

FISH-АНАЛИЗ РЕГИОНАЛЬНОЙ РЕПЛИКАЦИИ ГОМОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ В ГИБРИДАХ МЕЖДУ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ И СОМАТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ

© О. Л. Подрядчикова, И. Е. Пристяжнюк, Н. М. Матвеева, О. Л. Серов

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;
электронный адрес: serov@bionet.nsc.ru*

Работа посвящена анализу с помощью гибридизации *in situ* региональной репликации гомологов хромосом 1, 3 и 6 в гибридных клетках, полученных слиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с соматическими клетками. Показано, что в гибридных клетках с около-диплоидным набором хромосом родительские гомологи реплицируются синхронно в 70—75 % анализируемых клеток, подобно тому как это происходит в диплоидных ЭСК и фибробластах. В гибридных клетках с околотриплоидным набором хромосом уровень выявляемой асинхронной репликации гомологов повышался до 46—57 %. Однако это верно для клеток с тремя копиями тестируемой хромосомы, тогда как в триплоидных клетках, содержащих две копии анализируемых хромосом, уровень синхронности гомологов близок к таковому диплоидных клеток. В гибридных клетках с околотетраплоидным набором хромосом уровень асинхронной репликации наблюдался более чем в 50 % клеток, что сопоставимо с уровнем асинхронности в тетраплоидных ЭСК и фибробластах. Таким образом, в гибридных клетках с числом копий индивидуальной хромосомы не более двух наблюдалась синхронная репликация гомологов, первоначально имевших различные уровни дифференцировки и параметры репликации. Однако информативность метода гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах существенно меняется с повышением числа копий индивидуальных хромосом и тем самым ограничивает возможности использования такого подхода для оценки синхронности репликации гомологов в гибридных клетках.

Ключевые слова: репликация, гибридизация *in situ*, гибридные клетки, интерфазные ядра, асинхронная репликация, плоидность, эмбриональные стволовые клетки, фибробласты.

Репликация ДНК в геноме млекопитающих происходит в течение S-фазы клеточного цикла. Почти все гены домашнего хозяйства реплицируются в первой половине S-фазы в большинстве типов клеток. Некоторые тканеспецифичные гены также реплицируются в первой половине S-фазы, в то время как для большинства из них характерна поздняя репликация (Goldman et al., 1984; Holmquist, 1987; Natton et al., 1988).

В настоящее время для визуализации репликации эффективно используется флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) меченых зондов ДНК большого размера (фаги, космиды, ВАС-клоны). Метод основан на подсчете количества флуоресцентных сигналов, детектируемых в интерфазных ядрах, причем наличие одинарного сигнала (single dot) свидетельствует о том, что репликация в этом участке хромосомы отсутствует, тогда как присутствие двух близко расположенных сигналов (double dot) свидетельствует о репликации в изучаемом районе хромосомы (Selig et al., 1992).

Другой уникальной особенностью метода гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах является возможность визуализировать асинхронность репликации аллелей или локальных районов в гомологичных хромосомах. Например, асинхронность репликации аллелей показана для импринтированных генов, экспрессия которых зависит от родительского происхождения (Bartolomei, Tilghman,

1997; Kagotani et al., 2002; Gribnau et al., 2003) и некоторых аутомомных генов (рецепторы Т-клеток, интерлейкины, рецепторы феромонов, p120 катенин и др.), для которых характерна моноаллельная экспрессия (Chess et al., 1994; Singh et al., 2003; Ensminger, Chess, 2004; Gimelbrant et al., 2005). В этом случае в ядре на одном гомологе выявляется одинарный сигнал, тогда как на другом — двойной. Сходная асинхронность репликации гомологичных районов характерна для активной и неактивной X-хромосом (Boggs, Chinault, 1994; Gribnau et al., 2005; Mlynarczyk-Evans et al., 2006).

Важно отметить, что в культуре диплоидных клеток можно наблюдать асинхронность репликации аллелей аутомомных генов примерно в 15—20 % клеток (Selig et al., 1992). Происхождение этой асинхронности неясно, но, вероятно, она возникает под влиянием по меньшей мере двух факторов: во-первых, моноаллельной экспрессии, затрагивающей до 10 % аутомомных генов (Gimelbrant et al., 2007), и, во-вторых, ошибки метода, связанной с наложением точек двойного сигнала, когда разошедшиеся хроматиды пространственно находятся вертикально к основной плоскости ядра на препарате. Метод гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах нашел широкое применение в онкологических исследованиях, поскольку при малигнизации отмечается увеличение доли клеток с асинхронной репликацией гомологов и интерпретируется это

как наиболее раннее событие начала процесса малигнизации (Korenstein-Plan et al., 2002).

