

## СОСТОЯНИЕ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В ГИБРИДАХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЫШИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

© Е. И. Шрамова (Филясова),<sup>1</sup> Ю. М. Ходарович, О. А. Ларионов, О. В. Зацепина

Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шелякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

<sup>1</sup> электронный адрес: fei@mail.ibch.ru

В настоящей работе мы изучили состояние ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР) в гибридных клетках, полученных путем слияния клеток эмбриональной карциномы мышьяковой линии PCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши при культивировании гибридов в разных условиях. Полученные результаты показали, что продолжительное выращивание гибридных клеток в селективной среде, содержащей ГАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), способствовало сохранению ядрышкообразующих хромосом (ЯО-хромосом), тогда как в неселективной среде наблюдалась предпочтительная элиминация ЯО-хромосом. При этом в неселективных условиях наблюдалось большее число активных, т. е. Ag-позитивных, ЯОР, чем в селективных условиях. Эти наблюдения прямо показывают, что репрограммирование геномов родительских клеток у гибридов включает в себя изменения в состоянии ЯОР хромосом. Число активных ЯОР зависит от условий культивирования гибридных клеток и может изменяться двумя основными способами — путем элиминации ЯО-хромосом (в неселективных условиях) или путем инактивации некоторых ЯОР при сохранении ЯО-хромосом (в селективных условиях).

Ключевые слова: гибридные клетки, репрограммирование, ядрышковые организаторы, аргентофильная окраска ядрышковых организаторов, гибридизация *in situ*.

В современной литературе под репрограммированием понимают направленное изменение свойств (состояния) отдельных генов, ядра или целой клетки под действием различных факторов. Репрограммирование может достигаться в результате переноса ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (метод трансплантации ядер) (Gurdon, 2006) или под действием факторов плюрипотентных клеток, гибридируемых с соматическими клетками (Serov et al., 2001). Гибриды последнего типа часто получают путем слияния родительских клеток с помощью химических агентов, а затем выводят в культуру путем выращивания в селективных условиях. Выбор селективных условий направлен на удаление родительских клеток, не подвергшихся слиянию, в течение первых 3—5 сут после получения гибридов. В качестве селективных условий удобно использовать среду с ГАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), если один из родителей несет мутацию по гену *hprt*, а другой не способен к самоподдержанию в культуре. Для получения гибридных клеток в качестве плюрипотентных партнеров по слиянию используют эмбриональные стволовые (ЭС) или эмбриональные карциномальные (ЭК) клетки. Эти клетки способны долгое время находиться в культуре в недифференцированном состоянии, образуют эмбриоидные тельца при индукции дифференцировки *in vitro*, включаются в состав химерных эмбрионов при инъекциях в бластоцисту и образуют тератомы у иммунодефицитных мышей *in vivo* (Robertson, 1987). Однако ЭК-клетки в отличие от ЭС-клеток не требуют специальных условий культивирования и могут стать легко доступным источником репрограммирующих факторов в экспериментах по слиянию клеток.

Основная цель настоящей работы заключалась в анализе состояния ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом у гибридов, полученных путем слияния клеток мышьяковой ЭК линии PCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши, в зависимости от условий культивирования гибридных клеток. ЯОР — это локусы хромосом, где располагаются рибосомные гены (рДНК), т. е. гены, кодирующие 18S, 5.8S и 28S рибосомные РНК (рРНК). В интерфазных клетках рДНК входят в состав ядрышек, а в митозе распределяются по нескольким хромосомам набора, получившим название ядрышкообразующих (ЯО) хромосом. В клетках мыши, содержащих множественные ЯО-хромосомы, как правило, транскрибируются, т. е. являются активными, не все ЯОР (Howell, Black, 1980; Long, Dawid, 1980). Активные ЯОР отличаются от неактивных (латентных) прочной связью с компонентами транскрипционного комплекса РНК полимеразы I, которые обладают аргентофильными свойствами и могут быть выявлены с помощью окраски азотнокислым серебром (Howell, Black, 1980). Известно, что число Ag-ЯОР являются надежным признаком активности синтеза рРНК и общего уровня метаболизма в клетке (Nadjilov, 1985). Принимая во внимание, что рибосомные гены относятся к одним из наиболее транскрибируемых генов в клетках эукариот, а уровень их активности зависит от многих факторов, можно ожидать, что при репрограммировании геномов состояние ЯОР будет изменяться не случайным образом. С целью проверки этого предположения мы применили метод гибридизации *in situ* для определения общего числа ЯО-хромосом, а с помощью Ag-окраски ЯОР — среднего числа Ag-ЯОР

в гибридных клетках РСС4аза1 × лимфоцит при их культивировании в селективных или неселективных условиях.

### Материал и методика

В работе были использованы следующие реактивы: среды для культивирования клеток ДМЕМ (ПанЭко, Россия),  $\alpha$ -МЕМ (Sigma, США), фетальная бычья сыворотка (HyClone, США), ГАТ ( $10^{-4}$  М гипоксантин,  $7 \cdot 10^{-7}$  М аминоптерин и  $10^{-5}$  М тимидин; Flow Laboratory, Италия); конканавалин А (ПанЭко, Россия), 5-азациитидин (Sigma, США), полиэтиленгликоль (MW 1450; Sigma, США), диметилсульфоксид (ДМСО; ПанЭко, Россия); нокодазол и  $\text{AgNO}_3$  (Sigma, США), желатина (Россия), муравьиная кислота (Merk, Германия), Хёхст 33342 (Sigma, США), мовиол (Calbiochem, США); дигоксигенин (Dig-11-dUTP) и РНКза А (Roche, Франция), пепсин, деионизованный формамид, декстрансульфат и формамид (Sigma, США), Твин-20 (Хеликон, Россия), антитела к дигоксигенину, конъюгированные родамином (Roche, Франция).

