

ХРОМОСОМНЫЙ СОСТАВ МЕЖВИДОВЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК МЫШИ

© И. Е. Пристяжнюк,¹ Н. М. Матвеева, А. С. Графодатский,
Н. А. Сердюкова, О. Л. Серов

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

¹ электронный адрес: iprist@ngs.ru

Исследовали хромосомный состав 20 клонов гибридных клеток, полученных слиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) *Mus musculus* и спленоцитов *M. caroli*. Использование двухцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* с хромосоמו- и видоспецифичными зондами позволило с надежностью определить в гибридных клетках принадлежность гомеологов любой хромосомы тому или другому из партнеров по слиянию. В зависимости от соотношения гомеологов родительских хромосом все клоны были разделены на несколько групп, начиная от тетраплоидных клеток, несущих в своем составе два набора хромосом *M. musculus* и единичные хромосомы *M. caroli*, до клонов с выраженным преобладанием гомологов хромосом *M. caroli*. В 8 клонах гибридных клеток мы наблюдали сильное преобладание хромосом плюрипотентного партнера над хромосомами соматического в соотношении от 5 : 1 до 3 : 1. Соотношение хромосом *M. musculus* и *M. caroli* в остальных клонах гибридных клеток было либо равным (1 : 1 или 2 : 2), либо с преобладанием хромосом плюрипотентного (2 : 1) или дифференцированного (1 : 2) партнера. Предпочтительная сегрегация хромосом плюрипотентного партнера в 3 гибридных клонах отмечена нами впервые и, возможно, свидетельствует о выравнивании эпигенетического статуса хромосом родительских видов.

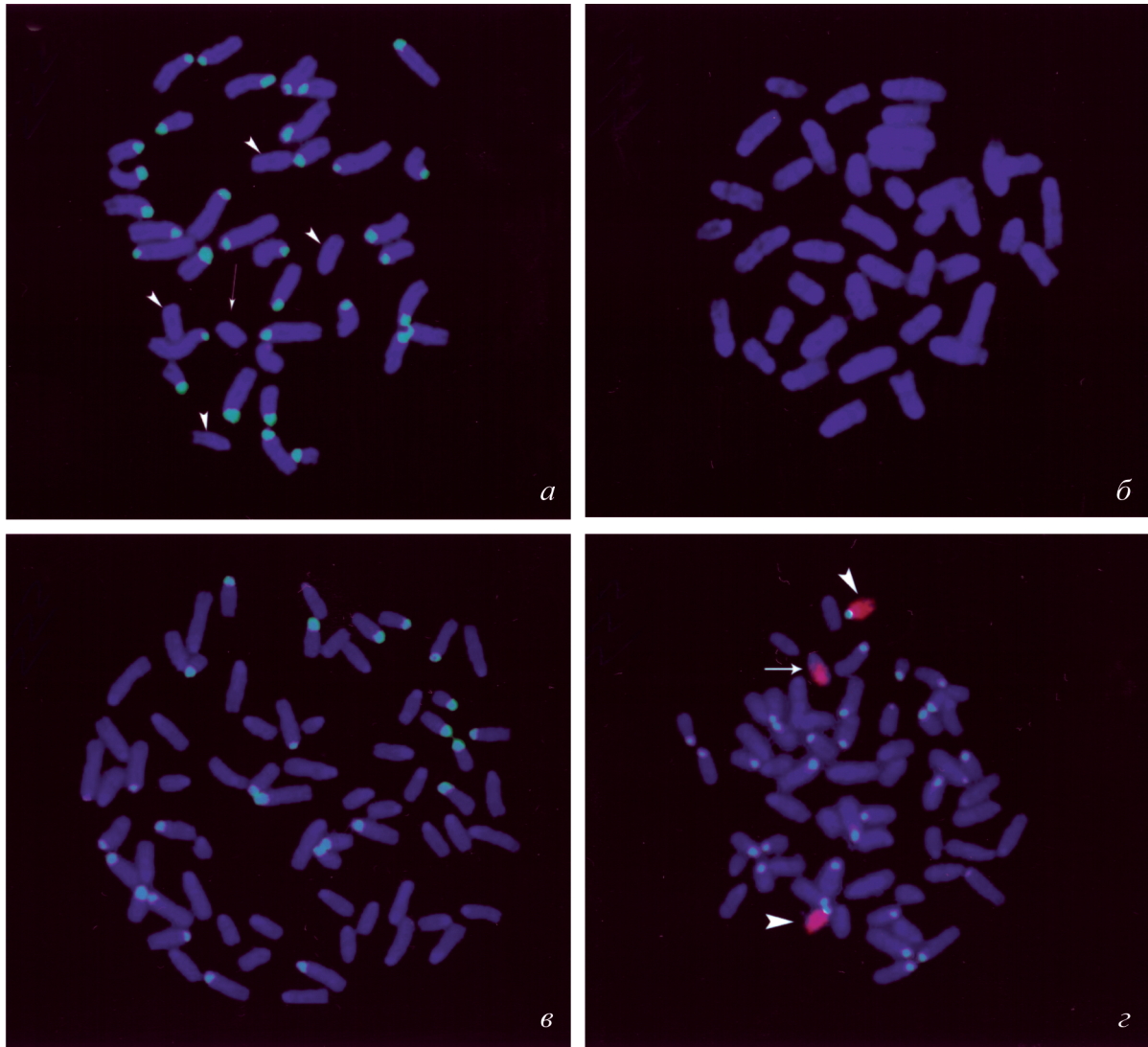
Ключевые слова: стволовые гибридные клетки, межвидовые гибридные клетки, двухцветная флуоресцентная гибридизация *in situ*, гомеологи хромосом, пloidность, сегрегация хромосом.

