，而一些分子途径比如能量代谢、膜的新陈代谢和溶酶体途径却得到了促进。尤其是我们发现依赖于P62的选择自噬途径在三倍体和四倍体中非常活跃。

基因上的分析:

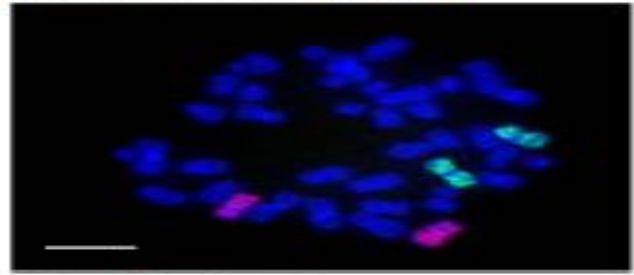
主要使用H2B-GFP来对染色体进行定位和分析。如下图:

HCT116



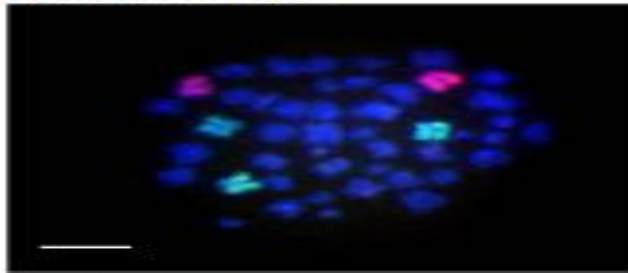
chr. 3 chr. 5

HCT116 H2B-GFP



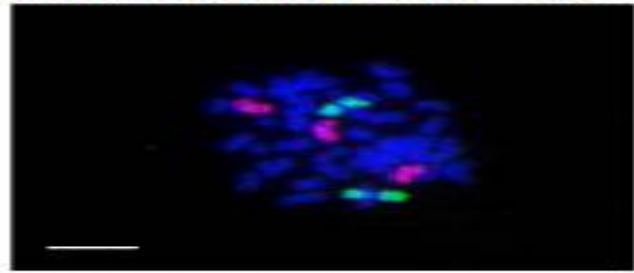
chr. 3 chr. 5

HCT116 3/3



chr. 3 chr. 5

HCT116 H2B-GFP 5/3



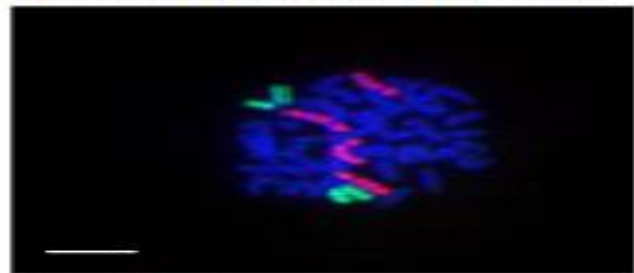
chr. 3 chr. 5

HCT116 5/4



chr. 2 chr. 5

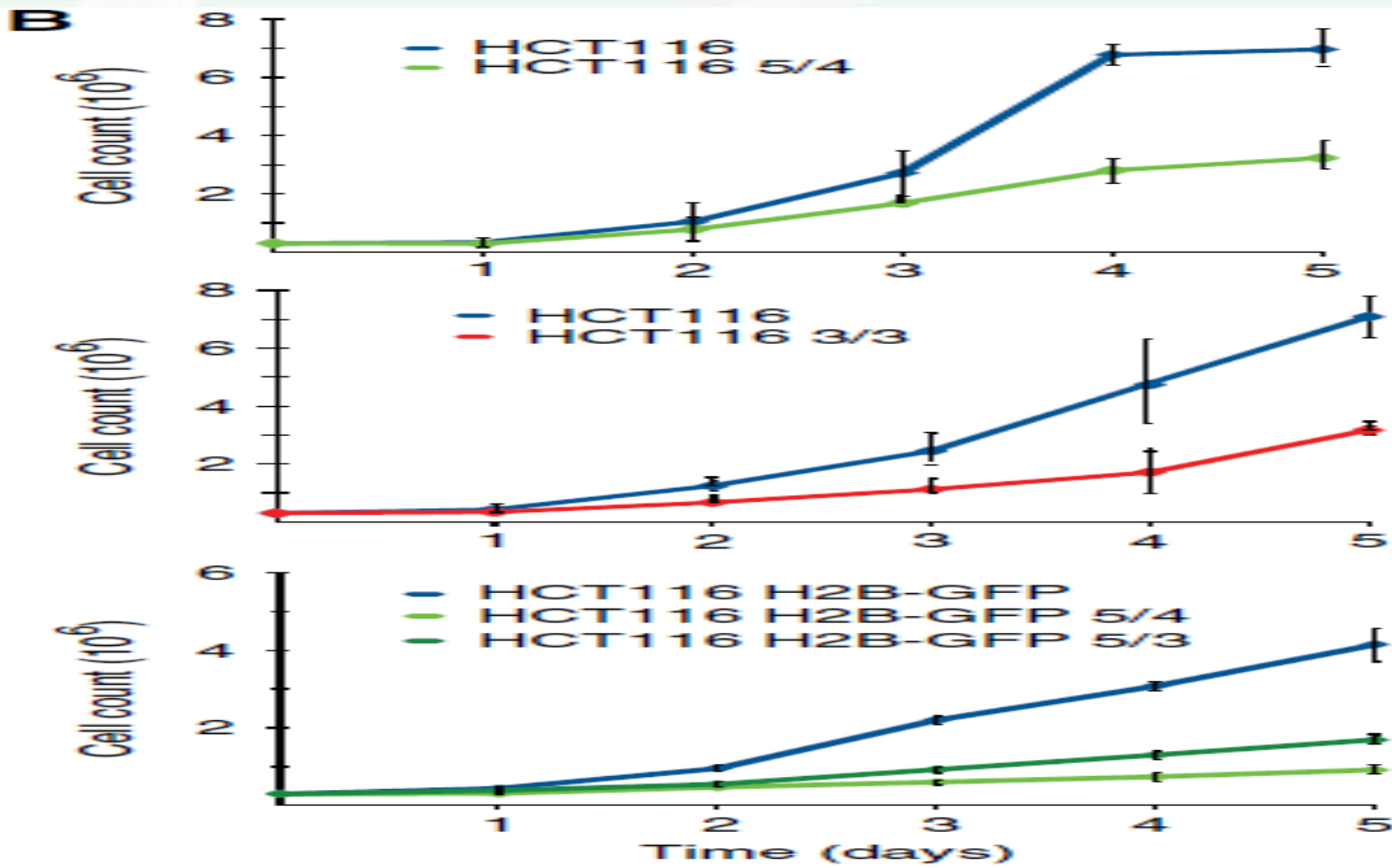
HCT116 H2B-GFP 5/4



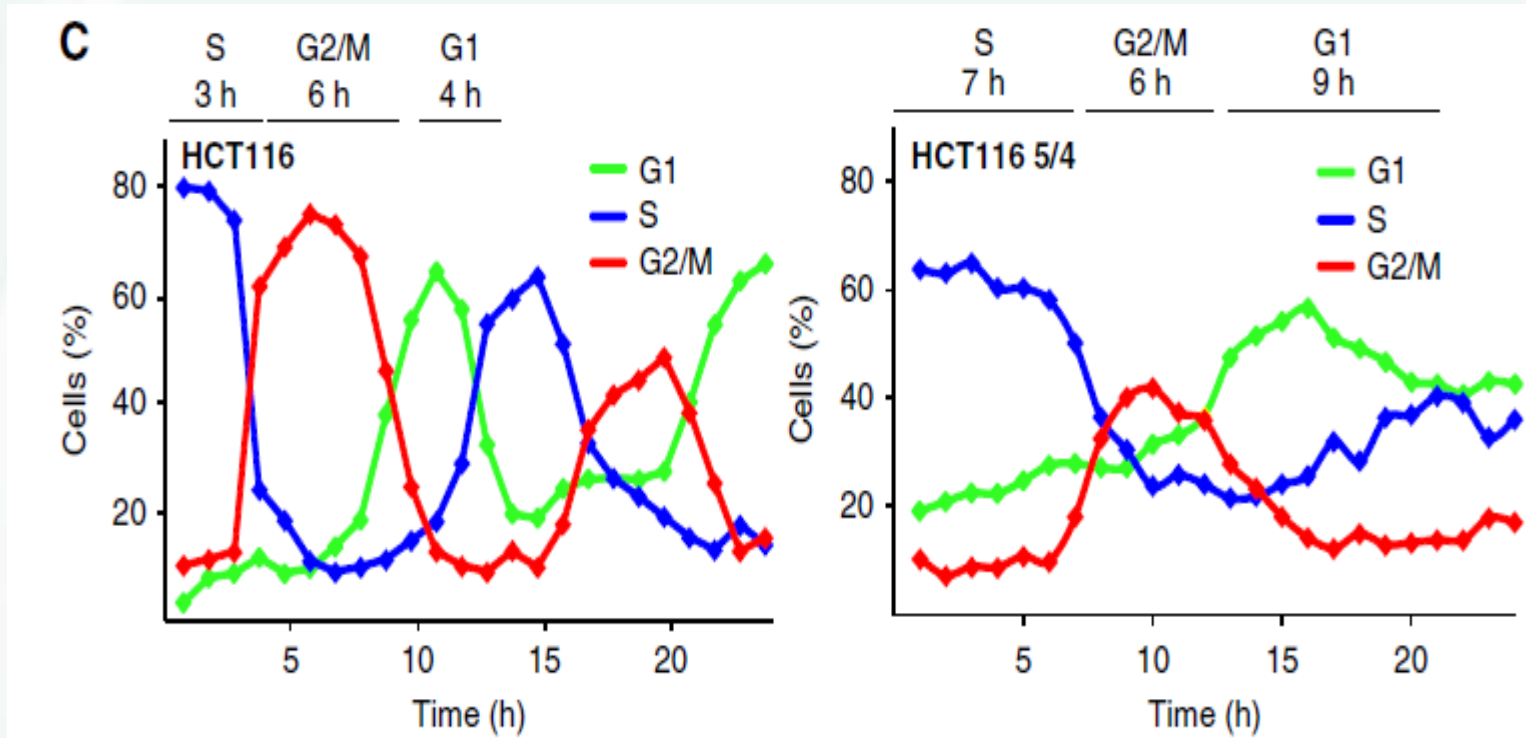
chr. 3 chr. 5

生长速度状况分析:

在对异倍体细胞的生长周期和状况分析之中，可以轻易的从下图看出。其中四倍体细胞生长速度明显慢于三倍体细胞，而三倍体的细胞慢于正常细胞，可见异倍性细胞的生长速度受到染色体的数量的调控。而其原因，对蛋白质和转录等方面定量分析过后，才确定是由于异倍体细胞中，复制和生长需要大量的能量，大量营养物质和合成大量的蛋白质，并且在细胞中需要有大量的自噬作用来维持蛋白质的稳定。

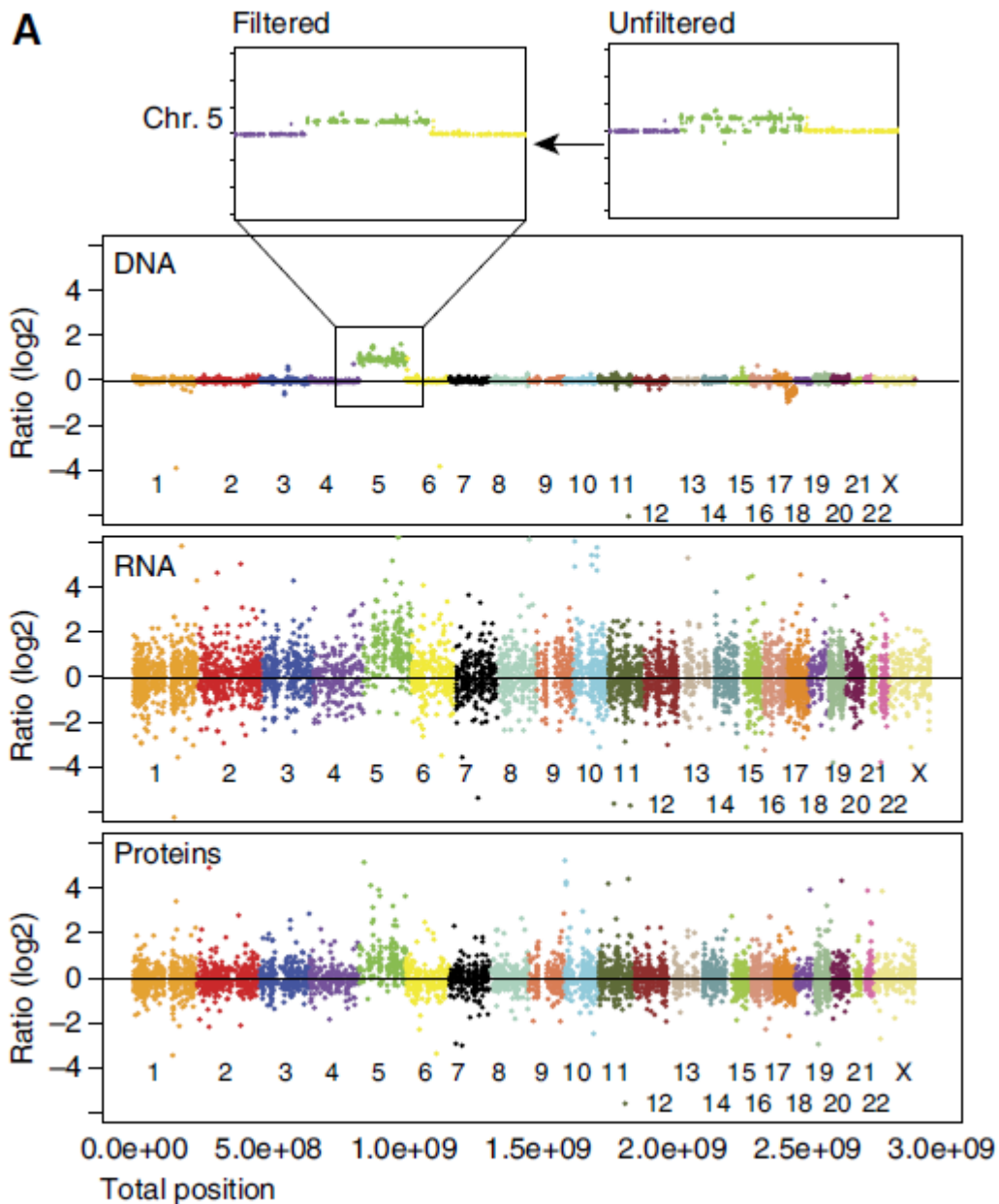


细胞周期的改变:



异倍体的细胞在细胞周期中，在G1和S阶段延迟为5和4 h，G1蛋白准备，而S的DNA合成，都是需要大量的物质和能量，这也造成了人类异倍体细胞中需要大量的时间去完成G1与S期的准备，造成细胞周期时间较长，生长缓慢的现象。

从基因、mRNA和蛋白的定量分析



无论是在二倍体还是在异倍体细胞中，其染色体拷贝数对其转录所需mRNA以及翻译出的蛋白总是呈现一定的相关性。但在异倍体细胞中，这基因组、转录组和产生的蛋白质有着一定的改变。

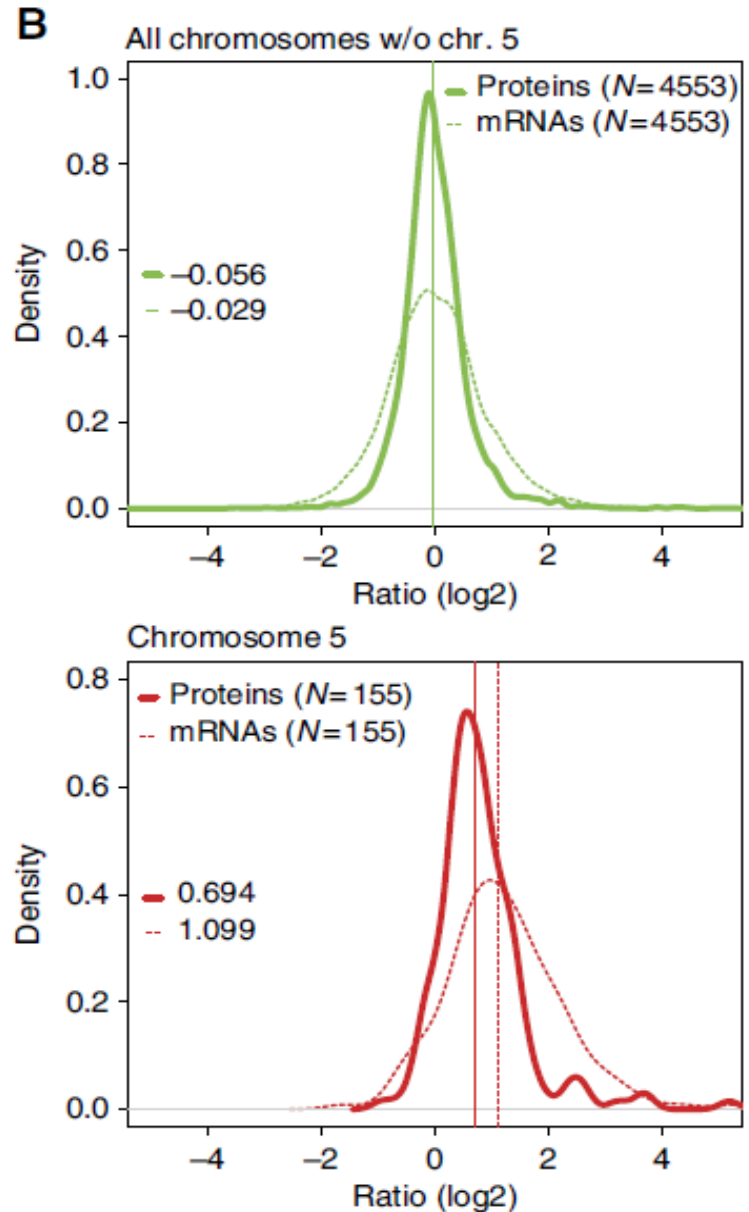
从理论上而言，异倍体细胞中染色体改变而引起mRNA呈现相应的正比例相关，而编码的蛋白质也应发生相应的改变，但是在对异倍体细胞的研究中，我们发现，其异倍体细胞中的mRNA与蛋白质的改变并不如期望中的那样。