Нам представлялось перспективным использовать гибридизацию *in situ* для визуализации репликации гомологичных хромосом в гибридных клетках, полученных слиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с соматическими. Такие гибридные клетки, в которых объединяются геномы с разным статусом дифференцировки, имеют высокий уровень плюрипотентности и многие характеристики, свойственные ЭСК (Matveeva et al., 1998; Серов и др., 2003; Vasilkova et al., 2007). Более того, такие гибридные клетки рассматриваются как эффективный способ перепрограммирования генома соматического партнера (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001, 2003; Cowan et al., 2005; Пузаков и др., 2007; Ambrosi et al., 2007; Vasilkova et al., 2007). Механизмы репрограммирования остаются во многом малоизученными, но, несомненно, сопровождаются глобальным или локальным ремоделированием хроматина и изменением статуса метилирования ДНК. В связи с этим встает вопрос: каков характер репликации гомологов в гибридных клетках и может ли он служить хромосомным индикатором репрограммирования? Учитывая, что гомологи хромосом, происходящие от разных партнеров по слиянию, изначально имели разный статус дифференцировки и разное время репликации, представляет несомненный интерес выяснить, сохраняются или нет эти различия в репликации гомологов в гибридных клетках типа ЭСК—соматическая клетка. Следует отметить, что до настоящего времени метод FISH на интерфазных ядрах для анализа репликации применялся только к диплоидным клеткам, тогда как данные о применении метода для клеток с большей пloidностью отсутствуют.

Данная работа посвящена анализу репликации трех районов, маркирующих разные хромосомы: а) в клонных гибридных клетках, полученных слиянием ЭСК со спленоцитами, с разным хромосомным составом, варьировавшим от околодиплоидного до около-тетраплоидного; б) в диплоидных и тетраплоидных клетках мыши с различным статусом дифференцировки.

Материал и методика

Использованные в работе реагенты: авидин-FITC (Sigma, США), антиавидин-FITC (Vector Laboratories, США), набор для ник-трансляции (Invitrogen, США), пепсин (Sigma, США), РНКазы (Fermentas, США), параформальдегид (Sigma, США), формамид (Sigma, США), DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole; Sigma, США).

В работе использовали следующие клеточные культуры: эмбриональные стволовые клетки линии НМ-1, полученные от мышей линии 129/Ola *Mus musculus* (Magin et al., 1992); диплоидные фетальные фибробласты (линия MEF), полученные стандартным способом (Hogan et al., 1994) из 12-суточных эмбрионов мышей DD/c; тетраплоидные клетки D3T14, полученные слиянием двух линий ЭСК, D3 и TgTP6 (Matveeva et al., 2005); тетраплоидные фибробласты (линия itMEF), выделенные в процессе культивирования линии первичных диплоидных фибробластов iMEF из мышей линии C57Bl/6-I(1)1RK, гетерозиготных по двойной инсерции в хромосоме 1 (Borodin et al., 1990); семь клонов гибридных клеток серии НМС, полученных от слияния ЭСК линии НМ-1 *Mus musculus* и спленоцитов *M. caroli* (Серов и др., 2003).

Приготовление препаратов интерфазных ядер и метафазных хромосом проводили по стандартной методике (Макгрегор, Варли, 1986). Гибридизацию *in situ* на интерфазных ядрах с биотинилированными ДНК-зондами проводили по методу Нестеровой и соавторов (Nesterova et al., 1998) с модификациями. Препараты обрабатывали РНКазой при 37 °С в течение 1 ч, а затем 5 мин 0.02%-ным пепсином в 10 мМ HCl. Денатурацию проводили при 70 °С в 70%-ном формамиде в течение 2 мин.

В качестве зондов использовали ДНК трех ВАС-клонов из библиотеки RP23 мыши (Invitrogen, США): RP23-260 (хромосома 1) содержит ген *Pax3* (paired box gene 3), относящийся к генам домашнего хозяйства; RP23-183 (хромосома 3) содержит ген *LmnA* (lamin A), который экспрессируется в большинстве дифференцированных клеток, но не в клетках эмбрионов ранних стадий развития; RP23-311 (хромосома 6) содержит ген *Ilr5* (interleukin 5 receptor, alpha), экспрессирующийся в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты мыши и в экстраэмбриональных клетках.

Биотинилирование ДНК-зондов проводили с помощью ник-трансляции в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Меченые зонды денатурировали 10 мин при 95 °С с Cot-1 ДНК и инкубировали 30 мин при 37 °С для удаления повторяющихся последовательностей. Гибридизацию *in situ* проводили в течение 2 сут во влажной камере при 37 °С. Детекцию гибридизовавшихся зондов проводили с помощью авидин-FITC и антиавидин-FITC. Хромосомы и ядра окрашивали DAPI.

Идентификацию родительских хромосом в гибридных клетках серии НМС проводили с помощью гибридизации *in situ* с использованием видоспецифичного FITC-меченного зонда pMsat5, который гибридизуется с центромерами большинства хромосом *M. musculus*, но не *M. caroli* (Присяжнюк и др., 2005), и меченных дигоксинином зондов, специфичных для хромосом 1, 3 и 6 обоих видов (Пузаков и др., 2007).