Клетки. Родительские клетки эмбриональной тератокарциномы мыши линии РСС4аза1 (*hprt*, нормальный кариотип мыши  $2n = 40$ ) были приобретены в Институте цитологии РАН, Санкт-Петербург (Всероссийская коллекция клеточных культур). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 8 % фетальной бычьей сыворотки и антибиотики в стандартной концентрации. Клетки культивировали при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$  и высокой влажности. Для предотвращения спонтанной дифференцировки клетки пересеивали не реже чем каждые 48 ч.

Клетки селезенки мыши F1 СВА × С57ВL/6J (самцы в возрасте 1.5 года) выделяли согласно стандартной методике (de StGroth, Scheidegger, 1980). Сразу после выделения клетки рассаживали в концентрации около  $10^6$  клеток на 1 мл среды  $\alpha$ -МЕМ, содержащей 15 % фетальной бычьей сыворотки. В среду добавляли конканавалин А в конечной концентрации 3 мкг/мл и 5-азациитидин в концентрации 5 мкМ и культивировали клетки в течение 5 сут.

Получение гибридов. Активированные клетки селезенки смешивали с клетками РСС4аза1 в соотношении 5 : 1 и индуцировали слияние с помощью 45%-ного полиэтиленгликоля в присутствии 10%-ного диметилсульфоксида и среды ДМЕМ в течение 1 мин. Сразу после слияния клетки помещали на 24 ч в культуральную среду, содержащую ГАТ, а затем переносили в среду без ГАТ. Инкубация контрольных клеток РСС4аза1, не под-

вергавшихся слиянию, в селективной среде с ГАТ в течение 24 ч приводила к тотальной гибели всех клеток.

Получение метафазных пластинок хромосом. Для получения метафазных пластинок из гибридных и родительских клеток в культуральную среду добавляли 50 нг/мл нокодазола на 1—2 ч. Адгезивные клетки собирали в смеси 0.25%-ного трипсина и 0.025%-ного версена (3 : 1), инкубировали в 0.56%-ном КС1 10 мин при  $37^\circ\text{C}$  и фиксировали в трех сменах абсолютного метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) при  $20^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Лимфоциты селезенки собирали центрифугированием, а затем инкубировали в 0.56%-ном КС1 и фиксировали так же, как адгезивные клетки. Клетки раскапывали на влажные холодные предметные стекла, контролируя качество метафазных пластинок под микроскопом ICM 405 (Opton, Германия). Перед использованием препараты хранили при комнатной температуре не более 1 мес. Препараты изучали с помощью микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия), используя фазово-контрастный объектив План-Апохромат 100× (числовая апертура 1.3).

Выявление активных ЯОР производили по методике Хоуэлла и Блэка (Howell, Black, 1980) с небольшими модификациями. 50%-ный раствор  $\text{AgNO}_3$  готовили на бидистиллированной воде непосредственно перед употреблением; 2%-ный раствор желатины также готовили на бидистиллированной воде, добавляя 1 % муравьиной кислоты, и хранили при  $4^\circ\text{C}$ . На препарат наносили две части  $\text{AgNO}_3$  и одну часть желатины, накрывали покровным стеклом и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 мин или до появления Ag-окраски ЯОР. Стекла тщательно промывали бидистиллированной водой, докрашивали красителем Хёхст 33342 (1 мкг/мл) и заключали в среду мовиол. Все препараты изучали с помощью микроскопа Axiovert 200, как описано выше. Изображения записывали с помощью 13-битной монохромной камеры CCD CoolSnap<sub>cf</sub> (Roper Scientific, США) и обрабатывали, используя программу Adobe Photoshop, версия 7.0.

Пробы, использованные для гибридизации *in situ*. В работе использовали две пробы к рДНК мыши (оригинальные плазмиды, содержащие участки последовательности повтора рДНК мыши, были любезно предоставлены И. Грумт, Центр раковых исследований, Гейдельберг, Германия) (рис. 1). Проба 1 (фрагмент *EcoRI*—*EcoRI* рДНК размером 6.6 т.п.о., от +5.635 до +12.235) кодировала часть последовательности 18S рРНК, первый внутренний транскрибируемый спейсер (ВнТС1), 5.8S рРНК, второй внутренний транскрибируемый спейсер (ВнТС2) и около 80 % последовательности 28S рРНК. Проба 2 (фрагмент *EcoRI*—*EcoRI* рДНК размером 4.3 т.п.о., от +12.235 до +16.535) кодировала оставшуюся