左图为比较基因组杂交分析法得到的HCT116 5/4与HCT116两种细胞系中DNA、mRNA与蛋白质的比较分析。

从基因、mRNA和蛋白的定量分析

从右图对HCT116与HCT116 5/4两者间mRNA与蛋白质的分析可以看出，其理想状态之中二倍体的HCT116普通细胞mRNA与蛋白质中位线非常接近于零。

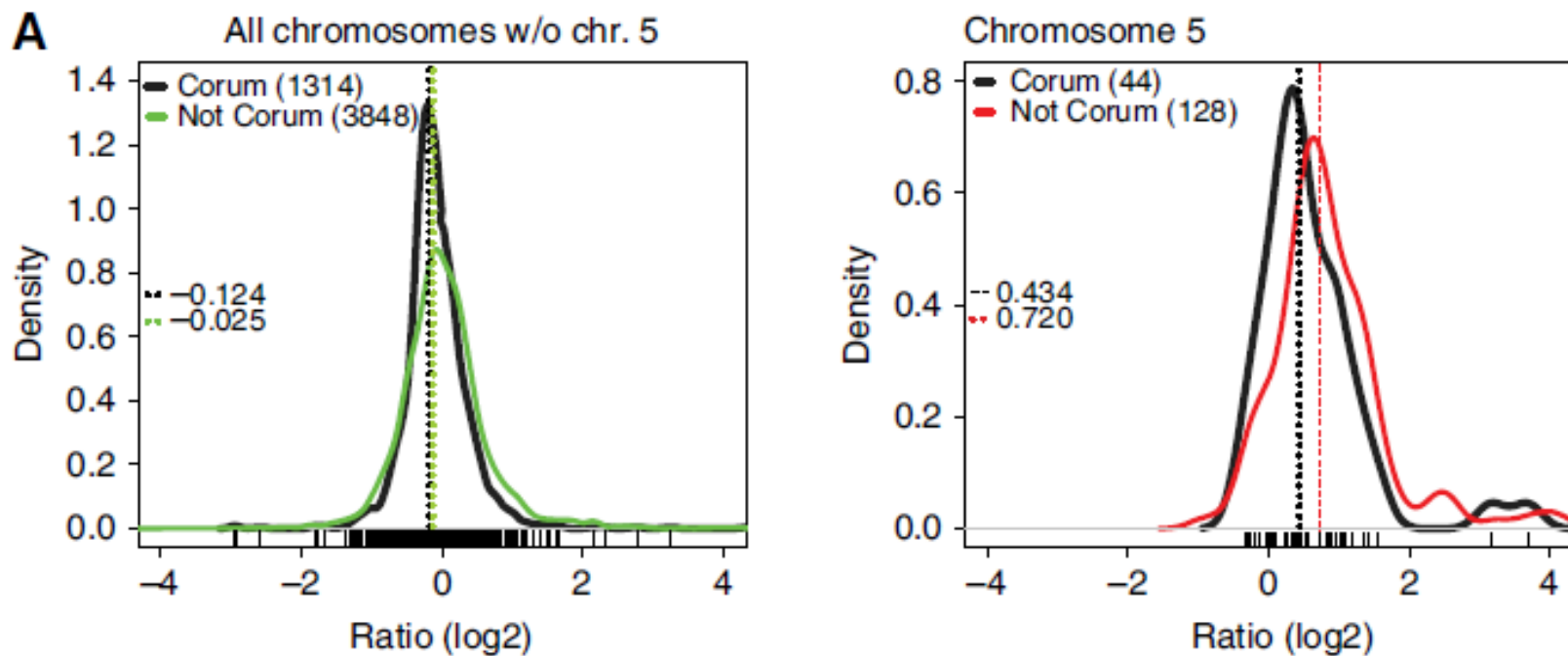
而在异倍体细胞中，mRNA的中位线理论值为1而实际测量的则是1.099，非常接近。但是蛋白的中位线变化只有0.694，与预期值不符。测定的197种蛋白中有近25%（57）含量明显偏低预期值。



从基因、mRNA和蛋白的定量分析

从上面我们经过分析得到一个结论，在异倍体细胞的蛋白表达过程中，而mRNA表达对应于增加染色体拷贝数中，大约四分之一的蛋白质的表达水平低于预期，其含量更类似于二倍体细胞的水平。

下图为CORUM复合物在正常二倍体细胞中与异倍体细胞中五号染色体编码表达的变化



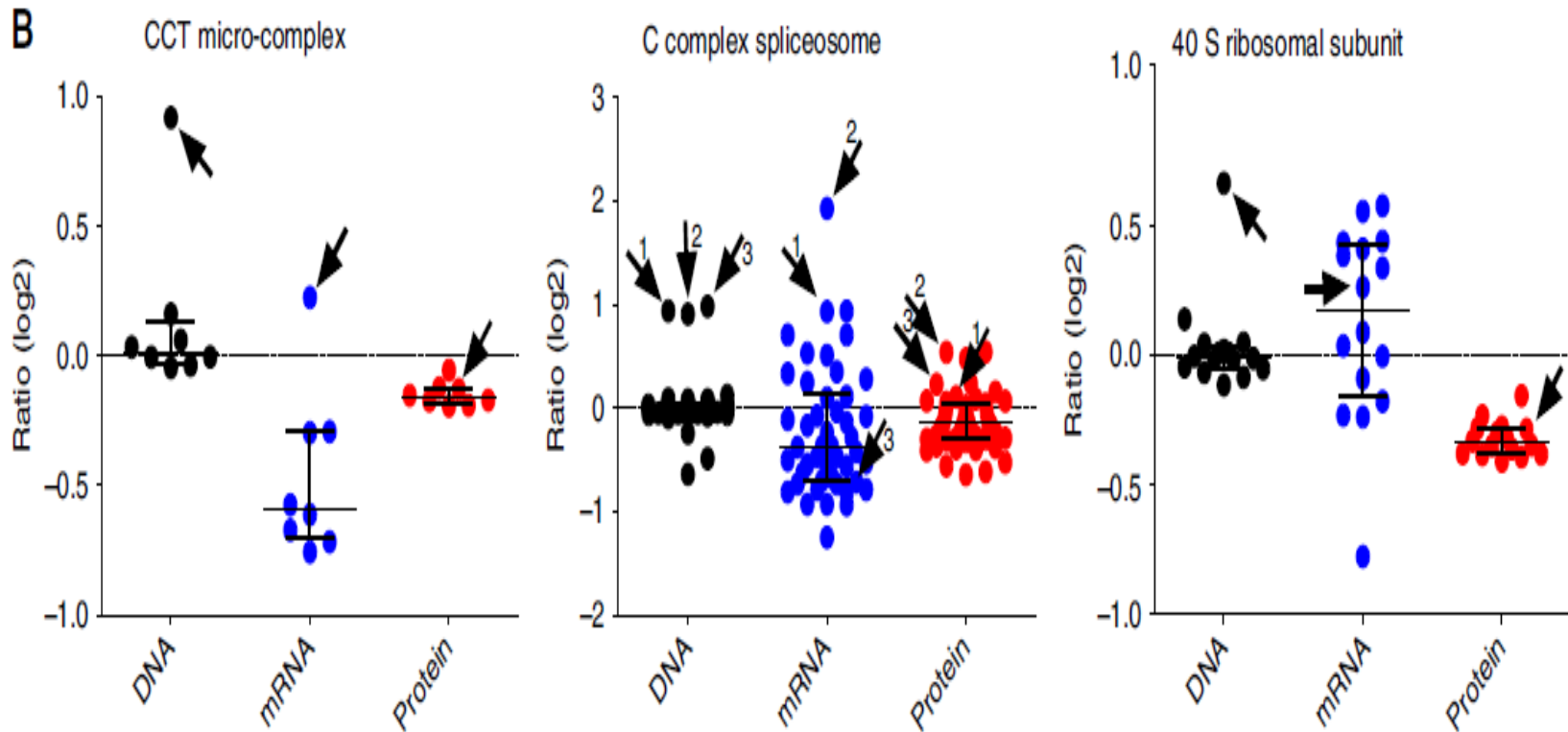
从基因、mRNA和蛋白的定量分析

通过分析，我们得知了大部分的异倍体细胞中的蛋白质是比二倍体细胞中的蛋白质更为丰富，但有一些蛋白质却是要低于我们预期的水平，并且含量向二倍体的细胞靠拢，其中一种假说认为这是因为在异倍体细胞中，这些蛋白质在退化。