Флуоресцентный анализ проводили на микроскопе Axioscope 2 (Zeiss, Германия). Для обработки изображений применяли пакет прикладных программ ISIS3 (*In Situ Imaging System*) компании Metasystems.

Для статистической обработки данных использовали χ^2 -критерий для сравнения двух эмпирических совокупностей (Васильева, 2004).

Результаты и обсуждение

Апробацию метода флуоресцентной гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах с использованием биотинилированных зондов RP23-260, RP23-183 и RP23-311 мы провели, анализируя региональную репликацию гомологов хромосом 1, 3 и 6 в двух линиях диплоидных клеток: ЭСК линии НМ-1 и фетальных фибробластах (MEF). Для анализа репликации изучаемых районов в гомологичных хромосомах подсчитывали синхронные (SS и DD) (рис. 1, а, б) и несинхронные (SD) (рис. 1, в) флуоресцентные сигналы в интерфазных ядрах клеток. Всего было проанализировано от 80 до 250 ядер. Доля несинхронных сигналов в клетках анализируемых линий варьировала от 15 до 24 % (рис. 2). Статистический анализ не выявил достоверных различий по количеству несинхронных сигналов по каждому из зондов между линиями тестируемых клеток, так же как не найдено достоверных различий внутри каждой из линий при использовании разных зондов. Полу-

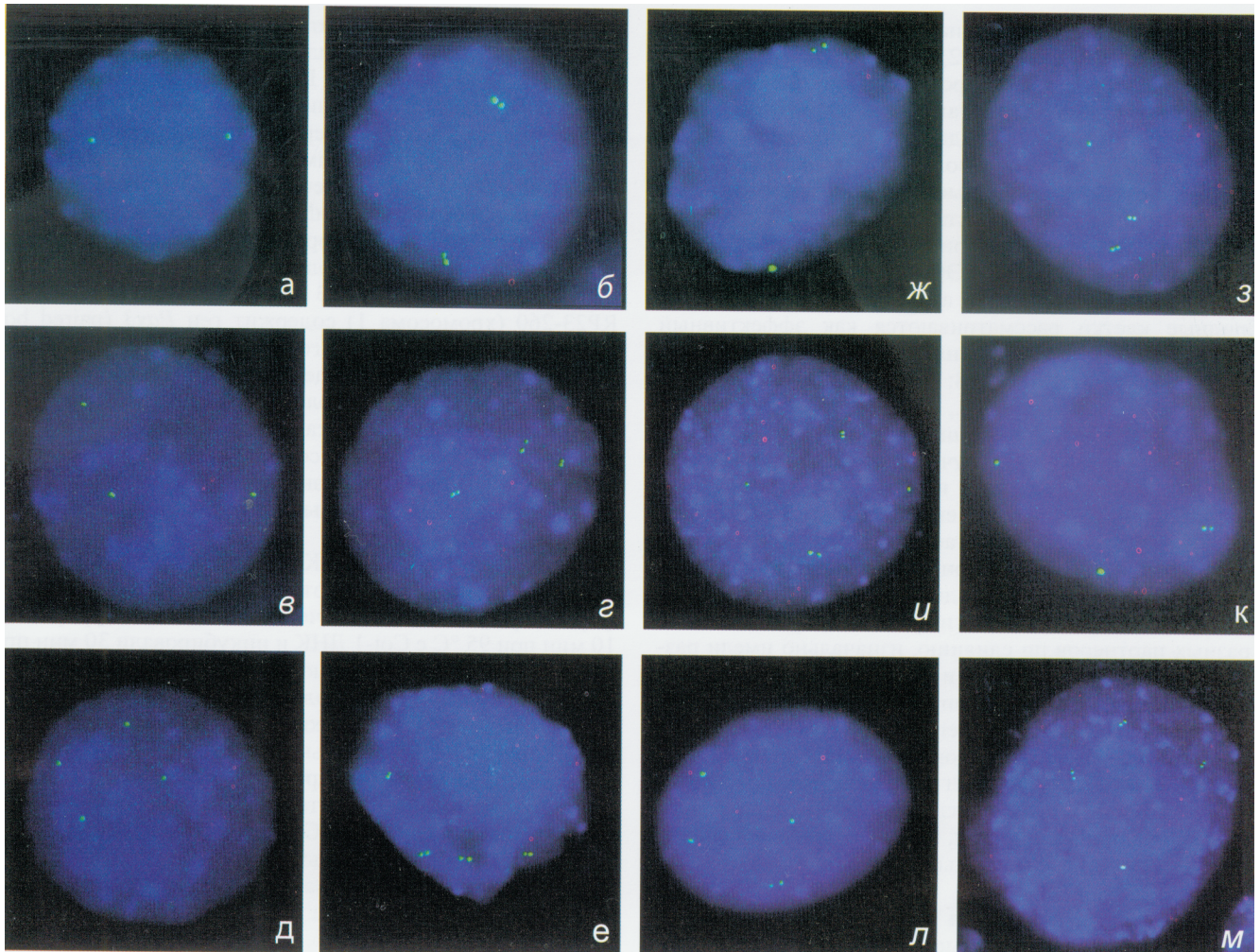


Рис. 1. Результаты флуоресцентной *in situ* гибридизации с мечеными зондами на интерфазных ядрах клеток с различной плоидностью.