Репрограммирование соматических клеток и восстановление в них плюрипотентности является одной из актуальных проблем современной биологии. Значительный прогресс в этом направлении был достигнут в экспериментах по переносу ядер дифференцированных клеток в энуклеированные ооциты с последующим получением клонированных животных. Однако эффективность клонирования крайне мала, около 0—4 % (Mullins et al., 2004), сопряжена с высокой внутриутробной и неонатальной смертностью и многочисленными дефектами в развитии клонированных животных. Было показано, что аномалии развития связаны с абберантным репрограммированием хроматина соматического ядра донора (Jaenisch et al., 2002).

Альтернативной возможностью изменения потенциала развития соматических клеток является их слияние с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). ЭСК — это плюрипотентные клетки, получаемые из внутренней клеточной массы эмбрионов на стадии бластоцисты. Способность ЭСК репрограммировать геном дифференцированных клеток впервые была показана в 1996 г. при исследовании гибридных клеток, полученных слиянием ЭСК линии НМ-1 и спленоцитов взрослой мыши линии DD/c (Матвеева и др., 1996). В дальнейшем способность ЭСК создавать сходное с ооцитами «репрограммирующее микроокружение» (Wilmot et al., 1997; Ambrosi, Rasmussen, 2005) подтвердилась при их гибридизации со спленоцитами (Matveeva et al., 1998, 2005), тимоцитами (Tada et al.,

2001, 2003), клетками костного мозга (Terada et al., 2002), фибробластами (Sullivan et al., 2006) и клетками-предшественниками нейрогенеза (Ying et al., 2002). Во всех этих исследованиях были получены гибридные ЭСК, обладающие фенотипом и свойствами плюрипотентных ЭСК. Показано, что в гибридных ЭСК происходит реактивация генов соматических родительских клеток, экспрессия которых в норме характерна только для плюрипотентных клеток (*oct-4*, *nanog*, *sox2* и т. д.) (Ambrosi, Rasmussen, 2005); активируется неактивная X-хромосома, принадлежащая соматическому партнеру (Tada et al., 2001). При введении в полость бластоцисты такие клетки способны участвовать в развитии химер (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001; Ying et al., 2002; Vasilkova et al., 2007). При подкожном введении иммунодефицитным мышам гибридные ЭСК образуют тератомы, содержащие производные трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы и энтодермы) (Tada et al., 2003; Vasilkova et al., 2007).

Данные по хромосомному составу гибридных ЭСК достаточно противоречивы. Большинство исследователей утверждают, что при слиянии ЭСК и соматических клеток образуются гибридные клетки, имеющие тетраплоидный или околотетраплоидный набор хромосом (Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002), т. е. ожидаемое число хромосом при слиянии двух диплоидных геномов. Однако согласно нашим данным, в гибридах, полученных слиянием ЭСК и спленоцитов, наблюдалась интенсивная потеря хромосом, причем преимущественно



Идентификация родительских хромосом в гибридных клетках клонов серии НМС.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* с плазмидой pMSat5, меченой биотином и детектированной ФИТС, на метафазных хромосомах: *M. musculus* (а), *M. caroli* (б) и гибридных клеток клона НМС28 (в). Сигнал виден над прицентромерными районами всех хромосом, кроме Y, 8 и 14 (отмечены стрелками на рисунке, а). Зонд специфичен для хромосом *M. musculus* и не метит хромосомы *M. caroli*. г — двухцветная гибридизация *in situ* с пробой на хромосому 9 мыши и видоспецифичным зондом на хромосомах гибридного клона НМС42 (2 гомолога хромосомы 9 *M. musculus* и 1 гомолог *M. caroli* отмечены стрелками).

соматического партнера (Матвеева и др., 1996; Matveeva et al., 1998; Пристяжнюк и др., 2005). Сегрегация хромосом также была отмечена в гибридных клетках, образованных при спонтанном слиянии клеток костного мозга и гепатоцитов (Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003).

Следует отметить, что в большинстве исследований при слиянии использовали родительские клетки одного вида, что исключает возможность идентификации цитогенетическими методами в гибридных клетках хромосом, происходящих от того или другого партнера по слиянию. В то же время простой подсчет хромосом не позволяет оценить реальное соотношение родительских хромосом в гибридных ЭСК. Так, например, при слиянии ЭСК *Mus musculus* и спленоцитов азиатской мыши *M. caroli* из 20 клонов гибридных клеток 8 клонов имели околотетраплоидный набор хромосом. Использование ДНК-зонда, специфичного для хромосом *M. musculus*, позволило различить хромосомы родительских видов в гибридных клетках и установить, что из 8 клонов с околотетраплоид-

ным набором хромосом в 5 клонов большинство хромосом происходило от ЭСК и только несколько хромосом принадлежало соматическому партнеру по слиянию (Пристяжнюк и др., 2005; Matveeva et al., 2005). Наиболее вероятным объяснением такого хромосомного состава являлось слияние двух диплоидных (или одной тетраплоидной) ЭСК и одной соматической клетки с последующей преимущественной сегрегацией хромосом последней. Следовательно, тетраплоидный хромосомный состав не всегда отображает равное соотношение двух родительских геномов в гибридной клетке. Таким образом, исследование репрограммирования соматических клеток в процессе клеточной гибридизации требует более детальной цитогенетической характеристики гибридных клеток.