经过我们的实验数据分析，我们得出HCT116 5/4四倍体五号染色体上编码的一些蛋白亚基复合物含量明显比预期值低，更类似于其父代的细胞系如：HCT116。而且随之，对四倍体细胞中的14种高分子复合物进行了分析，发现其中近57%的含量都接近于二倍体的水平。尽管他们之中的mRNA含量可能极为丰富，高于二倍体的细胞。



从基因、mRNA和蛋白的定量分析

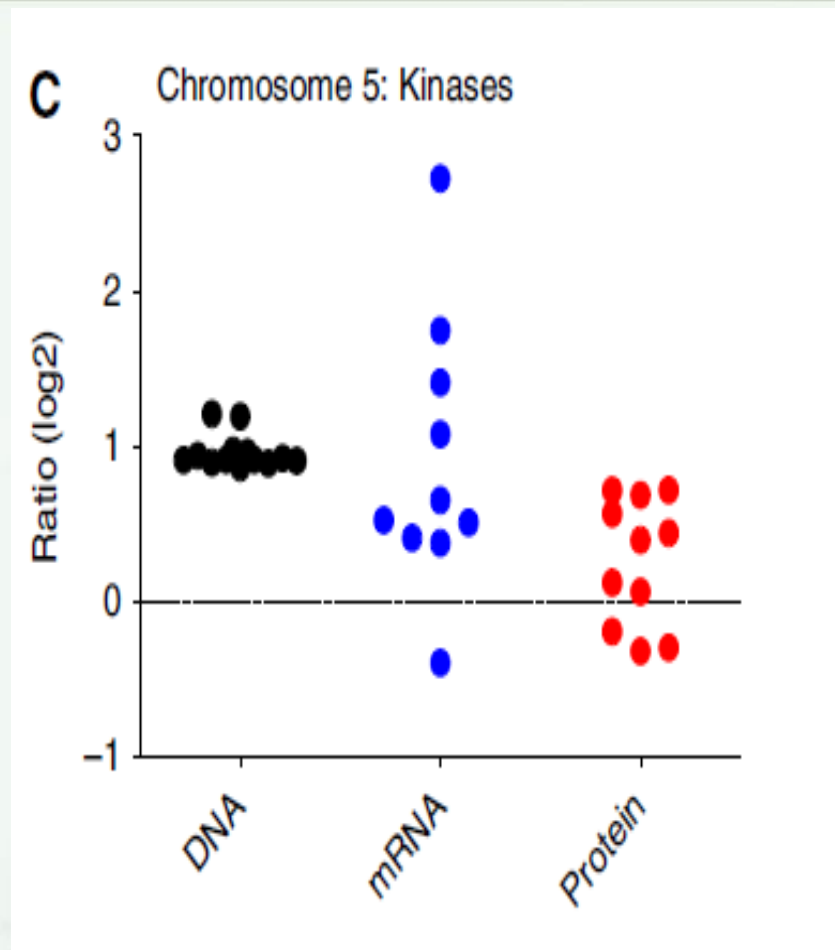


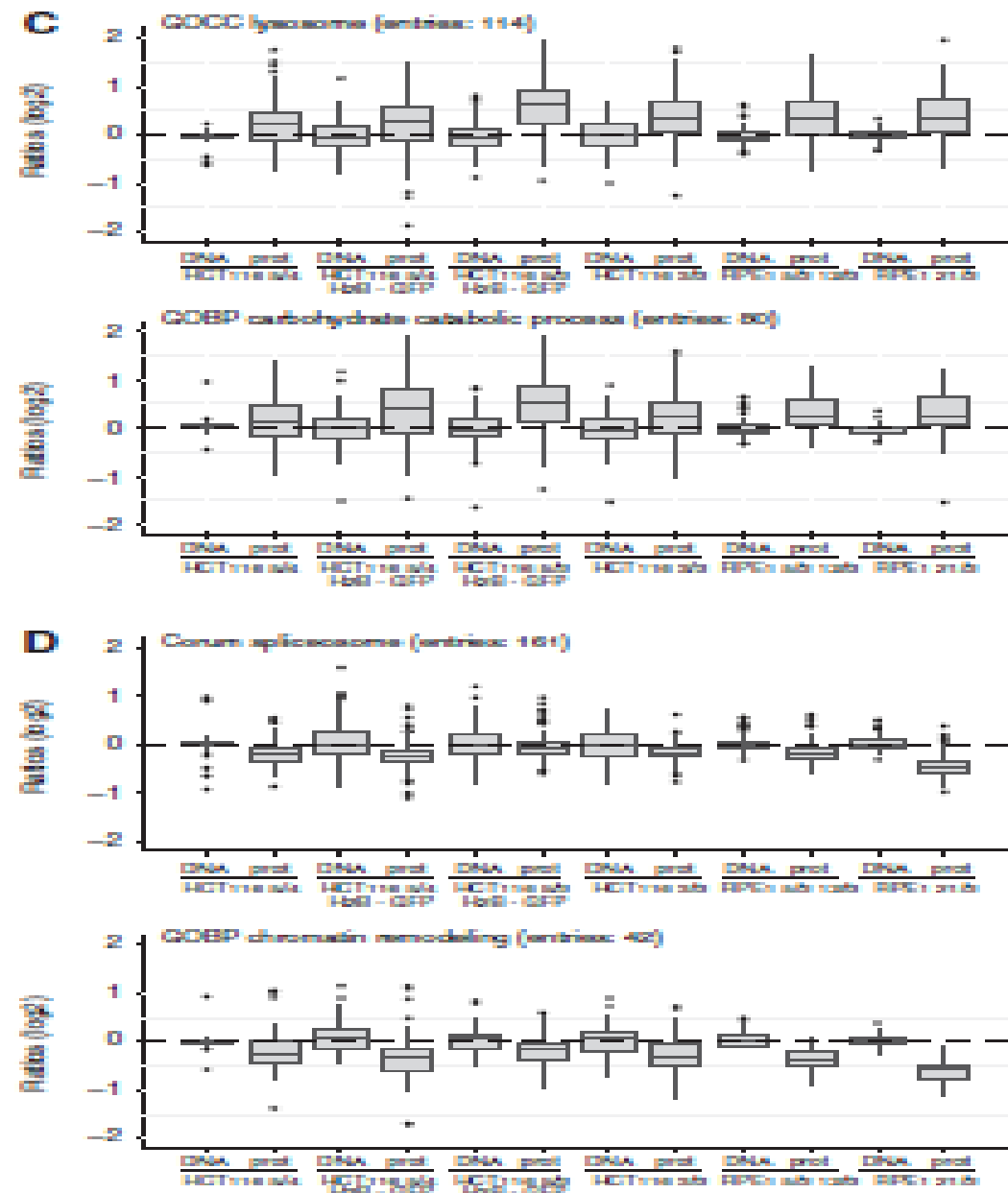
上图是通过恒流变压器对四倍体细胞中5号染色体表达的不同物质的检测，从左到右，分别是微复合物，剪接复合物，40s核糖体亚基，点表示一个基因所对应的量。箭头和数字标出了其中五号的染色体编码出的DNA与mRNA以及蛋白质

从基因、mRNA和蛋白的定量分析

并且，在对HCT116 5/4中蛋白激酶的分析中，发现其呈现的是一种双模式的调节，对于无补偿的蛋白激酶与分子途径优先相关，我们发现这种蛋白激酶含量在整个细胞中含量呈现整体上调的现象。而只有5号染色体上编码的蛋白激酶含量趋近于二倍体的细胞含量。