а, б, ж — диплоидные клетки; *в, г, з, к* — триплоидные клетки; *д, е, и, л, м* — тетраплоидные клетки. Представлены типы сигналов, наблюдаемых в данных клетках: *а* — SS, *б* — DD, *в* — SSS, *г* — DDD, *д* — SSSS, *е* — DDDD, *ж* — SD, *з* — SDD, *и* — SSDD, *к* — SSD, *л* — SSSD, *м* — SDDD.

ченные результаты согласуются с известными литературными данными о доле несинхронных сигналов с гомологов, выявляемых этим методом, в других линиях диплоидных клеток (Selig et al., 1992). Таким образом, не было найдено различий в характере репликации исследуемых районов гомологичных хромосом в плюрипотентных (ЭСК) и дифференцированных (фибробласты) диплоидных клетках.

Мы использовали клоны гибридных клеток серии НМС для анализа репликации родительских хромосом, изначально различающихся по статусу дифференцировки. На начальных этапах выделения и культивирования гибридных клеток серии НМС имела место сегрегация хромосом преимущественно одного, иногда обоих партнеров по слиянию с последующей стабилизацией кариотипа (Пристяжнюк и др., 2005; Matveeva et al., 2005). Мы выбрали три категории клонов для дальнейшего анализа: 3 субклона первичного клона НМС29 (НМС29-3, НМС29-4 и НМС29-7) с околодиплоидным кариотипом (большинство клеток содержало 40–44 хромосомы); 2 клона с околотриплоидным набором (НМС1 и НМС56); 2 клона с околотетраплоидным набором хромосом (НМС27 и НМС41). Таким образом, появилась возможность провести анализ репликации гомологов в клетках с

разным числом копий хромосом 1, 3 и 6 на фоне варьирующей плоидности.

Мы провели анализ региональной репликации родительских хромосом в субклонах клона НМС29 только для хромосомы 3, поскольку все гибридные клетки содержали одну копию *M. musculus* и одну *M. caroli*, тогда как хромосома 6 была представлена только гомологами *M. musculus*, а хромосома 1 — двумя копиями *M. musculus* и одной *M. caroli*. Анализ репликации хромосомы 3 с помощью FISH на интерфазных ядрах клеток субклонов НМС29-3, НМС29-4 и НМС29-7 не выявил достоверных различий в характере распределения синхронных и несинхронных сигналов с гомологичных хромосом *M. musculus* и *M. caroli* в сравнении с данными по диплоидным клеткам (рис. 3). Полученные результаты позволяют предполагать, что репликация двух гомологов разного происхождения в этих гибридных клетках происходит синхронно.

Иную картину мы наблюдали в клонах гибридных клеток с большей плоидностью. В околотриплоидных клонах НМС1 и НМС56 хромосома 3 представлена тремя гомологами, при этом в клоне НМС1 эта хромосома представлена одним гомологом от плюрипотентного партнера и двумя — соматического, тогда как в клоне НМС56, на-

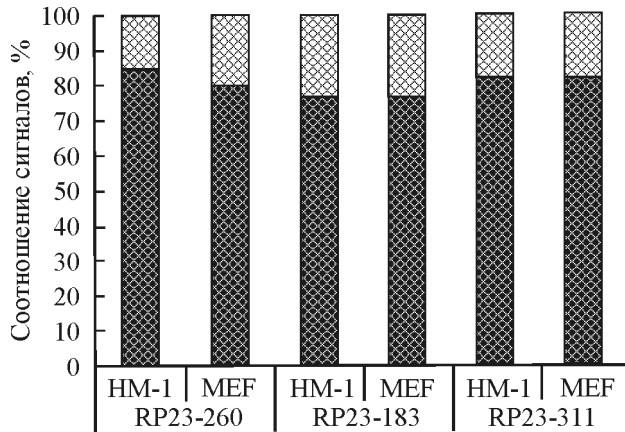


Рис. 2. Соотношение синхронных (черная часть столбца) и несинхронных (серая часть столбца) сигналов с гомологичных хромосом по результатам флуоресцентной гибридизации *in situ* с мечеными зондами RP23-260, RP23-183 и RP23-311 на интерфазных ядрах диплоидных клеток двух линий HM-1 и MEF.

По вертикали — соотношение сигналов, %; по горизонтали — номер зонда (внизу) и линии клеток (вверху).