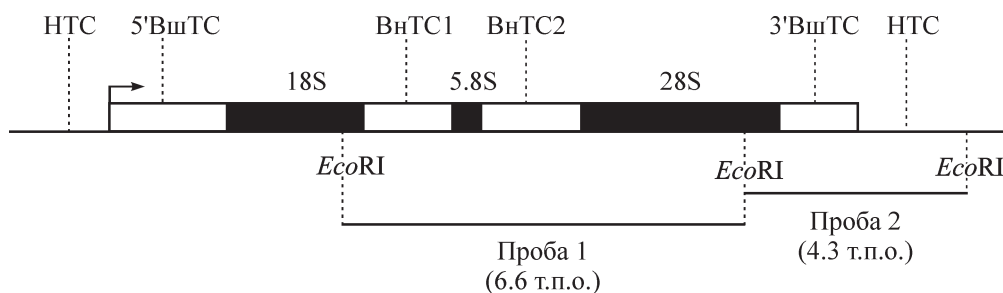


Рис. 1. Схема карты рибосомного повтора мыши и проб рДНК, использованных для гибридизации *in situ*.

НТС — межгенный нетранскрибируемый спейсер, 5'ВнТС — 5'-внешний транскрибируемый спейсер, ВнТС1 и ВнТС2 — первый и второй внутренние транскрибируемые спейсеры соответственно, 3'ВнТС — 3'-внешний транскрибируемый спейсер, *EcoRI* — сайты рестрикции *EcoRI*.

**Среднее количество хромосом, Fish-ЯОР хромосом и Ag-ЯОР в родительских клетках PCC4aza1, лимфоцитах селезенки мыши и гибридных клетках PCC4aza1×лимфоцит на разных пассажах в зависимости от условий культивирования**

Клетки	Стадия	Количество хромосом	Число ЯОР, выявляемое методом FISH	Число активных ЯОР (Ag-ЯОР)
PCC4aza1	Перед слиянием	40	8 (7.9 ± 0.1)	7.0 ± 0.4
Лимфоциты селезенки мыши	5-е сутки активации	40	7 (7.0 ± 0.1)	6.2 ± 0.5
Гибриды (среда без ГАТ)	6-й пассаж	78 (77.2 ± 2.4)	14 (13.9 ± 0.7)	10 (10.3 ± 0.9)
	17-й пассаж	76 (76.0 ± 0.8)	Нет данных	Нет данных
	25—27-й пассажи	74 (74.4 ± 2.2)	12 (12.0 ± 0.8)	10 (10.4 ± 0.8) <sup>a</sup>
Гибриды (среда с ГАТ)	26—30-й пассажи	76 (76.1 ± 1.7)	14 (13.9 ± 0.8)	9 (8.8 ± 1.1) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Значения, которые достоверно различаются.

ся часть 28S рРНК и 3'-внешний транскрибируемый спейсер (3'ΨтС). Фрагменты рДНК были переклонированы по соответствующим сайтам в вектор pBluescript II KS (Stratagene, США) и мечены дигоксигенином методом ник-трансляции с помощью набора Dig-Nick-Translation Mix (Roche, Франция), следуя инструкции фирм-производителей.

Гибридизацию *in situ* проводили, как подробно описано ранее (Коробова и др., 2004). Хромосомные препараты обрабатывали 100 мкг/мл РНКазы А на 2-кратном SSC-буфере (0.3 М NaCl и 0.03 М цитрата натрия, pH 7.3) в течение 1 ч при 37 °С, а затем 0.01%-ным пепсином на 0.05 М цитрате натрия, pH 2.0, в течение 2—4 мин при комнатной температуре. Препараты отмывали от пепсина в фосфатно-солевом буфере (ФСБ; 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 6.7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1.5 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3), высушивали на воздухе и инкубировали с гибридизационной смесью, содержащей 10—25 нг/мкл меченой рДНК, 50 % деионизованного формамида и 10 % декстрансульфата, в 2-кратном буфере SSC. Денатурацию проб и препаратов проводили одновременно в течение 10 мин при 85 °С. Гибридизацию осуществляли во влажной камере при 37 °С в течение 16—18 ч. Препараты промывали в 50%-ном формамиде на 4-кратном буфере SSC/Твин-20 3 раза по 10 мин при 42 °С, затем в буфере 2 × SSC 10 мин при комнатной температуре, инкубировали с антителами к дигоксигенину, конъюгированными роданином, окрашивали Хёхстом 33342 (1 мкг/мл) 10 мин при комнатной температуре и заключали в мовиол. Препараты изучали, как описано выше.

### Результаты

Свойства гибридных клеток PCC4aza1×лимфоцит. Клон гибридных клеток PCC4aza1×лимфоцит был получен в результате слияния клеток мышечной тератокарциномы линии PCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши F1 CBA×C57BL/6J (самцы), активированных к пролиферации с помощью конканавалина А в присутствии деметилирующего агента 5-азациитидина. Гибридная природа полученных клеток была подтверждена результатами микросателлитного анализа на маркерные последовательности линий мышей, из которых были получены исходные родительские клетки. О репрограммировании соматического ядра лимфоцита в составе гибридной клетки говорило исчезновение экспрессии

маркерных генов Т-лимфоцитов *CD11* и *CD45*. В то же время, подобно родительским плюрипотентным клеткам PCC4aza1, гибридные клетки сохраняли способность экспрессировать ген *Oct4*, образовывать эмбрионные тельца в суспензии *in vitro* и дифференцироваться под действием ДМСО в кардиомиоциты.