并且这个现象普遍的在三倍体和四倍体细胞中被发现，而并非是个别现象。



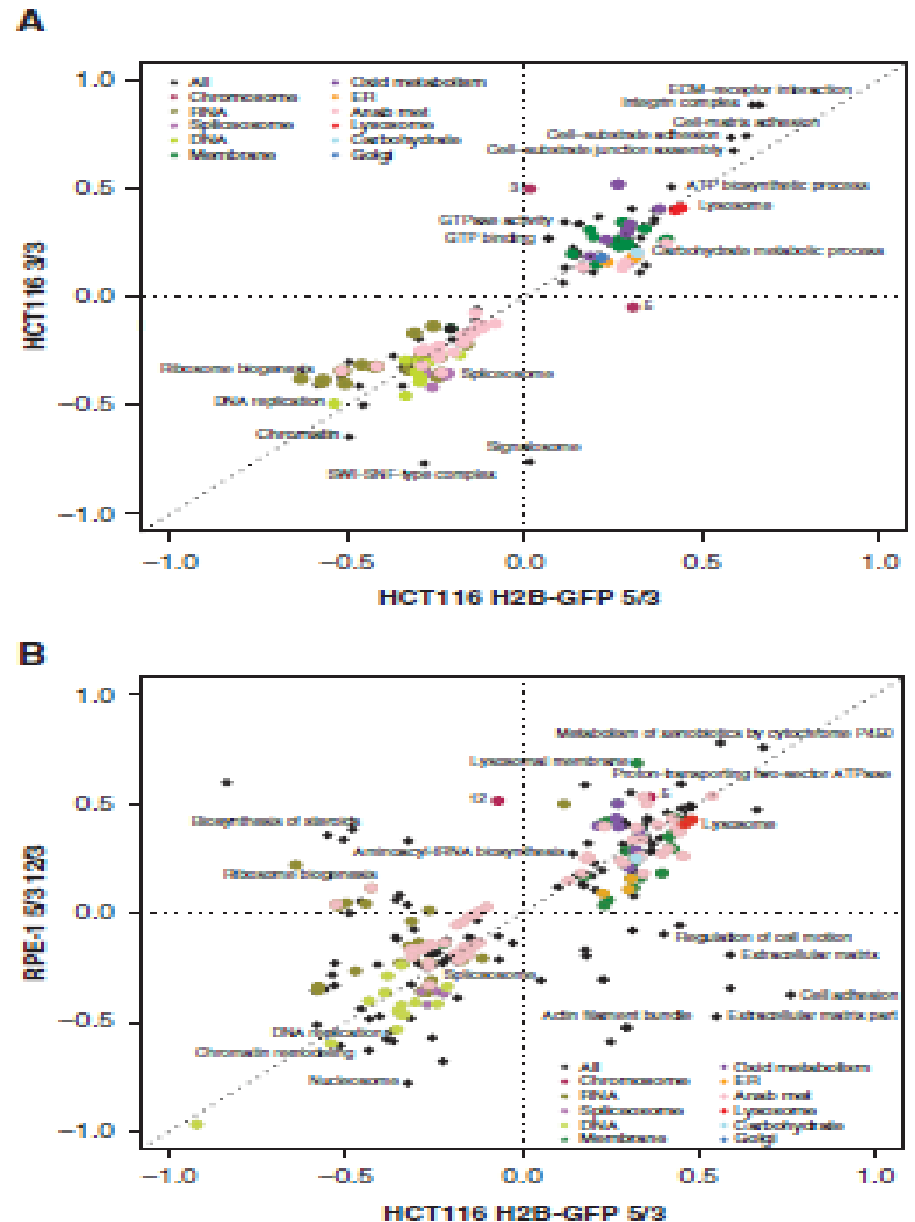


溶酶体中蛋白复合物
 分解代谢中的碳水化合物
 剪接体蛋白
 染色体重组蛋白
 在上面两幅图中，DNA
 编码的蛋白异倍体与二倍
 体的比率明显上升，而在
 下两幅图中编码的蛋白质
 却是出现下降



从细胞调节通路上分析细胞异倍性

对异倍体细胞中显著发生改变的细胞调节通路进行识别，对其进行量化处理，并且与已知的正常通路进行对照。利用相应的软件进行分析，得出的结果越是接近于-1则越是减少，而越是接近于+1则越是增多。右上图是HCT116 3/3与HCT116 H2B-GFP 5/3中染色体、mRNA、碳水化合物、新陈代谢氧化物等等的二维富集注释分析图，下图则是HCT116 H2B-GFP 5/3与RPE-1 5/3 12/3的比较。



从细胞调节通路上分析细胞异倍性

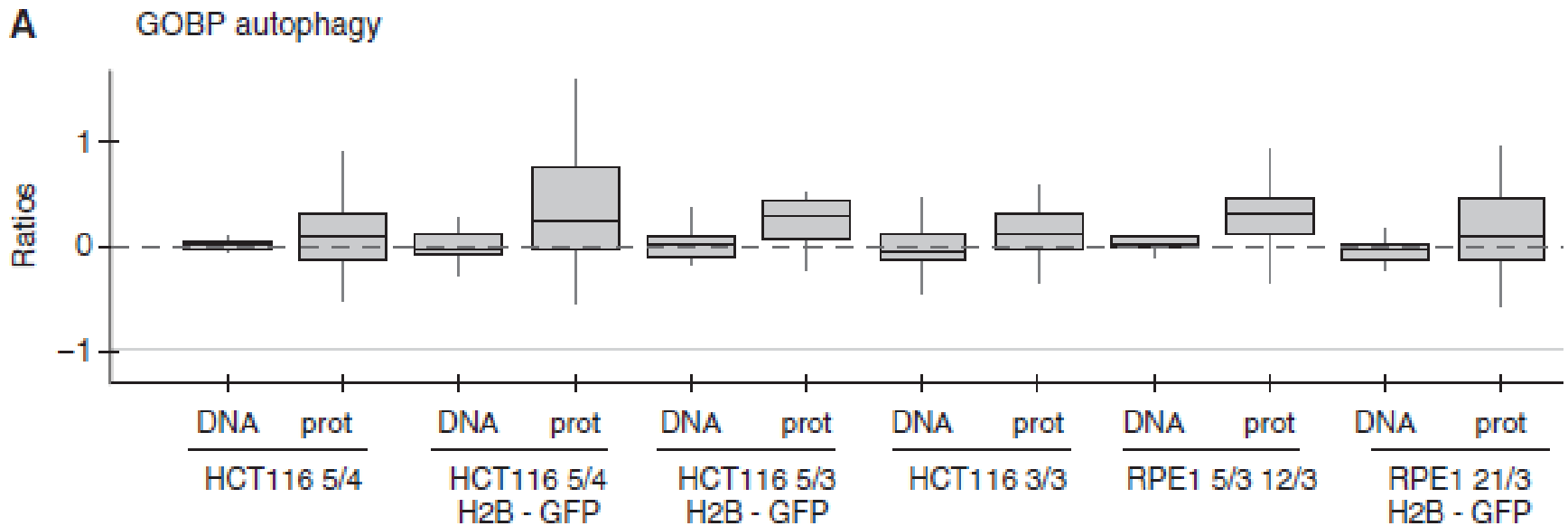
从上面两幅图之中，我们不难发现参与DNA和RNA的新陈代谢的分子途径和调节通路，如复制、DNA修复、转录和信使RNA处理，明显降低，这一点符合先前观察到的异倍体细胞增殖在G1与S期推迟的结论。调节类别中确定所有分析细胞株包含路径所需的脂质和膜生物起源、内质网、高尔基体囊泡和溶酶体的功能和能量代谢途径如线粒体呼吸代谢和碳水化合物代谢调节是上升的。

在分析过程中，还发现了在RPE-1和HCT116的三倍体和四倍体的衍生细胞系中，有相同的细胞通路改变，表明在三倍体和四倍体细胞的调节通路改变并不是由细胞类型亦或者特定的染色体决定，额外的染色体才是决定其一般的细胞反应改变的重要因素。