оборот, — двумя гомологами от плюрипотентного и одним от соматического партнера. Такое же распределение гомологов характерно для хромосомы 1 в клоне HMC56 и хромосомы 6 в клоне HMC1. В клетках, содержащих три гомолога исследуемых хромосом, также подсчитывали синхронные (SSS, DDD) (рис. 1, в, з) и несинхронные (SDD, SSD) (рис. 1, з, к) сигналы на интерфазных ядрах. Всего было подсчитано от 100 до 160 ядер. Диаграмма распределения синхронных и несинхронных сигналов с гомологичных хромосом на интерфазных ядрах в этих клонах представлена на рис. 4. Видно, что в случае присутствия трех гомологов хромосом 1, 3 и 6 (зонды RP23-260, RP23-183 и RP23-311 соответственно) количество несинхронных сигналов резко возросло по сравнению с таковым в диплоидных клетках и варьировало от 46 до 57 %.

Особенностью клонов HMC1 и HMC56 являлось то, что часть их клеток содержала по одной копии родитель-

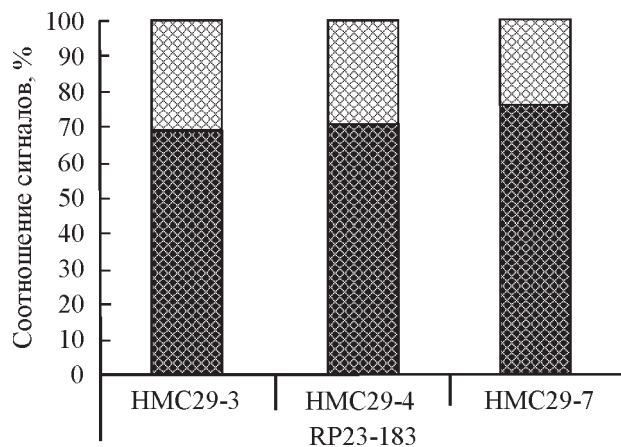


Рис. 3. Соотношение синхронных (черная часть столбца) и несинхронных (серая часть столбца) сигналов с гомологичных хромосом по результатам флуоресцентной гибридизации *in situ* с меченым зондом RP23-183 на интерфазных ядрах клеток субклонов HMC29-3, HMC29-4 и HMC29-7.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

ских хромосом 1, 3 и 6, но на фоне околотриплоидного набора хромосом. Анализ этой части клеток показал, что доля несинхронных сигналов с двух родительских гомологов в таких клетках сопоставима с таковой в диплоидных клетках, хотя имеется слабо выраженная тенденция к повышению. Однако статистическая обработка не выявила достоверных различий в количестве несинхронных сигналов в околотриплоидных клетках с двумя гомологами хромосом 1, 3 и 6 по сравнению с количеством несинхронных сигналов в диплоидных клетках. Эти результаты указывают на то, что синхронность региональной репликации родительских гомологов зависит в большей степени от числа копий гомологичных хромосом и в меньшей степени — от общего числа хромосом в клетке (плоидности).

Анализ клона HMC27, в котором установлено присутствие четырех гомологов хромосом 3 и 6, а также клона HMC41, в котором присутствуют четыре гомолога хромосомы 6, на фоне околотетраплоидного набора хромосом показал, что количество несинхронных сигналов достигает 65 % для хромосомы 3, а для хромосомы 6 — более 80 % в клоне HMC27 и 62 % в клоне HMC41 (рис. 5). Эти данные с высокой достоверностью 99.9 % отличаются от результатов анализа диплоидных линий. Таким образом, в клетках с тремя и четырьмя копиями исследуемых хромосом доля несинхронных сигналов с гомологов резко возрастает.

Для того чтобы вычлнить влияние двух факторов, а именно увеличения числа копий индивидуальных хромосом и различия в их происхождении на выявляемую высокую асинхронность репликации гомологов, мы решили провести анализ тетраплоидных плюрипотентных клеток D3T14 и тетраплоидных фибробластов itMEF.

В тетраплоидных клетках также подсчитывали синхронные (SSSS, DDDD) (рис. 1, д, е) и несинхронные (SSSD, SSDD, SDDD) (рис. 1, и, л, м) сигналы с гомологичных хромосом на интерфазных ядрах. Всего было подсчитано от 60 до 95 ядер для каждой линии. Доля несинхронных сигналов в ядрах клеток обеих линий варьировала от 59 до 81 % (рис. 6). Из этих данных видно, что в тетраплоидных клетках количество несинхронных сигналов также резко возросло по сравнению с их количеством