После слияния и первоначальной селекции в течение 24 ч на среде, содержащей ГАТ, гибридные клетки в течение 16 пассажей (т. е. около 3 нед) выращивали в неселективных условиях (среда ДМЕМ без ГАТ). Затем часть клеток перевели в селективные условия культивирования (среда ДМЕМ с добавлением ГАТ), а оставшиеся продолжали выращивать в среде без ГАТ. Такая схема эксперимента была предпринята с целью анализа влияния условий культивирования на стабильность общего числа хромосом и активность ЯОР.

Определение общего числа хромосом в метафазных пластинках гибридов при культивировании в неселективных условиях показало, что гибридные клетки содержали около 78 (77.2 ± 2.4) хромосом на раннем (6-м) пассаже и около 74 (74.4 ± 2.2) хромосом на поздних (25—27-й) пассажах культивирования. Поскольку и клетки PCC4aza1, и лимфоциты селезенки содержали по 40 хромосом, мы сделали вывод о том, что за 25—27 пассажей культивирования в неселективных условиях гибридные клетки теряли в среднем, 4 хромосомы (см. таблицу).

Сходные результаты были получены при определении среднего числа хромосом в гибридных клетках, культивируемых с 17-го по 26—30-й пассажи в селективных условиях. На 17-м пассаже клетки содержали в среднем 76.0 ± 0.8, а на 26—30-м — 76.1 ± 1.7 хромосом. Эти значения близки к среднему числу хромосом в поздних гибридах, выращиваемых в неселективных условиях (74.4 ± 2.2). Таким образом, гибриды PCC4aza1×лимфоцит сохраняли относительно стабильное количество хромосом (около 76) независимо от условий их культивирования. Данные по среднему количеству хромосом в родительских и гибридных клетках на разных пассажах и в разных условиях культивирования суммированы в таблице.

Определение общего числа ЯОР методом гибридизации *in situ*. Известно, что у лабораторных мышей *Mus musculus* ЯОР располагаются рядом с центромерными районами на нескольких хромосомах кариотипа, число которых зависит от линейной принадлежности животных (Long, Dawid, 1980; Savino et al., 2001). Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) ЯОР

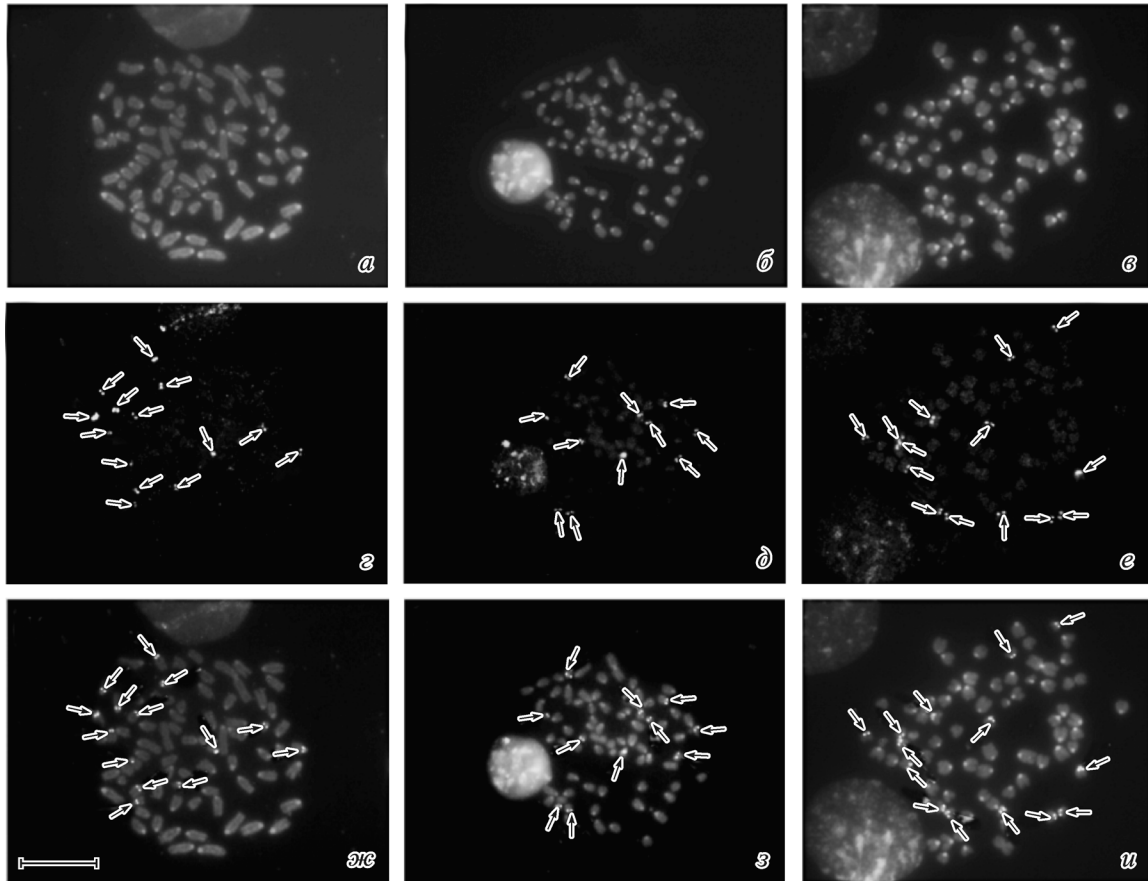


Рис. 2. Локализация рДНК в хромосомах гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит.