В данной работе мы провели подробный анализ хромосомного состава 20 клонов гибридных клеток, полученных слиянием ЭСК *M. musculus* и соматических клеток (спленоцитов) *M. caroli*. Для этого мы применили метод двухцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* с

Соотношение родительских гомологов индивидуальных хромосом
в гибридных клетках ионов серии НМС

Доля клеток (%) с преобладающим

ГРУППЫ ^а	Клоны	1	2	3	4	5	6	7	9
I	HMC15	H ^б	H	H	H	H	H	H	H
	HMC47	H	H	H	H	H	70% 2M:4M	H	45% 5M:3M 33% 3M:1C
	HMC48	H	H	H	H	51% 4M:3M 34% 4M:1C	H	H	H
	HMC54	78% 3M:1C 22% 2M:1C	H	H	H	55% 3M:1C	H	H	H
	HMC58	H	H	H	H	H	H	H	H
II	HMC23	33% 4M:3M 43% 4M:1C	50% 3M 20% 3M:1C	61% 3M:1C 39% 2M:1C	67% 3M	57% 2M:2C 21% 2M:1C	74% 4M:2M	56% 3M:1C	49% 2M:1C 21% 3M:1C
	HMC27	87% 3M:2C	84% 2M:1C	83% 3M:1C	58% 1M:2C 23% 2M:2C	H	60% 3M:1C	63% 3M:2C 24% 3M:1C	68% 3M:1C
	HMC44	90% 3M:1C	89% 2M:1C	76% 3M:1C	92% 2M:2C	78% 3M	45% 2M:1C 36% 3M:1C	86% 2M:2C	81% 3M
III	HMC56	83% 2M:1C	88% 2M:1C	91% 2M:1C	80% 2M:1C	92% 2M:1C	H	87% 2M:1C	90% 2M:1C
	HMC21	81% 2M:2C	86% 2M:1C	73% 2M:1C 21% 1M:1C	89% 2M:1C	89% 2M:2C	90% 2M:1C	51% 2M:1C 34% 1M:2C	81% 1M:2C
	HMC42	76% 2M:2C	80% 1M:2C	95% 1M:2C	59% 1M:2C 32% 2M:1C	86% 2M:1C	68% 2M:1C	94% 2M:1C	97% 2M:1C
IV	HMC30	97% 2M:1C	H	91% 2M:2C	H	78% 2M:1C	H	H	73% 2M:1C 24% 1M:2C
	HMC50	64% 2M:1C	H	79% 1M:1C	H	79% 2M:1C	H	H	85% 2M:1C
	HMC29	47% 2M:2C 33% 2M:1C	73% 1M:1C	87% 1M:1C	H	87% 1M:1C	H	H	H
V	HMC4	71% 2M:2C	35% 2M:2C 31% 2M:3C 23% 1M:2C	67% 2M:2C	53% 2M:1C 27% 1M:2C	52% 2M:2C 24% 1M:2C	40% 2M:1C 24% 3M:1C	100% 2M:2C	67% 2M:2C
	HMC41	53% 3M:2C 25% 3M:1C	27% 1M:2C 70% 1M:1C	100% 2M:1C	83% 2M:2C	70% 2M:2C	68% 2M:2C	78% 2M:2C	82% 2M:2C
	HMC6	35% 2M:2C 26% 2M:3C	42% 2M:1C 21% 1M:1C	83% 2M:2C	76% 2M:2C	45% 2M:2C 23% 2M:1C	59% 2M:2C 26% 2M:1C	62% 2M:2C	66% 2M:2C 20% 2M
VI	HMC2	87% 3M:2C	89% 2M:1C	96% 2M:1C	84% 2M:1C	73% 1M:2C	75% 1M:2C	84% 2M:1C	86% 2M:1C
	HMC1	64% 2M:3C 20% 2M:2C	73% 1M:2C	75% 1M:2C	97% 2M:1C	78% 2M:1C	70% 2M:1C 23% 2M:2C	87% 2M:1C	75% 2M:2C
	HMC28	72% 2M:2C	37% 1M:2C 29% 1M:1C	100% 1M:2C	58% 2M:2C	73% 1M:2C	90% 1M:2C	90% 2M:1C	90% 1M:2C

Примечание. Черным цветом обозначено соотношение гомологов хромосом *Mus musculus* (M) к *M. caroli* (C) 4M : 1C, 5M : 1C, т. е. преобладание числа гомологов *M. musculus* над гомологами *M. caroli* или полное отсутствие гомологов *M. caroli* в большинстве клеток гибридного клона; темно-серым — соотношение 3M : 1C; серым — соотношение 2M : 1C; итриховкой — соотношение 1M : 2C или 1M : 3C соответственно, преобладание числа гомологов *M. caroli* над хромосомами *M. musculus*. ^а принцип выделения различных групп см. в разделе «Результаты». ^б H — хромосомы гибридных клонов, для которых, по данным микросателлитного анализа, отсутствовали маркеры гомологов *M. caroli*; в таких клонах гибридизацию *in situ* на эти хромосомы не проводили. В таблице содержатся данные по клеткам, относительное количество которых не ниже 20%; буквой O обозначено отсутствие Y-хромосомы.