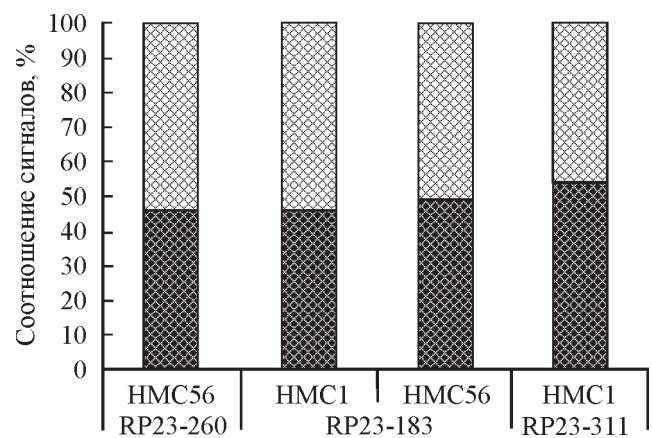


Рис. 4. Соотношение синхронных (черная часть столбца) и несинхронных (серая часть столбца) сигналов с гомологичных хромосом по результатам флуоресцентной гибридизации *in situ* с мечеными зондами RP23-260, RP23-183 и RP23-311 на интерфазных ядрах клеток двух клонов HMC1 и HMC56.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 2, 3.

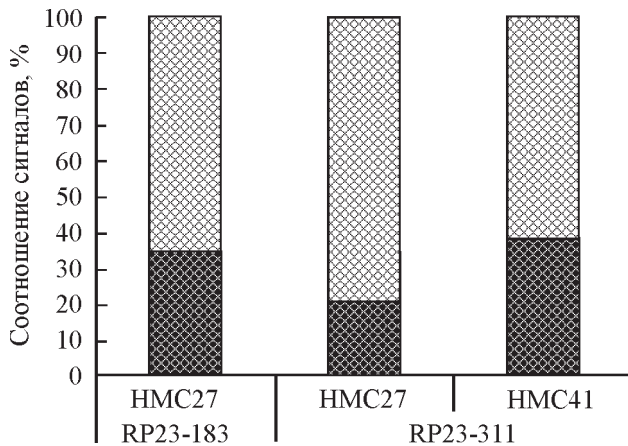


Рис. 5. Соотношение синхронных (черная часть столбца) и несинхронных (серая часть столбца) сигналов с гомологичных хромосом по результатам флуоресцентной гибридизации *in situ* с мечеными зондами RP23-183 и RP23-311 на интерфазных ядрах клеток клонов HMC27 и HMC41.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 2—4.

в диплоидных клетках. Статистический анализ с достоверностью 99.9 % показал различия в количестве несинхронных сигналов с гомологичных хромосом в тетраплоидных и диплоидных клетках. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что количество несинхронных сигналов существенно возрастает в клетках с увеличением числа копий тестируемой хромосомы, причем даже в том случае, когда все гомологи имеют одинаковый статус дифференцировки.

Суммируя данные о репликации гомологичных районов хромосом, полученные с помощью гибридизации *in situ* с мечеными ДНК-зондами в клетках с различной плоидностью и разным числом копий индивидуальных хромосом, можно сделать вывод о том, что при увеличении тестируемой хромосомы даже на одну копию (трисомия) существенно увеличивается доля асинхронных сигналов (от 46 до 57 %). Следует, однако, отметить, что доля несинхронных сигналов с двух копий индивиду-

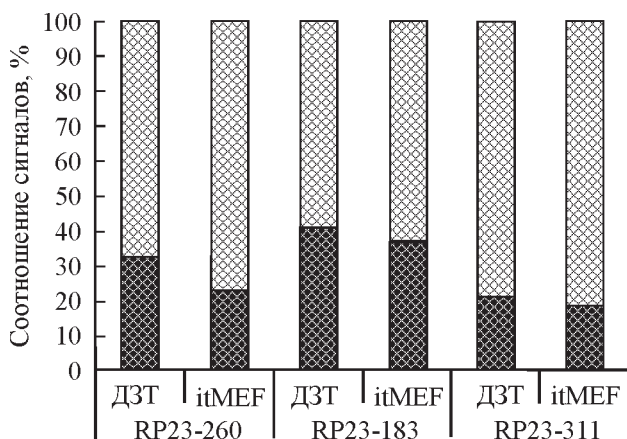


Рис. 6. Соотношение синхронных (черная часть столбца) и несинхронных (серая часть столбца) сигналов с гомологичных хромосом по результатам флуоресцентной гибридизации *in situ* с мечеными зондами RP23-260, RP23-183 и RP23-311 на интерфазных ядрах тетраплоидных клеток двух линий D3T14 и itMEF.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 2—5.

альной хромосомы на фоне триплоидного кариотипа сопоставима с таковой в диплоидных клетках. Эти данные позволяют заключить, что увеличение числа копий индивидуальной хромосомы является более важным фактором повышения доли несинхронных сигналов, чем общее увеличение числа хромосом в клетке.