*a, г, ж* — 6-й и *б, д, з* — 27-й пассаж при культивировании в неселективных условиях; *в, е, и* — 30-й пассаж культивирования в селективных условиях. *a—в* — окраска Хёхстом 33342; *г—е* — флуоресцентная гибридизация *in situ* со смесью проб к рДНК мыши (FISH-ЯОР); *ж—и* — совмещение изображений; гибридизационные сигналы, указывающие на положение и число ЯОР в пластинках, показаны стрелками. Масштабный отрезок — 10 мкм.

проявляются в виде одиночных или двойных точек разного размера (Коробова и др., 2004; Кунафина и др., 2005).

Анализ общего числа FISH-ЯОР был сначала проведен на метафазных пластинках, полученных из родительских клеток — клеток PCC4aza1 и активированных лимфоцитов. При исследовании общего числа ЯОР в клетках PCC4aza1 было обнаружено, что они содержат 8 ЯОР на клетку. В метафазных пластинках лимфоцитов селезенки, активированных к пролиферации, выявлялось 7 FISH-ЯОР. Таким образом, ожидаемое общее число ЯОР в гибридных клетках равно 15.

На рис. 2 представлены типичные метафазные пластинки гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит, полученные на раннем (6-м) (рис. 2, *a, г, ж*) и позднем (27-м) (рис. 2, *б, д, з*) пассажах при культивировании в неселективных условиях. В метафазных пластинках из раннего пассажа в среднем на клетку выявлялось около 14 ЯО-хромосом ( $13.9 \pm 0.7$ ). При этом в пластинках, содержащих ровно 80 хромосом, выявлялось 15 ЯОР. В метафазных пластинках гибридных клеток из поздних пассажей (25—27-го) в среднем выявлялось около 12 ЯОР ( $12.0 \pm 0.8$ ); только 9% метафазных пластинок содержали 14 ЯОР, не встретилось ни одной клетки, сохранившей все 15 ЯО-хромосом. Как уже упоминалось, при культивировании в неселективных условиях гибридные клетки теряли около 4 хромосом. При этом из 4 «утраченных» хромосом 3 хромосомы содержали ЯОР (см. таблицу).

Метафазные пластинки гибридов PCC4aza1 × лимфоцит, культивируемых в селективных условиях, на 26—30-м пассажах содержали  $13.9 \pm 0.8$  FISH-ЯОР (рис. 2, *в, е, и*; см. таблицу). При этом независимо от общего числа хромосом около 36% исследуемых клеток сохраняли 15 ЯО-хромосом. Эти наблюдения говорят о том, что культивирование гибридов PCC4aza1 × лимфоцит в селективных условиях препятствует «потере» (или способствует сохранению) ЯО-хромосом. Результаты изменений числа FISH-ЯОР хромосом в гибридах на разных пассажах и при разных условиях культивирования также представлены в таблице.

Определение количества активных ЯОР методом Ag-окраски. В метафазных пластинках родительских клеток PCC4aza1 присутствовало в среднем  $7.0 \pm 0.4$  Ag-ЯОР, а в метафазных пластинках лимфоцитов —  $6.2 \pm 0.5$ . Таким образом, ожидаемое число активных ЯОР в гибридных клетках PCC4aza1 × лимфоцит составляло 13. Однако в метафазных пластинках гибридов раннего (6-го) пассажа обнаруживалось всего около 10 активных ЯОР ( $10.3 \pm 0.9$ ). При дальнейшем культивировании гибридов в неселективных условиях число Ag-ЯОР практически не изменялось, так что на позднем (25-м) пассаже выявлялось в среднем  $10.4 \pm 0.8$  Ag-ЯОР. Таким образом, потеря 3 ЯО-хромосом, наблюдаемая при культивировании гибридов PCC4aza1 × лимфоцит в неселективных условиях, не сопровождалась заметным измене-

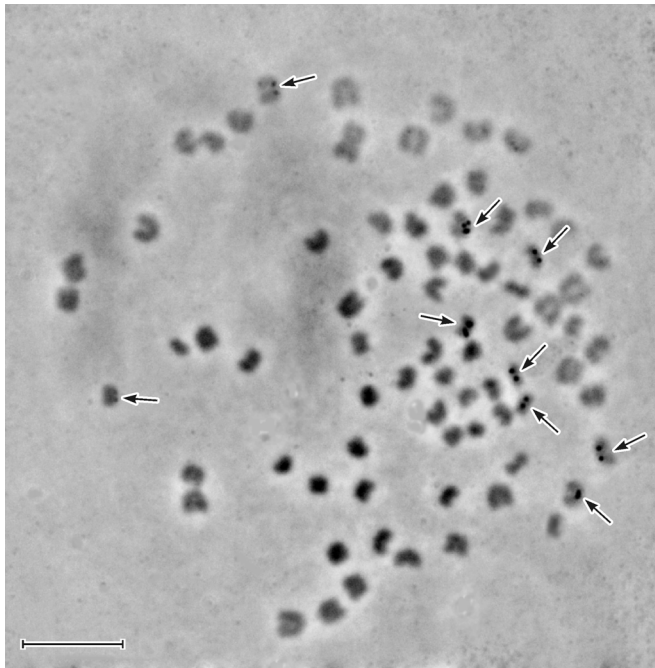


Рис. 3. Окрашивание азотнокислым серебром метафазных хромосом гибридных клеток РСС4аза1 × лимфоцит из 30-го пассажа, культивируемых в селективных условиях.