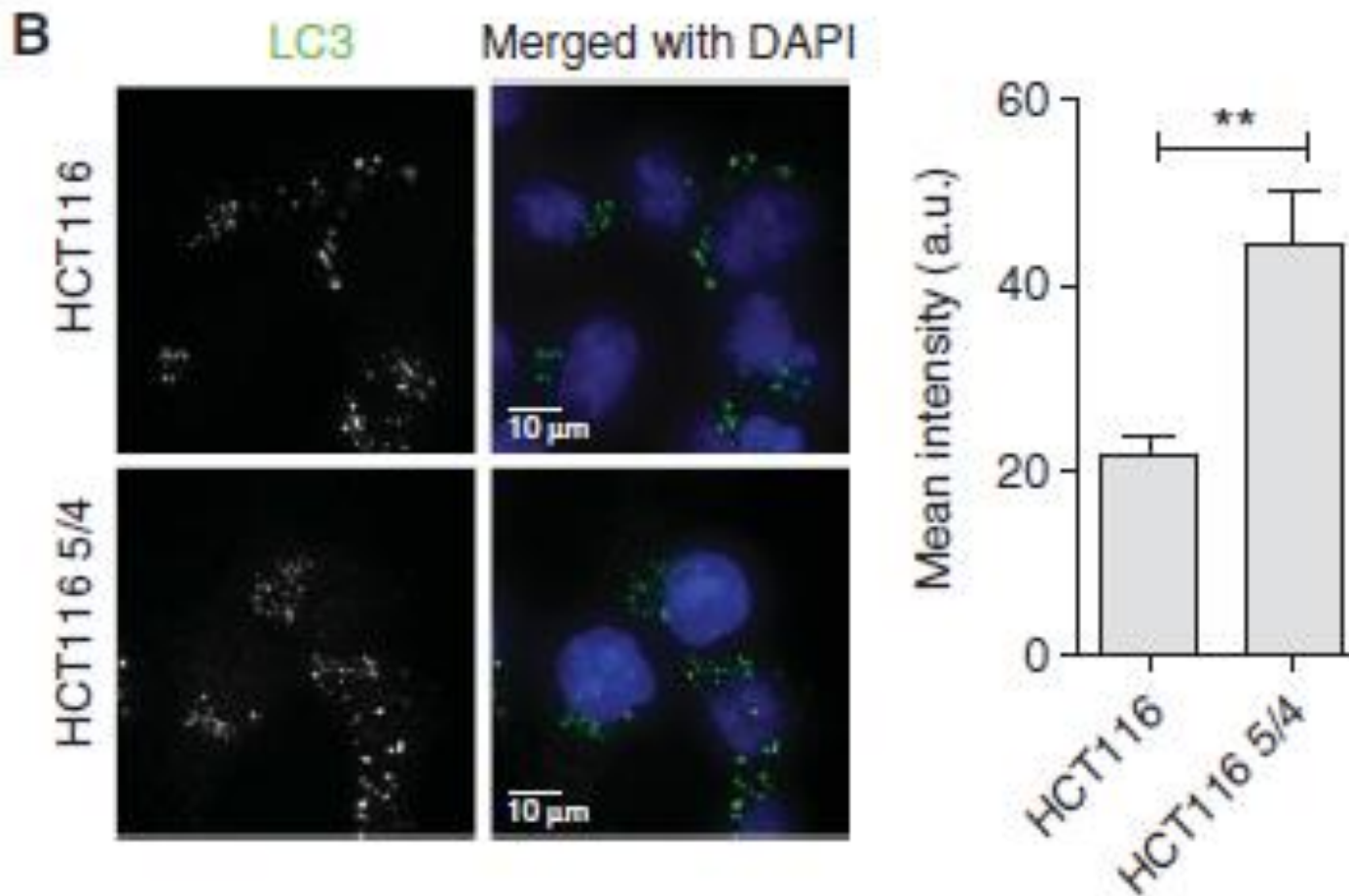
细胞自噬效应的改变

在异倍体细胞，尤其是三倍体和四倍体的细胞中，有证据表明，在这异倍体细胞中的细胞自噬作用极为活跃。自噬作用是用于排除已经受损或者多余的蛋白质和细胞器。以LC3为自噬途径的标示物，从而对细胞中自噬活动进行分析，以异倍体细胞和二倍体父代细胞进行比较，可以得出在异倍体细胞中自噬反应明显更为活跃。如下图。



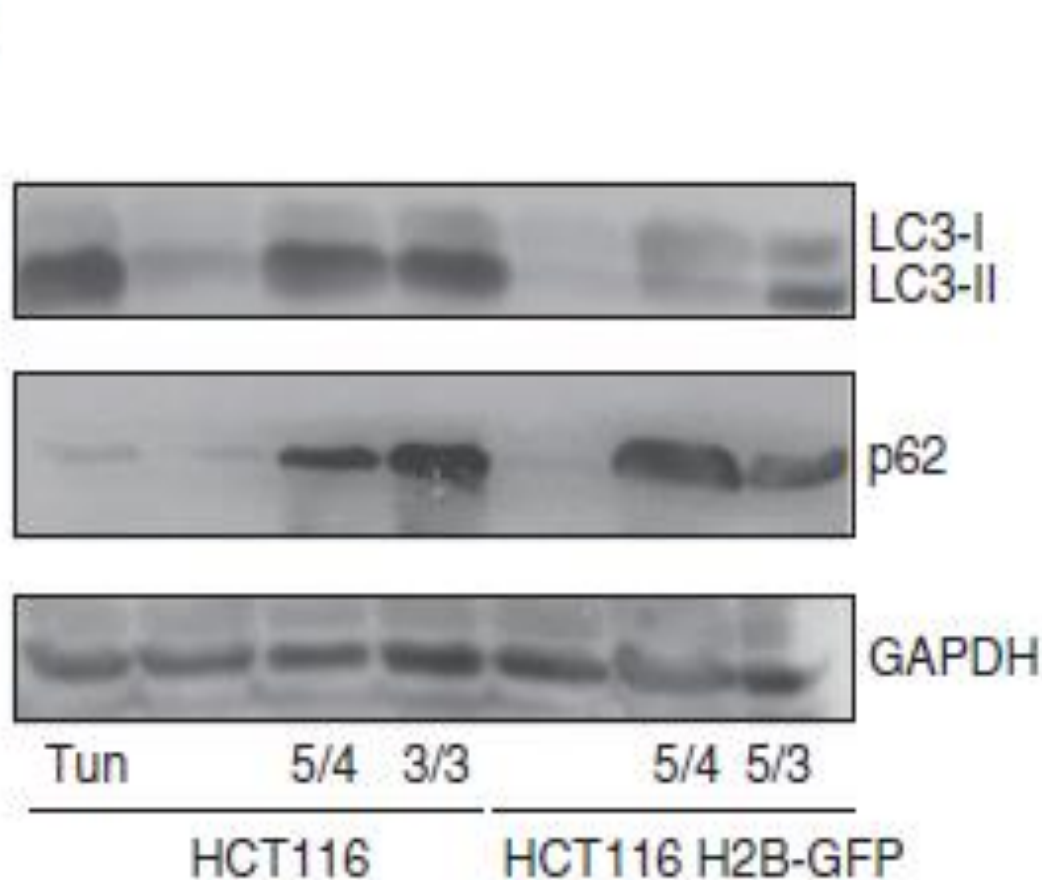
细胞自噬效应的改变

右图中，是LC3这一细胞自噬的标示物通过荧光免疫标记法显现出来的细胞图和含量比较，上图是HCT116二倍体细胞系。下图是HCT116 5/4 四倍体细胞系。



细胞自噬效应的改变

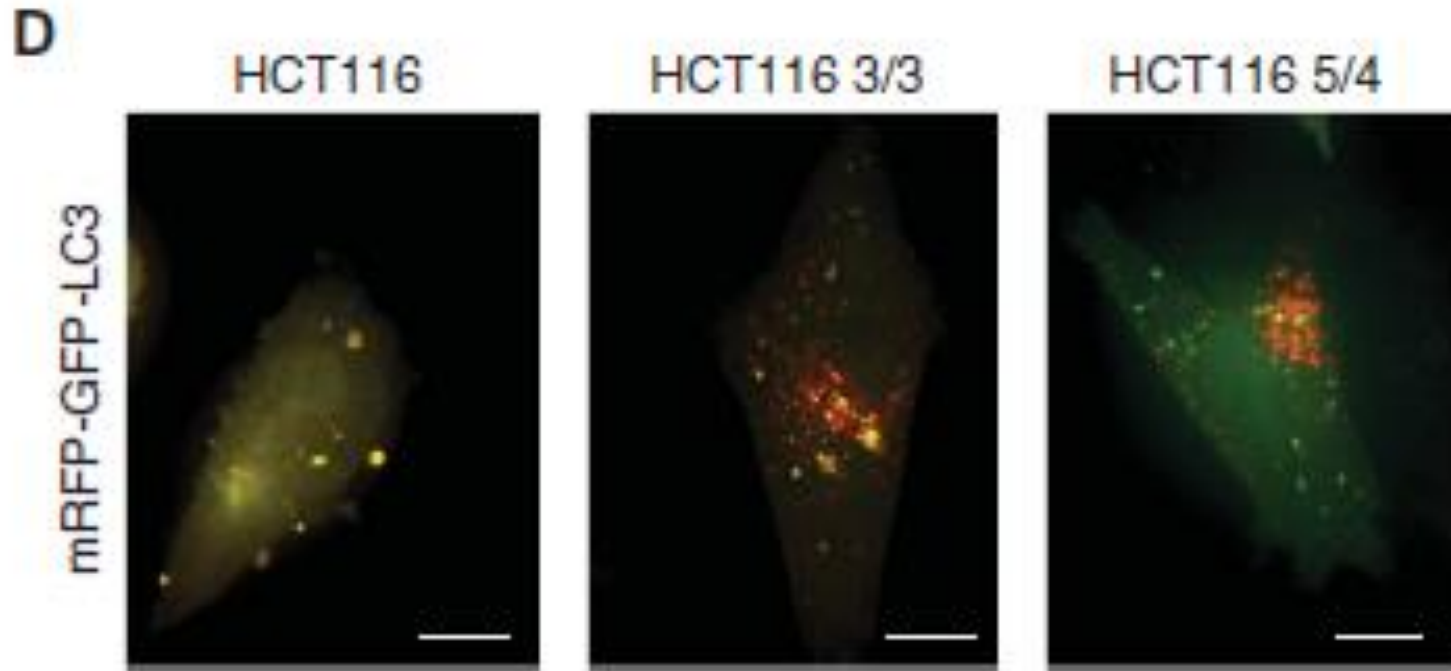
对异倍性细胞中自噬标记的LC3（与磷脂酰乙醇胺共轭进入自噬小体的膜上），对溶菌产物进行免疫印迹分析，从而得出下图：