соотношением различных хромосом *M. musculus* и *M. caroli*

10	11	12	13	15	16	17	18	19	X	Y
H	90%4M	H	H	83%3M-4M	H	H	60%5M-3M 20%4M:1C- 3M:1C	H	35% 2M : 1C 43% 1M : 1C	51% Y 34% YY
H	H	66% 3M : 1C	H	H	H	H	H	48%4M-2M 42%3M:1C	80% 2M : 1C	44% Y 32% YY
42%4M-3M 35%3M:1C	H	H	H	H	H	H	H	66%4M	80% 2M : 1C	54% Y 42% YY
H	H	53% 4M : 1C 18% 3M : 1C	86% 2M : 1C	H	22%4M-3M 43%4M:1C	H	68% 3M : 1C	H	61% 2M : 2C 27% 1M : 1C	76% Y 24% O
H	50%5M-3M 36%4M:1C	H	H	H	H	H	H	H	76% 2M : 1C 24% 2M	65% Y 19% YY
52% 2M : 1C 29% 2M : 2C	76% 3M : 1C	44% 2M : 2C 19% 2M : 1C	68% 2M : 1C	57% 2M : 1C	36%4M-3M 50%4M:2C	H	56% 3M : 1C	71%4M-3M	60% 1M : 1C 19% 2M	55% Y 32% YY
47% 2M : 1C 28% 1M : 2C	79% 3M : 1C	88% 3M : 1C	79% 1M : 2C	57%3M	71% 3M : 1C	H	68% 1M : 2C	54% 3M : 1C	79% 1M : 1C	50% Y 50% O
73% 2M : 2C	91% 3M : 1C	82% 3M : 1C	68% 2M : 2C	70% 2M : 2C	66% 3M : 1C	75%4M-3M	83% 2M : 2C	84% 3M : 1C	76% 1M : 1C	90% Y
H	H	91% 2M : 1C	38% 2M : 1C 27% 1M : 2C	65% 2M : 1C 21% 2M	76% 2M : 1C	100% 2M : 1C	86% 2M : 1C	68% 2M : 1C	90% 1M : 1C	66% Y 30% O
67% 2M : 1C	82% 3M : 1C	64% 2M : 1C	58% 2M : 1C 32% 1M : 1C	H	83% 2M : 1C	92% 2M : 1C	74% 2M : 1C	64% 2M : 2C 22% 2M : 1C	91% 1M : 1C	63% Y 37% O
44% 2M : 1C 25% 1M : 2C	93% 2M : 1C	91% 2M : 1C	79% 2M : 1C	75% 2M : 1C	79% 2M : 1C	100% 2M : 1C	97% 2M : 1C	91% 2M : 1C	94% 1M : 1C	100% O
67% 1M : 1C	H	85% 2M : 1C	85% 1M : 1C	70% 1M : 1C	73% 2M : 1C	88% 2M : 1C	92% 2M : 1C	80% 2M : 1C	100% 1M : 1C	85% Y
57% 1M : 1C	H	43% 2M : 1C 21% 1M : 2C	89% 1M : 1C	79% 1M : 1C	83% 2M : 1C	57% 2M : 1C 29% 1M : 1C	88% 2M : 1C	79% 2M : 1C	71% 1M : 1C	93% Y
87% 1M : 1C	80% 2M : 1C	67% 1M : 2C	86% 1M : 1C	H	93% 1M : 1C	60%2M 27% 1M:1C	93% 1M : 1C	93% 1M : 1C	93% 1M : 1C	100% O
50% 1M : 2C 20% 1M : 3C	64% 3M : 2C	42% 1M : 2C 27% 2M : 2C	48% 2M : 1C 44% 2M : 2C	38% 2M : 2C 22% 2M : 3C	80% 2M : 2C	72% 2M : 2C	67% 2M : 2C	76% 2M : 2C	45% 1M : 1C 36% 1M : 2C	100% O
62% 2M : 2C	57% 3M : 2C	H	81% 2M : 2C	55% 2M : 2C	70% 2M : 2C	76% 2M : 1C	86% 2M : 1C	73% 2M : 2C	92% 1M : 1C	96% O
44% 2M : 2C 28% 2M	80% 3M : 2C	72% 2M : 2C	74% 1M : 2C	66% 2M : 2C	76% 2M : 2C	74% 2M : 2C	53% 2M : 2C	60% 2M : 2C 20% 2M : 1C	69% 1M : 1C	94% O
61% 1M : 2C 33% 2M : 2C	78% 2M : 2C	57% 1M : 2C 26% 2M : 2C	97% 1M : 2C	97% 1M : 2C	80% 2M : 1C	92% 2M : 1C	83% 2M : 1C	88% 1M : 2C	88% 1M : 1C	74% YY 21% Y
93% 1M : 2C	60% 2M : 2C	53% 1M : 2C 31% 2M : 2C	61% 2M : 1C 23% 1M : 2C	71% 2M : 1C	69% 1M : 2C	100% 2M : 1C	91% 1M : 2C	44% 2M : 2C 31% 2M : 1C	80% 1M : 1C	97% Y
81% 2M : 2C	82% 1M : 3C	56% 2M : 2C 31% 1M : 2C	69% 1M : 3C	58% 2M : 2C 28% 2M : 1C	79% 2M : 1C	85% 2M : 1C	68% 2M : 2C	65% 2M : 2C	100% 1M : 1C	77% Y