Стрелками указаны Ag-позитивные (активные) ЯОР. Масштабный отрезок — 10 мкм.

нием числа активных Ag-ЯОР, сохраняющихся в клетках (см. таблицу).

Иные результаты были получены при исследовании числа Ag-ЯОР в гибридных клетках, культивируемых в селективных условиях: на поздних (26—30-м) пассажах в гибридах выявлялось  $8.8 \pm 1.1$  Ag-ЯОР (рис. 3). При этом обработка полученных данных с помощью критерия Стьюдента показала, что средние значения Ag-ЯОР в гибридных клетках поздних пассажей, выращиваемых в неселективных и селективных условиях, различаются статистически достоверно ( $P < 0.05$ ), составляя  $10.4 \pm 0.8$  и  $8.8 \pm 1.1$  Ag-ЯОР соответственно. Характерно, что в популяции клеток, культивируемых в селективных условиях, около трети клеток (33 %) содержали 8 активных ЯОР, а распределение оставшихся клеток по числу активных ЯОР было довольно равномерным: 18 % клеток содержали 7 Ag-ЯОР, 13 % клеток имели 9, 20 % — 10 и 16 % — 11 активных ЯОР. Стоит отметить, что максимальное наблюдаемое число Ag-ЯОР у клеток, культивируемых на среде ГАТ, равнялось 11. Таким образом, при выращивании гибридных клеток в селективных условиях сохранение ЯО-хромосом сопровождалось инактивацией ЯОР. Результаты определения числа Ag-ЯОР в гибридах РСС4аза1 × лимфоцит при культивировании в разных условиях суммированы в таблице.

### Обсуждение

Для получения гибридных клеток РСС4аза1 × лимфоцит мы использовали лимфоциты селезенки мыши, активированные к пролиферации конканавалином А в присутствии деметилирующего агента 5-азациитидина. По нашим сведениям, гибриды плюрипотентных клеток с активированными к пролиферации лимфоцитами получе-

ны в настоящей работе впервые. Известно, что 5-азациитидин способствует деметилированию ДНК и уменьшает активность ДНК метилтрансфераз (Cheng, 1995). 5-азациитидин также используют для изучения роли метилирования ДНК в механизмах клеточной дифференцировки и активации генов (Taylor, Jones, 1979; Fukuda, 2001). Обработка клеток 5-азациитидином повышает вероятность получения жизнеспособных гибридов и способствует репрограммированию ядер соматических клеток как при их гибридизации с ЭС-клетками (Do, Sholer, 2004), так и при переносе ядер в энуклеированные ооциты (Jones et al., 2001; Enright et al., 2003). Известно, что метилирование влияет также на регуляцию экспрессии рибосомных генов и синтез рибосомной РНК, а добавление к клеткам 5-азациитидина увеличивает число активных, т. е. Ag-позитивных, ЯОР (Ferraro, Lavia, 1983). Например, инкубация клеток селезенки взрослой мыши с 5-азациитидином приводит к реактивации Ag-ЯОР, инактивирующихся с возрастом животного (Swisshelm et al., 1990).

Результаты, полученные в работе, позволяют сделать вывод о том, что как в родительских клетках, так и у гибридов присутствуют латентные ЯОР. Так, на 8 ЯО-хромосом в клетках РСС4аза1 присутствует в среднем  $7.0 \pm 0.4$  Ag-ЯОР, в метафазных пластинках лимфоцитов —  $6.2 \pm 0.5$  Ag-ЯОР на 7 ЯО-хромосом. В гибридах, культивируемых в селективных условиях, на 26—30-м пассажах содержится  $13.9 \pm 0.8$  FISH-ЯОР и только  $8.8 \pm 1.1$  Ag-ЯОР. Эти наблюдения находятся в полном соответствии с литературными данными о том, что в клетках с множественными ЯО-хромосомами, как правило, присутствуют неактивные, или латентные, ЯОР. Результаты проделанной работы показывают также, что в ходе культивирования полученных гибридов РСС4аза1 × лимфоцит активность рибосомных генов изменяется. Изменение активности генов объясняется как элиминацией ЯО-хромосом, так и инактивацией ЯОР, сохраняющихся в ЯО-хромосомах. Преимущественная элиминация ЯО-хромосом наблюдалась при культивировании гибридных клеток в неселективных условиях, а инактивация — при выращивании в селективной среде. Можно высказать предположение о том, что удаление хромосом, несущих ЯОР, является наиболее радикальным механизмом, регулирующим общую активность рибосомных генов и синтеза рибосом в гибридных клетках.