Причины существенного повышения выявляемой асинхронности в репликации гомологов при возрастании числа их копий в клетке остаются неизвестными. Одной из причин может быть то, что при увеличении числа копий индивидуальных хромосом возрастает ошибка метода, связанная с наложением точек двойного сигнала с разошедшихся хроматид. С другой стороны, уровень моноаллельной экспрессии аутомных генов (Gimelbrant et al., 2007) также может возрастать при повышении количества копий индивидуальных хромосом. Уместно упомянуть, что уровень генной экспрессии гомологов в тетраплоидах выше в 1.5 раза по сравнению с диплоидами вместо ожидаемого двукратного повышения (Eakin, Behringer, 2003). Этот феномен может свидетельствовать в пользу возможного реального увеличения несинхронной репликации при числе гомологов больше двух. Необходимы дальнейшие исследования для понимания реальных механизмов влияния плоидности на синхронность или асинхронность репликации гомологичных хромосом.

Что касается возможности использования метода гибридизации *in situ* на интерфазных ядрах как способа оценки синхронности или асинхронности региональной репликации родительских хромосом в гибридных клетках типа ЭСК—соматическая клетка, то информативность его в этом случае ограничена клетками, в которых количество копий индивидуальной хромосомы не превышает двух. Согласно нашим данным, в таких гибридных клетках происходит синхронная репликация гомологов, что может отражать «выравнивание» гомологов с первоначальными различиями в уровнях дифференцировки.

Работа была проведена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 5.2 и 14.2.

Список литературы

- Васильева Л. А. 2004. Статистические методы в биологии. Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН. 128 с.
- Макгрегор Г., Варли Дж. 1986. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 272 с.
- Пристяжнюк И. Е., Темирова С. А., Мензоров А. Г., Круглова А. А., Матвеева Н. М., Серов О. Л. 2005. Видимая и «скрытая» сегрегация родительских хромосом в эмбриональных стволовых гибридных клетках. Онтогенез. 36 (2) : 150—157.
- Пузаков М. В., Баттулин Н. П., Темирова С. А., Матвеева Н. М., Сердюкова Н. А., Графодатский А. С., Серов О. Л. 2007. Анализ экспрессии родительских аллелей *Xist* и *Gla* в межвидовых эмбриональных гибридных клетках в условиях индуцированной *in vitro* инактивации X-хромосом. Онтогенез. 38 (2) : 1—8.
- Серов О. Л., Матвеева Н. М., Кизилова Е. А., Кузнецов С. Б., Железова А. И., Голубица А. Н., Пристяжнюк И. Е., Пузаков М. В. 2003. «Хромосомная память» родительских геномов в эмбриональных гибридных клетках. Онтогенез. 34 (3) : 216—227.
- Ambrosi D. J., Tanasijevic B., Kaur A., Oberfell C., O'Neill R. J., Krueger W., Rasmussen T. P. 2007. Genome-wide reprogramming in hybrids of somatic cells and embryonic stem cells. Stem Cells. 25 : 1104—1113.
- Bartolomei M. S., Tilghman S. M. 1997. Genomic imprinting in mammals. Ann. Rev. Genet. 31 : 493—525.