использованием видоспецифичного зонда, идентифицирующего хромосомы *M. musculus*, и набор хромосомоспецифичных зондов. Этот метод позволил нам с надежностью идентифицировать родительские хромосомы в гибридных клетках и определить соотношение гомеологов хромосом, принадлежащих обоим партнерам по слиянию.

Материал и методика

Использовали 20 клонов межвидовых гибридных клеток серии НМС, полученных слиянием ЭСК *M. musculus* (*Mm*) линии НМ-1 и спленоцитов азиатской мыши *M. caroli* (*Mc*) (Матвеева и др., 2001). Получение и условия культивирования клонов гибридных клеток были описаны ранее (Серов и др., 2003; Matveeva et al., 2005). Препараты метафазных хромосом готовили по стандартной методике (Макгрегор, Варли, 1986) с небольшими модификациями. Анализ гибридных клонов проводили на 20—40 пассажах. За 2 ч до фиксации в культуральную среду добавляли колхицин (0.1 мкг/мл) и этидиум бромид (10 мг/мл). Гипотонию клеток проводили в 0.56%-ном растворе КС1, после чего фиксировали в смеси метанола с уксусной кислотой (3 : 1).

Идентификацию родительских хромосом осуществляли посредством двухцветной флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на метафазных хромосомах с хромосомо- и видоспецифичными зондами. В качестве видоспецифичного зонда использовали рекомбинантную плазмиду pMSat5, содержащую пять копий фрагмента сателлитной ДНК *M. musculus* (Rossant et al., 1983; Siracusa et al., 1983), любезно предоставленную д-ром Дж. Россант (J. Rossant, Монреаль, Канада). Плазмиду метили ботином при помощи ник-трансляции, как описано ранее (Пристяжнюк и др., 2005). Хромосомоспецифичные зонды, представленные материалом хромосом 1—7, 9—13, 15—19 и X соответственно, были мечены дигоксигенином посредством ПЦР (Пузаков и др., 2007).

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* проводили по стандартной методике в модификации Нестеровой (Nestorova et al., 1998). Препараты метафазных хромосом обрабатывали РНКазой в течение 1 ч при 37 °С. Денатурацию ДНК производили в 70%-ном формамиде при 75 °С в течение 3 мин. Зонд, имеющий средство к прицентромерным районам хромосом *M. musculus*, растворяли в гибридизационном буфере (50 % формамида, 10 % декстран сульфата в 2SSC), денатурировали при 95 °С 10 мин и помещали в лед. Хромосомоспецифичные пробы растворяли в гибридизационном буфере с 50—100-кратным избытком Cot1 ДНК мыши, денатурировали 10 мин при 95 °С, а затем выдерживали 30 мин при 37 °С. Обе пробы перемешивали, наносили на стекло и гибридизовали во влажной камере в течение ночи при 37 °С. Детекцию проводили на следующий день. Биотинилированные зонды визуализировали при помощи системы авидин—антиавидин-FITC, а дигоксигениновые — антидигоксигенином, конъюгированным с родамином. Препараты анализировали на микроскопе Axioscop 2 фирмы CARL ZEISS, оснащенном CCD-камерой VC-44 (PCO). Изображение обрабатывали с помощью пакета прикладных программ ISIS3 компании MetaSystems GmbH.

Использованы реагенты: авидин-FITC (Sigma, США), антиавидин-FITC (Vector Laboratories, США), антидигоксигенин-родамин (Roche, Швейцария), набор для ник-трансляции (Invitrogen, США), дигоксигенин (Roche

Laboratories, Швеция), РНКазы (Fermentas, США), формамид (Sigma, США), декстран сульфат (Ferak, Германия), DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, США).

Результаты

При получении клонов межвидовых гибридных клеток серии НМС в качестве партнеров по слиянию использовали ЭСК *M. musculus* и спленоциты азиатской мыши *M. caroli* — вида, близкого к *M. musculus*. Оба вида имеют морфологически сходный кариотип и сходный эмбриогенез, позволяющий получать химерных животных (Rossant et al., 1983). Гибридные клетки серии НМС сохраняли фенотип, сходный с ЭСК (Серов и др., 2003; Matveeva et al., 2005), а в тестах на плюрипотентность *in vivo* и *in vitro* обнаружили характеристики, сходные с ЭСК (Vasilkova et al., 2007).