可以从左图之中得知，异倍体的细胞中，其p62是显著增加的，而在其中第一个大型的HCT116细胞中，因为以衣霉素培养，导致其自噬作用中的未折叠的蛋白激活，使得发生了自噬作用。

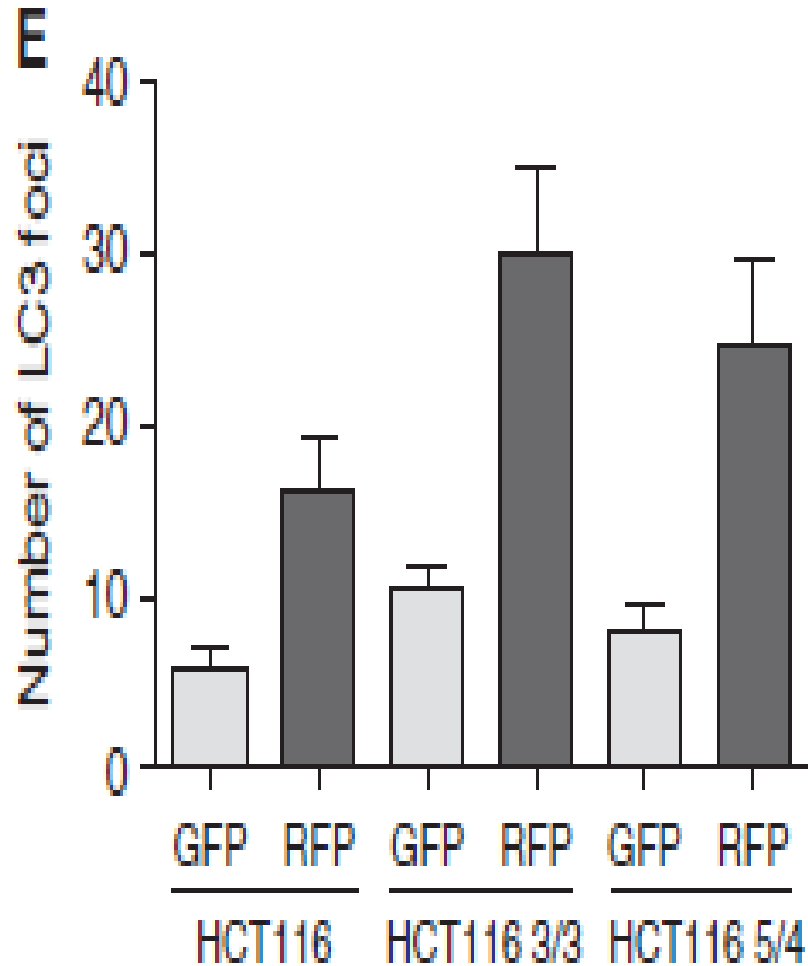


细胞自噬效应的改变



双重标记在异倍性细胞中显示自噬反应，绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白双重标记，也就是上图中黄色部分代表了吞噬体，在其中绿色荧光蛋白则是LC3，而红色的荧光蛋白对溶酶体中的酸性低PH不敏感，两者共同标记。

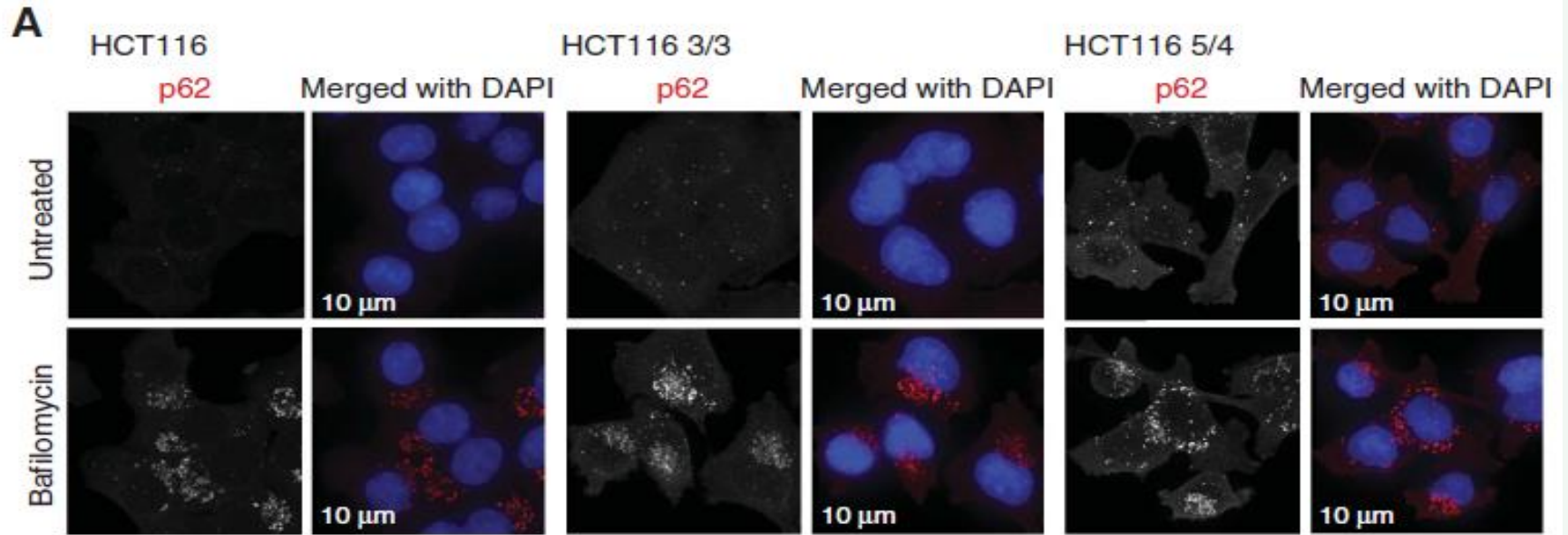
细胞自噬效应的改变



在异倍体的细胞中，相对于二倍体的细胞，无论是三倍体还是四倍体中自噬作用的标记LC3通过绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白标示都是增加的。