- Boggs B. A., Chinault C. 1994. Analysis of replication timing properties of human X-chromosomal loci by fluorescence *in situ* hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91 : 6083—6087.
- Borodin P. M., Gorlov I. P., Ladygina T. Yu. 1990. Double insertion of homogeneously staining regions in chromosome 1 of wild *Mus musculus musculus*: effects on chromosome pairing and recombination. J. Hered. 81 : 91—95.
- Chess A., Simon I., Cedar H., Axel R. 1994. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. Cell. 78 : 823—834.
- Cowan C. A., Atienza J., Melton D. A., Eggan K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science. 309 : 1369—1373.
- Eakin G. S., Behringer R. R. 2003. Tetraploid development in the mouse. Develop. Dyn. 228 : 751—766.
- Ensminger A. W., Chess A. 2004. Coordinated replication timing of monoallelically expressed genes along human autosomes. Hum. Mol. Genet. 13 : 651—658.
- Gimelbrant A. A., Ensminger A. W., Qi P., Zucker J., Chess A. 2005. Monoallelic expression and asynchronous replication of p120 catenin in mouse and human cells. J. Biol. Chem. 280 : 1354—1359.
- Gimelbrant A. A., Hutchinson J. N., Thompson B. R., Chess A. 2007. Widespread monoallelic expression on human autosomes. Science. 318 : 1136—1140.
- Goldman M. A., Holmquist G. P., Gray M. C., Caston L. A., Nag A. 1984. Replication timing of genes and middle repetitive sequences. Science. 224 : 686—692.
- Gribnau J., Hochedlinger K., Hata K., Li E., Jaenisch R. 2003. Asynchronous replication timing of imprinted loci is independent of DNA methylation, but consistent with differential subnuclear localization. Genes Develop. 17 : 759—773.
- Gribnau J., Luikenhuis S., Hochedlinger K., Monkhorst K., Jaenisch R. 2005. X-chromosome choice occurs independently of asynchronous replication timing. J. Cell Biol. 168 : 365—373.
- Hatton K. S., Dhar V., Brown E. H., Iqbal M. A., Stuart S., Didamo V. T., Schildkraut C. L. 1988. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 8 : 2149—2158.
- Hogan B., Beddington R., Constantini F., Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 497 p.
- Holmquist G. P. 1987. Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression. Amer. J. Hum. Genet. 40 : 151—173.
- Kagotani K., Takebayashi S., Kohda A., Taguchi H., Paulsen M., Walter J., Reik W., Okumura K. 2002. Replication timing properties within the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 : 1046—1051.
- Korenstein-Ilan A., Ameiel A., Lalezari S., Lishner M., Avivi L. 2002. Allele-specific replication associated with aneuploidy in blood cells of patients with hematologic malignancies. Cancer Genet. Cytogenet. 139 : 97—103.
- Magin T. M., McWhir J., Melton D. W. 1992. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. Nucl. Acids Res. 20 : 3795—3796.
- Matveeva N. M., Pristiyazhnyuk I. E., Temirova S. A., Menzurov A. G., Vasilkova A., Shilov A. G., Smith A., Serov O. L. 2005. Unequal segregation of parental chromosomes in embryonic stem cell hybrids. Mol. Reprod. Develop. 71 : 305—314.
- Matveeva N. M., Shilov A. G., Kaftanovskaya E. M., Maximovskiy L. P., Zhelezova A. I., Golubitsa A. N., Bayborodin S. I., Fokina M. M., Serov O. L. 1998. *In vitro* and *in vivo* study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. Mol. Reprod. Develop. 50 : 128—138.
- Mlynczyk-Evans S., Royce-Tolland M., Alexander M. K., Andersen A. A., Kalantry S., Gribnau J., Panning B. 2006. X-chromosomes alternate between two states prior to random X-inactivation. PLoS Biology. 4 : 0906—0916.
- Nesterova T. B., Duthie S. M., Mazurok N. A., Isaenko A. A., Rubtsova N. V., Zakian S. M., Brockdorff N. 1998. Comparative mapping of X-chromosomes in vole species of the genus *Microtus*. Chromosome Res. 6 : 41—48.
- Selig S., Okumura K., Ward D. C., Cedar H. 1992. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence *in situ* hybridization. EMBO J. 11 : 1217—1225.
- Singh N., Ebrahimi F. A., Gimelbrant A. A., Ensminger A. W., Tackett M. R., Qi P., Gribnau J., Chess A. 2003. Coordination of the random asynchronous replication of autosomal loci. Nat. Genet. 33 : 339—341.
- Tada M., Morizane A., Kimura H., Kawasaki H., Ainscough J. F. X., Sasai Y., Nakatsuji N., Tada T. 2003. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. Develop. Dyn. 227 : 504—510.
- Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. Curr. Biol. 11 : 1553—1558.
- Vasilkova A. A., Kizilova H. A., Puzakov M. V., Shilov A. G., Zelezova A. I., Golubitsa A. N., Battulin N. R., Vedernikov V. E., Menzurov A. G., Matveeva N. M., Serov O. L. 2007. Dominant manifestation of pluripotency in embryonic stem cell hybrids having various numbers of somatic chromosomes. Mol. Reprod. Develop. 74 : 941—951.

Поступила 20 VIII 2008

FISH-ANALYSIS OF REGIONAL REPLICATION IN HOMOLOGOUS CHROMOSOMES IN HYBRID CELLS OBTAINED BY FUSION OF EMBRYONIC STEM CELLS WITH SOMATIC CELLS

O. L. Podryadchikova, I. E. Pristiyazhnyuk, N. M. Matveeva, O. L. Serov

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;
e-mail: serov@bionet.nsc.ru

The paper concerns FISH-analysis of regional replication of parental chromosomes 1, 3 and 6 in hybrid cells obtained by fusion between *Mus musculus* embryonic stem cells (ESC) and *M. caroli* splenocytes. The data demonstrated that parental chromosomes in the hybrid cells with near-diploid karyotype showed synchronous replication in 70—75 % of tested cells that was comparable with diploid ESC and diploid fibroblasts. Synchronous replication of parental chromosomes in hybrid cells with near-triploid karyotype was observed in 46—57 % of tested cells. However, it was correct in the case of hybrid cells with three copies of the tested chromosomes whereas the ratio of synchronous replication in triploid cells with two copies was comparable or similar to that in diploid cells. Hybrid cells with near-tetraploid karyotype showed high ratio of asynchronous replication (over 50 %) comparable to those tetraploid ESC and tetraploid fibroblasts but significantly distinguished from diploid cells. Thus, most hybrid cells with two copies of tested parental chromosomes showed their synchronous replication. Unfortunately, the FISH-analysis is poor informative when it is used for studying cells with more than two copies of tested chromosomes.