Проведенный ранее анализ полиморфных микросателлитов, дискриминирующих гомологи, принадлежащие разным родительским видам, выявил в клонах гибридных клеток серии НМС присутствие маркеров всех хромосом *M. musculus* и вариабельность по присутствию маркеров хромосом *M. caroli*. Подсчет числа хромосом показал, что их набор в этих клонах варьировал от околодиплоидного до околотетраплоидного и существенно отличался от ожидаемого в случае слияния двух диплоидных клеток (Пристяжнюк и др., 2005). Таким образом, основываясь только на микросателлитном анализе и подсчете хромосом, трудно получить представление о реальном соотношении родительских хромосом в подобных клонах.

Как отмечалось выше, для идентификации каждой из родительских хромосом в гибридных клетках мы использовали двухцветную флуоресцентную гибридизацию *in situ* с видо- и хромосомоспецифичными пробами (см. рисунок). Сочетание одновременно двух окрасок позволило нам определить видовую принадлежность и число гомологов для большинства хромосом гибридных ЭСК, за исключением хромосом 8 и 14.

В таблице суммированы данные о соотношении родительских гомологов в клонах гибридных клеток. Основываясь на этих данных, все клоны серии НМС можно разделить на несколько групп.

1-я группа состоит из 5 клонов (НМС15, НМС47, НМС48, НМС54 и НМС58), в которых, по данным микросателлитного анализа, содержится от 2 до 8 хромосом *M. caroli*. Однако использование двухцветной гибридизации *in situ* показало, что большинство клеток этих клонов полностью утратило аутосомы *M. caroli*. При этом число копий гомологов *M. musculus* было от 3 до 5 на одну клетку. Единичные хромосомы *M. caroli* сохранялись лишь в небольшой доле исследованных клеток. X-хромосома *M. caroli*, на которую велся селективный отбор, сохранялась во всех клетках этих клонов, а общее соотношение родительских X-хромосом было представлено как две копии *M. musculus* к одной копии *M. caroli* (2M : 1C). Такое соотношение отличает данную группу клонов от остальных, в которых сохранилось лишь по одной копии X-хромосомы от каждого из родительских генов.

2-я группа включает в себя 3 клона (НМС23, НМС27 и НМС44). Для гибридных клеток этой группы клонов характерно соотношение 3M : 1C, т. е. три гомолога *M. musculus* на один гомолог *M. caroli* для большинства исследованных хромосом. При этом некоторые хромосомы, унаследованные от соматического партнера

(спленоцитов *M. caroli*), почти полностью сегрегировали. Например, хромосома 17 *M. caroli* потеряна практически во всех клетках клонов этой группы. Модальное число хромосом в клонах этих двух групп было околотетраплоидным (80 и 70 соответственно).

3-я группа содержит клоны НМС21, НМС42 и НМС56 с соотношением гомологов 2М : 1С для большинства из исследованных хромосом. Модальное число хромосом в этой группе околотриплоидное (59—65).

В 4-ю группу входят три «малохромосомных» клон (НМС50, НМС30 и НМС29) с модальным числом хромосом 45—55, в которых сегрегация гомологов прошла наиболее сильно, при этом активно терялись хромосомы обоих видов. Например, в клоне НМС29 для большинства из исследованных хромосом соотношение гомологов составляло 1М : 1С. Интересно, что во всех клетках клонов этой группы отсутствуют хромосомы 4, 6 и 7 соматических клеток, а следует отметить, что в хромосомах 4 и 6 локализуются такие гены, участвующие в поддержании плюрипотентного состояния, как *lin28*, *klf4* (хромосома 4) (Ema et al., 2008; Xu et al., 2009) и *nanog* (хромосома 6) (Mitsui et al., 2003).

К 5-й группе мы отнесли гибридные клоны НМС4, НМС6 и НМС41 также с равным содержанием гомологов для большинства исследованных хромосом. Однако, в отличие от предыдущей группы, модальное число хромосом в клетках этой группы осталось околотетраплоидным (70—80), т. е. гибридные клетки претерпели наименьшие изменения в первоначальном соотношении родительских хромосом. В этой группе также наиболее сильно проявилась тенденция к увеличению числа копий хромосом 1 и 11. Следует отметить, что и в других группах суммарное количество гомологов этой хромосомы, как правило, превышало среднее число других хромосом в клетке.

6-ю группу вошли клоны НМС1, НМС2 и НМС28, в которых для значительной части (7 из 17 хромосом) исследованных аутосом наблюдались сегрегация гомологов плюрипотентного партнера, в отличие от преимущественной потери соматических хромосом в гибридных клетках клонов других групп.

Обсуждение

Представленные результаты показали, что при гибридизации ЭСК *M. musculus* и спленоцитов *M. caroli* имеет место широкая вариабельность в соотношении индивидуальных хромосом, происходящих от разных партнеров по слиянию. Основываясь на относительном количестве гомологов хромосом плюрипотентного и дифференцированного партнеров по слиянию, мы условно разделили все клоны гибридных клеток на шесть групп, начиная от околотетраплоидных клонов, клетки которых имеют два набора хромосом *M. musculus* и единичные хромосомы *M. caroli*, до клонов с преобладанием гомологов хромосом *M. caroli*.