左图之中，HCT116细胞系衍生出的异倍体细胞可以明显看出其中的的荧光蛋白含量增加。这无疑证明了在异倍性的细胞中，细胞自噬作用更为活跃。

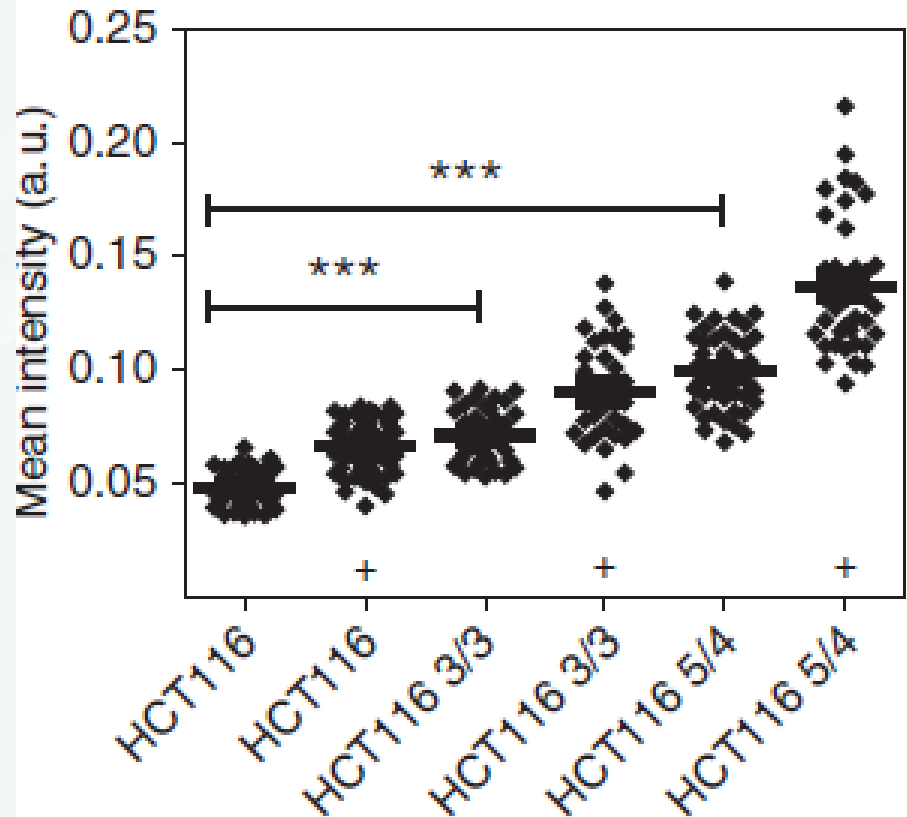
细胞自噬效应的改变



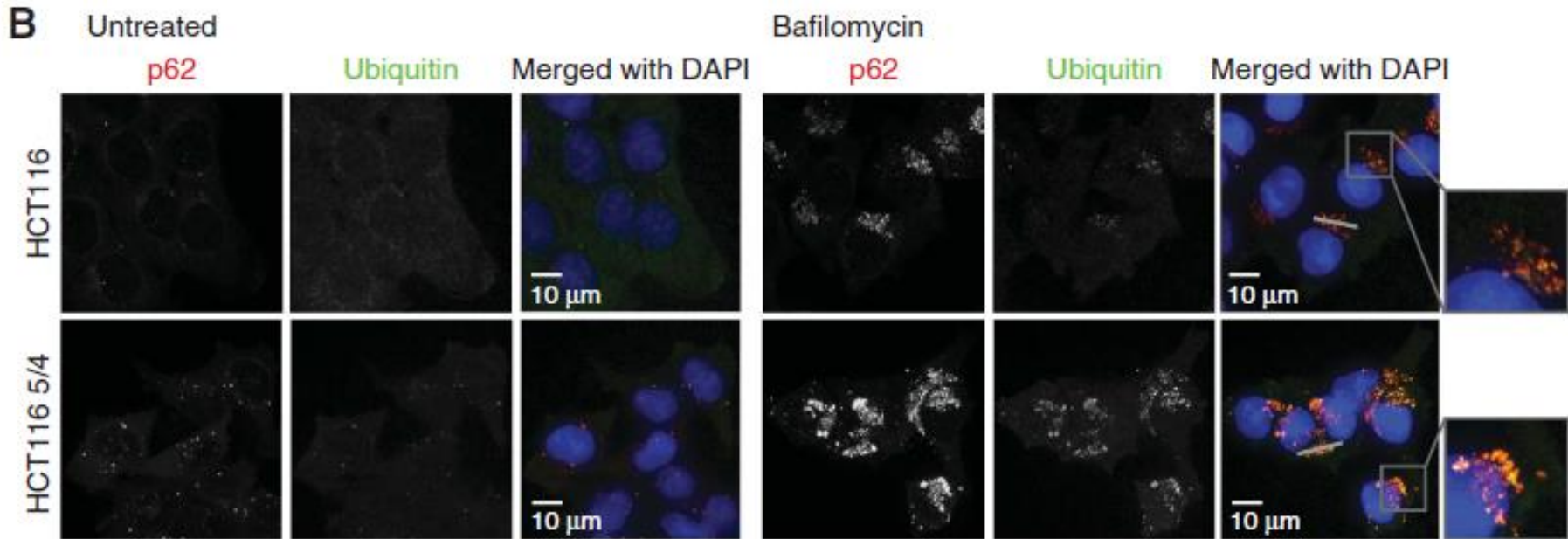
巴佛罗霉素A可以通过抑制其中的吞噬小体与溶酶体结合以及溶酶体中的酸性，从而促进其中P62和泛素的积累，辅助对异倍体细胞中自噬作用的研究。

细胞自噬效应的改变

在右图之中，纵坐标是荧光度的强度，而横坐标上+指的是加了想要的巴佛罗霉素A的细胞。可以从图中轻易看出异倍体细胞中加了把佛罗霉素后期P62的含量增加，荧光性积累。异倍体中P62含量多，其中自噬代谢极为旺盛。

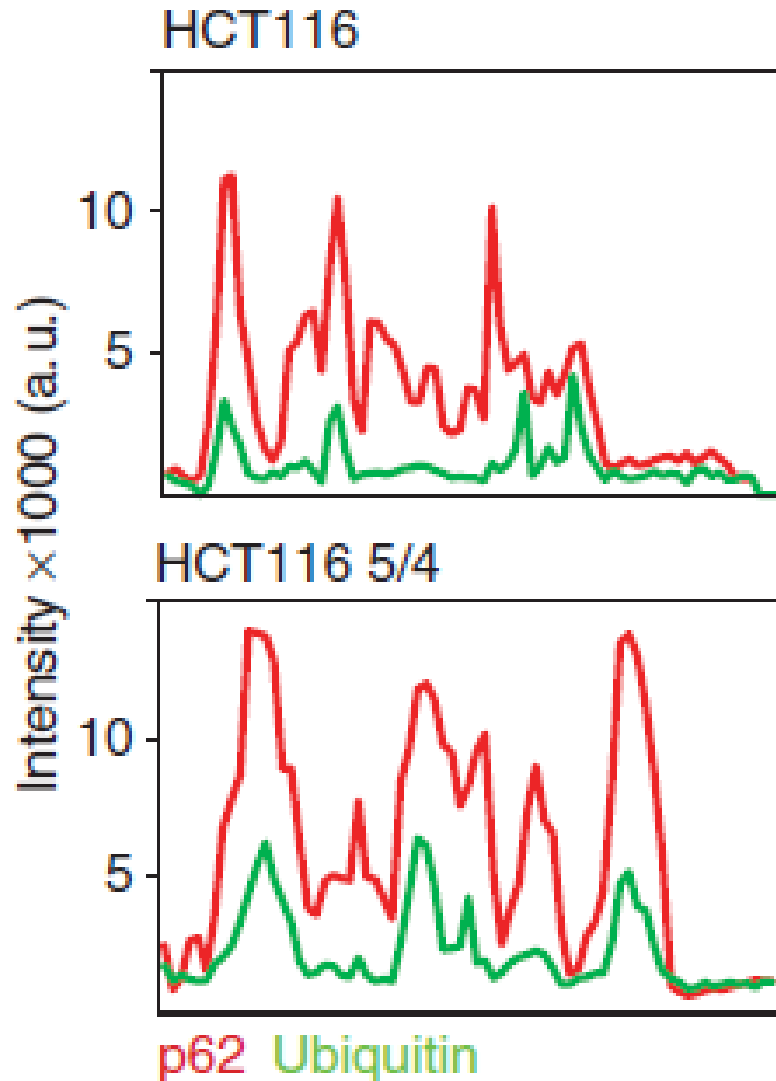


细胞自噬效应的改变



在细胞之中用荧光蛋白标记泛素，可以看出其中在 HCT116 5/4 这异倍体细胞中，标记而出的泛素和 p62 比二倍体的 HCT116 更多，而当其经过洛霉素 A 处理过后，其中的 p62 和泛素开始大量的富集，可以明显看出其中的自噬作用在异倍体中非常活跃。

细胞自噬效应的改变



左图中，红线代表了p62，绿线代表了泛素，图是两者的电信号波动图，在二者中可以明显看到，下面的HCT116 5/4异倍体细胞系中二者波动更为剧烈。更为活跃。

因此，我们可以知道，在异倍体细胞中，因为大量的蛋白质的表达，导致泛素积累，从而引起p62的积累，激活了自噬作用，用以维持细胞中蛋白质的内部稳定。

结论

在人类细胞异倍性的组学研究中，主要是从基因组、转录组与蛋白质组三个方向研究。

1.从基因组上，异倍性的改变主要表现在细胞的生长延迟以及细胞周期的改变，细胞分裂在**G1**和**S**期延迟；

2.而在转录上和蛋白组上，**mRNA**含量是随着染色体拷贝数增加而增加，相应的为正相关。

3.而蛋白组上，则是有**25%**左右额外染色体上编码的蛋白质含量在要少于预期值，主要是蛋白激酶和蛋白亚基复合物，而在细胞通路之中，与**RNA**与**DNA**相关的代谢呈现下降趋势，而相反的，在碳水化合物和氧化代谢过程，膜的新陈代谢，泡运输和溶酶体相关的途径则是相对的不断上升。



谢谢大家！