Явление преимущественной элиминации ЯО-хромосом в гибридных клетках ранее было описано только для растений. В частности, этот феномен описан для внутри- и межвидовых соматических гибридов картофеля (Pijnacker et al., 1987, 1989). Было показано, что в гибридах *Solanum tuberosum* и *S. phureja* с набором хромосом, близким к тетраплоидному, наблюдается преимущественная элиминация одной или обеих ЯО-хромосом вида *S. phureja*. При этом элиминация ЯО-хромосом происходит под генетическим контролем и связана с ассоциациями и перестройками в ЯО-хромосомах (Pijnacker et al., 1987). Авторы высказали предположение о том, что возможной причиной элиминации ЯО-хромосом вида *S. phureja* являлся высокий уровень активности их ЯОР, что приводило к хромосомным ассоциациям и перестройкам с участием ЯОР. Таким образом, высокая активность ЯОР может приводить к преимущественной элиминации ЯО-хромосом. По-видимому, это утверждение справедливо и в нашем случае: преимущественная элиминация ЯО-хромосом наблюдалась в неселективных условиях, где активность ЯОР была выше по сравнению с активностью ЯОР,

наблюдаемой при выращивании клеток в селективной среде (см. таблицу). Как описывалось выше, в селективной среде уменьшается число Ag-ЯОР, но общее число ЯО-хромосом практически не изменяется.

Известно, что *in vivo* в гибридах между близкими видами растений и животных рибосомные гены одного из видов часто «доминируют» над генами другого вида, что проявляется в экспрессии генов только «доминирующего» вида (Onishi et al., 1984). Это явление, в частности, было описано в клетках гибридов между двумя видами лягушек рода *Xenopus*, причем эффект доминирования не зависел от материнского или отцовского происхождения «доминирующего» вида лягушек (Honjo, Reeder, 1973). Подобное доминирование также наблюдалось и при гибридизации соматических клеток удаленных видов *in vitro* (Onishi et al., 1984). Так, в зависимости от линий использованных клеток в гибридах клеток человека и мыши наблюдалось подавление активности либо ЯОР человека (Miller et al., 1976a), либо ЯОР мыши (Miller et al., 1976b). При исследовании межвидовых гибридов клеток мыши и сирийского хомячка не наблюдалось предпочтительной инактивации ЯОР какого-либо одного вида, так что гибридные клетки синтезировали оба вида рРНК — и мыши, и хомячка (Eliseiri, 1972). Этот факт согласуется с данными работы Сопрано и соавторов (Soprano et al., 1979), в которой показано, что под действием внешних факторов, в частности вируса SV40, в межвидовых гибридных клетках человек—мышь усиливается экспрессия генов рРНК доминантного вида и индуцируется экспрессия ранее подавленных генов рРНК другого вида.

Активность транскрипции рибосомных генов в межвидовых гибридах F1, получаемых *in vivo*, и в гибридных клетках, получаемых *in vitro*, по-видимому, регулируется разными механизмами (Miesfeld et al., 1984). В случае гибридизации клеток млекопитающих *in vitro* в основе изменения активности рибосомных генов «доминирующего» вида лежат отсутствие и (или) инактивация видоспецифических транскрипционных факторов РНК полимеразы I «рецессивного» родительского вида. В межвидовых гибридах *in vivo* присутствуют транскрипционные факторы обоих видов, а «доминирование» определяется преимущественной способностью рДНК «доминирующего» вида связывать транскрипционные факторы.

Известно, что количество аргентофильного материала, связанного с ЯОР хромосом в митозе, прямо коррелирует с уровнем транскрипции рибосомных генов в предшествующей интерфазе (Derenzini et al., 1995; Sirri et al., 2000). Логично полагать, что уменьшение числа активных ЯОР в гибридных клетках, культивируемых в селективных условиях, отражает уменьшение уровня транскрипции рДНК и синтеза рибосом, связанное с негативным влиянием селективной среды на скорость пролиферации клеток.

Стоит отметить, что в неселективных условиях гибридные клетки, содержащие большее число Ag-ЯОР (см. таблицу), обладали повышенным потенциалом к дифференцировке *in vitro* по сравнению с клетками, растущими в присутствии ГАТ. Можно высказать предположение о том, что снижение способности гибридов к дифференцировке в среде с ГАТ связано с частичным подавлением активности рДНК и синтеза рибосом и как следствие — с недостатком белковых факторов, ответственных за дифференцировку. Вероятно, этим же объясняются неспособность гибридных клеток, выращиваемых в селективной среде, к образованию эмбрионных тел, а также умень-

шение их пролиферативной активности и увеличение доли клеток в S-периоде клеточного цикла.