В группах 1 и 2 мы наблюдали преобладание гомологов плюрипотентного над гомологами соматического партнера в соотношении от 5М : 1С до 3М : 1С. Гомологи многих хромосом *M. caroli* были полностью утрачены или же сохранились лишь в единичных клетках. В особенности это характерно для 1-й группы клонов. Возникает вопрос: почему в результате гибридизации образовались клетки с подобным хромосомным составом? Это могло произойти путем слияния тетраплоидной ЭСК и

диплоидного спленоцита с последующей преимущественной потерей хромосом дифференцированного партнера. На это косвенным образом указывает факт наличия в первой группе клонов двух X-хромосом, происходящих от плюрипотентного партнера (кариотип XY), и двух Y-хромосом в большинстве клонов 1-й группы и в некоторых клонах 2-й группы. Как известно из работ, выполненных на соматических клетках, при гибридизации клеток с разной ploidyностью сегрегации подвергаются хромосомы родительской клетки с меньшей ploidyностью (Рингерц, Сэвидж, 1979; Graves, 1984). Сходный результат может быть получен при слиянии двух ЭСК с одним спленоцитом. Однако, несмотря на то что в обеих группах (1 и 2) гибриды, очевидно, образовались путем слияния тетраплоидного генома *M. musculus* и диплоидного *M. caroli*, в 1-й группе клонов сегрегировал почти весь геном *M. caroli*, а во второй группе остался целый набор хромосом, происходящий от этого партнера. Причиной интенсивной сегрегации гомологов соматического партнера может быть несоответствие стадий и длительности клеточных циклов сливающихся клеток. Это может приводить к преждевременной конденсации хроматина и другим нарушениям в митозе и как следствие — к потере хромосом клеток с более длительным клеточным циклом (Рингерц, Сэвидж, 1979). Те же факторы, очевидно, играют роль и при сегрегации хромосом в других группах гибридных клонов (группах 3—6), образованных, по всей вероятности, слиянием двух диплоидных клеток.

Известно, что при гибридизации клеток с разным уровнем дифференцировки, как правило, сегрегации подвергаются хромосомы клетки, обладающей наименьшим потенциалом развития (Рингерц, Сэвидж, 1979; Матвеева и др., 2001). Для клонов серии НМС также характерна предпочтительная потеря хромосом соматического партнера, однако для единичных хромосом в клонах 2—5-й групп мы наблюдали потерю гомологов плюрипотентного партнера. А в клонах, которые мы объединили в 6-ю группу, потеря гомологов плюрипотентного партнера наблюдалась для значительной части хромосом. Этот факт отмечен нами впервые и, возможно, свидетельствует о выравнивании эпигенетического статуса хромосом родительских видов.

При исследовании хромосомного состава полученных гибридных клонов мы, кроме того, выявили изменения, обычно сопутствующие длительно культивируемым ЭСК. Так, во всех без исключения клонах серии НМС сегрегировала одна (или две — в случае групп 1 и 2) X-хромосома *M. caroli*, а в большинстве клонов 3-й и 5-й групп терялась Y-хромосома. Известно, что потеря одной из X-, а также и Y-хромосом является частым событием при культивировании ЭСК (Sugawara et al., 2006). Помимо этого, в большинстве клонов мы наблюдали избыточное накопление хромосомы 1 и особенно 11. Согласно данным ряда исследователей (Liu et al., 1997; Matveeva et al., 1998; Sugawara et al., 2006), увеличение числа копий хромосомы 11 является частым нарушением кариотипа при культивировании большинства линий ЭСК. Использование хромосомоспецифичных проб также позволило нам выявить в клетках некоторых клонов ряд крупных хромосомных перестроек, накопление которых обычно сопутствует длительно культивируемым линиям ЭСК (Longo et al., 1997).

Таким образом, подробный цитогенетический анализ полученных гибридных клонов показал, что количество и соотношение гомологов родительских хромосом в них существенно отличаются от ожидаемых в результате слия-

ния двух диплоидных клеток. Показано, что на фоне интенсивной преимущественной потери хромосом соматического партнера в большинстве клонов имела место двухсторонняя сегрегация гомологов как дифференцированного, так и плюрипотентного партнеров. Кроме того, в ряде клонов выявлена обратная сегрегация хромосом в пользу утраты гомологов плюрипотентного партнера.

Тем не менее следует отметить, что все исследованные клоны сохраняли фенотип и свойство плюрипотентных ЭСК, экспрессировали маркеры плюрипотентности (Oct и Nanog) с обеих родительских аллелей и демонстрировали плюрипотентность в опытах *in vivo* по получению химер и тератом (Пузаков и др., 2006; Vasilkova et al., 2007). Таким образом, различия в числе соматических хромосом и соотношении родительских гомологов не оказывают критического влияния на проявление гибридными ЭСК свойств плюрипотентности. Исследование подобных гибридов представляется чрезвычайно интересным в плане разработки новых модельных систем для изучения механизмов цис- и трансвзаимодействий геномов в гибридном ядре или гетерокарионе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00825).