Таким образом, результаты настоящей работы показали, что культивирование гибридных клеток в неселективных условиях приводит к элиминации ЯО-хромосом, тогда как выращивание клеток в селективной среде способствует сохранению ЯО-хромосом. Сохранение ЯО-хромосом сопровождается инактивацией ЯОР, что, вероятно, является отражением общего уровня метаболизма гибридных клеток в селективных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Коробова Ф. В., Романова Л. Г., Нониашвили Е. М., Дыбан А. П., Зацепина О. В. 2004. Выявление ядрышкообразующих районов хромосом в одноклеточных зародышах и ооцитах мыши с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Онтогенез. 35 (5) : 336—35.
- Кунафина Э. Р., Чаплина М. В., Флясова Е. И., Гибанова Н. В., Ходарович Ю. М., Ларионова О. А., Зацепина О. В. 2005. Активация ядрышковых организаторов при культивировании мышечных эмбриональных стволовых клеток линии R1 *in vitro*. Онтогенез. 36 (2) : 102—109.
- Cheng X. 1995. DNA modification by methyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 : 4—10.
- Derenzini M., Sirri V., Pession A., Trere D., Roussel P., Ochs R. L., Hernandez-Verdun D. 1995. Quantitative changes of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23, related to stimulation of rDNA transcription. *Exp. Cell Res.* 219 : 276—282.
- Do J. T., Schöler H. R. 2004. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells.* 22 : 941—949.
- Eliseiri G. L. 1972. The ribosomal RNA of hamster—mouse hybrid cells. *J. Cell Biol.* 53 : 177—184.
- Enright B. P., Kubota C., Yang X., Tian X. C. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69 : 96—101.
- Ferraro M., Lavia P. 1983. Activation of human ribosomal genes by 5-azacytidine. *Exp. Cell Res.* 145 : 452—457.
- Fukuda K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif. Organs.* 25 : 187—193.
- Gurdon J. B. 2006. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 22 : 1—22.
- Hadjiolov A. A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. Vienna; New York: Springer-Verlag. 128 p.
- Honjo T., Reeder R. H. 1973. Preferential transcription of *Xenopus laevis* ribosomal RNA in interspecies hybrids between *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*. *J. Mol. Biol.* 80 : 217—228.
- Howell W. M., Black D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 36 : 1014—1015.
- Jones K. L., Hill J., Shin T. Y., Lui L., Westhusin M. 2001. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation. *Mol. Reprod. Devel.* 60 : 208—213.
- Long E. O., Dawid I. B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49 : 727—764.
- Miesfeld R., Sollner-Webb B., Croce C., Arnheim N. 1984. The absence of a human-specific ribosomal DNA transcription factor leads to nucleolar dominance in mouse greater than human hybrid cells. *Mol. Cell Biol.* 4 : 1306—1312.
- Miller D. A., Dev V. G., Tantravahi R., Miller O. J. 1976a. Suppression of human nucleolar organizer activity in mouse—human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.* 101 : 235—243.
- Miller O. J., Miller D. A., Dev V. G., Tantravahi R., Croce C. M. 1976b. Expression of human and suppression of mouse

nucleolus organizer activity in mouse—human somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73 : 4531—4535.

Onishi T., Berglund C., Reeder R. H. 1984. On the mechanism of nucleolar dominance in mouse—human somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 81 : 484—487.

Pijnacker L. P., Ferwerda M. A., Puite K. J., Roest S. 1987. Elimination of *Solanum phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum* + *S. phureja* somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 73 : 878—882.

Pijnacker L. P., Ferwerda M. A., Puite K. J., Schaart J. G. 1989. Chromosome elimination and mutation in tetraploid somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports.* 8 : 82—85.

Robertson E. J. 1987. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. Oxford, UK: IRL Press. 268 p.

Savino T. M., Gebrane-Younes J., De Mey J., Sibaritac J. B., Hernandez-Verdun D. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* 153 : 1097—1110.

Serov O., Matveeva N., Kuznetsov S., Kaftanovskaya E., Mitmann J. 2001. Embryonic hybrid cells: a powerful tool for study-

ing pluripotency and reprogramming of the differentiated cell chromosomes. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73 : 561—568.

Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. 2000. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 31 : 121—126.

Soprano K. J., Dev V. G., Croce C. M., Baserga R. 1979. Re-activation of silent rRNA genes by simian virus 40 in human—mouse hybrid cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 3885—3889.

StGroth S. F., de, Scheidegger D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.* 35 : 1—21.

Swisshelm K., Distech C. M., Thorvaldsen J., Nelson A., Salk D. 1990. Age-related increase in methylation of ribosomal genes and inactivation of chromosome-specific rRNA gene clusters in mouse. *Mutat. Res.* 237 : 131—146.

Taylor S. M., Jones P. A. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.* 17 : 771—779.

Поступила 10 VII 2007

#### THE STATUS OF NUCLEOLUS ORGANIZING REGIONS IN HYBRIDS OF PLURIPOTENT AND SOMATIC MOUSE CELLS CULTURED UNDER DIFFERENT CONDITIONS

E. I. Shramova (Filyasova),<sup>1</sup> Yu. M. Khodarovich, O. A. Larionov, O. V. Zatsepina

M. M. Shemyakin—Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;

<sup>1</sup> e-mail: fei@mail.ibch.ru

In the present work we examined the status of nucleolus organizing regions of mitotic chromosomes (NOR) in hybrid cells obtained by fusion of the mouse teratocarcinoma cells PCC4aza1 and adult mouse spleenocytes upon cultivation of hybrid cells under different conditions. We have shown that extended cultivation of hybrid cells in medium supplemented with HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) promotes the maintenance of NO-chromosomes, whereas under nonselective conditions elimination of NO-chromosome occurs. In nonselective medium the number of active, i. e. Ag-positive, NORs has been augmented comparatively to that observed under selective conditions. This observation directly indicates that reprogramming of the parental cell genomes in hybrid cells includes changes in the status of chromosomal NORs. The number of active NORs depends on conditions of hybrid cells culturing and may be changed by either of the two major ways — by elimination of NO-chromosomes (under nonselective conditions) or by inactivation of some NORs, when the general number of NO-chromosomes remains unaltered (under selective conditions).

Key words: hybrid cells, reprogramming, nucleolar organizers, argentophilic staining of nucleolar organizers, *in situ* hybridization.