Список литературы

- Макгрегор Г., Варли Дж. 1986. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир. 272 с.
- Матвеева Н. М., Кузнецов С. Б., Кафтановская Е. М., Серов О. Л. 2001. Сегрегация родительских хромосом в гибридных клетках, полученных от слияния эмбриональных стволовых и дифференцированных клеток взрослого животного. Докл. РАН. 379 (1) : 118—120.
- Матвеева Н. М., Шилов А. Г., Байбородин С. И., Филимоненко В. В., Ролинская И. В., Серов О. Л. 1996. Гибриды между эмбриональными стволовыми и соматическими клетками сохраняют плюрипотентность. Докл. РАН. 349 (1) : 129—132.
- 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. Р., Серов О. Л. 2006. Изучение репрограммирования X-хромосом спленоцитов в эмбриональных гибридных клетках. Цитология. 48 (9) : 795.
- Пузаков М. В., Баттулин Н. Р., Темирова С. А., Матвеева Н. М., Сердюкова Н. А., Графодатский А. С., Серов О. Л. 2007. Анализ экспрессии родительских аллелей Xist и Glx в межвидовых эмбриональных гибридных клетках в условиях индуцированной *in vitro* инактивации X-хромосом. Онтогенез. 38 (2) : 1—8.
- Рингерц Н., Сэвидж Р. 1979. Гибридные клетки. М.: Мир. 415 с.
- Серов О., 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 генов в эмбриональных гибридных клетках. Онтогенез, 34 (3) : 229—240.
- Ambrosio D. J., Rasmussen T. P. 2005. Reprogramming mediated by stem cell fusion. J. Cell. Mol. Med. 9 : 1—10.
- Ema M., Mori D., Niwa H., Hasegawa Y., Yamanaka Y., Hitoishi S., Mimura J., Kawabe Y., Hosoya T., Morita M., Shimosato D., Uchida K., Suzuki N., Yanagisawa J., Sogawa K., Rossant J., Yamamoto M., Takahashi S., Fujii-Kuriyama Y. 2008. Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. Cell Stem Cell. 3 : 555—367.
- Graves J. A. 1984. Chromosome segregation from cell hybrids. I. The effect of parent cell ploidy on segregation from mouse—Chinese hamster hybrids. Can. J. Genet. Cytol. 26 : 557—563.
- Jaenisch R., Eggan K., Humpherys D., Rideout W., Hochedlinger K. 2002. Nuclear cloning, stem cells and genomic reprogramming. Cloning Stem Cells. 4 : 389—396.
- 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.
- Longo L., Bygrave A., Grosveld F. G., Pandolfi P. P. 1997. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. Transgenic Res. 6 : 321—328.
- Матвеева Н. М., Пристяжнюк И. Е., Темирова С. А., Мензоров А. Г., 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.
- Матвеева Н. М., Шилов А. Г., Кафтановская Е. М., 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 cell splenocytes. Mol. Reprod. Develop. 50 : 128—138.
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell. 113 : 631—662.
- Mullins L., Wilmut I., Mullins J. 2004. Nuclear transfer in rodents. J. Physiol. 554 : 4—12.
- 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.
- Rossant J., Vijn M., Siracusa L. D., Chapman V. M. 1983. Identification of embryonic cell lineages in histological sections of *M. musculus* in-equilibrium *M. caroli* chimaeras. J. Embryol. Exp. Morphol. 73 : 179—191.
- Siracusa L. D., Chapman V. M., Bennet K. L., Hastie N. D., Pietras D. F., Rossant J. 1983. Use of repetitive DNA sequences to distinguish *Mus musculus* and *Mus caroli* cells by *in situ* hybridization. J. Embryol. Exp. Morphol. 73 : 163—178.
- Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y., Sofuni T., Ito T. 2006. Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan. Comp. Med. 56 : 31—34.
- Sullivan S., Pells S., Hooper M., Gallagher E., McWhir J. 2006. Nuclear reprogramming of somatic cells by embryonic stem cells is affected by cell cycle stage. Cloning Stem Cells. 8 : 174—188.
- Tada M., Morizane A., Kimura H., Kawasaki H., Ainscough J. F., 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.
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Meyer E. M., Petersen B. E., Scott E. W. 2002. Bone marrow cell adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature. 416 : 542—545.
- Vasilkova A. A., Kizilova H. A., Puzakov M. V., Shilov A. G., Zhelezova A. I., Golubitsa A. N., Battulin N. R., Vedernikov V. E., Menzорова А. Г., Матвеева Н. М., Серов О. Л. 2007. Dominant manifestation of pluripotency in embryonic stem cell hybrids with various numbers of somatic chromosomes. Mol. Reprod. Develop. 74 : 941—951.
- Vassilopoulos G., Wang P. R., Russell D. W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. Nature. 422 : 901—904.
- Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimiy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. Nature. 422 : 897—901.

Wilmot I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385 : 810—813.

Xu B., Zhang K., Huang Y. 2009. Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA*. 15 : 357—361.

Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P., Smith A. G. 2002. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 416 : 485—487.

Поступила 2 IV 2009

ANALYSIS OF CHROMOSOME COMPOSITION IN INTERSPECIFIC EMBRYONIC STEM HYBRID CELLS OF MICE

I. E. Pristyazhnyuk,¹ N. M. Matveeva, A. S. Graphodatsky, N. A. Serdukova, O. L. Serov

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk;

¹ e-mail: iprist@ngs.ru

Chromosome complements of twenty hybrid clones obtained by fusion of *Mus musculus* embryonic stem cells (ESC) and *M. caroli* splenocytes were studied. Using of double-color *in situ* hybridization with chromosome- and species-specific probes we were able to detect the parental origin for each chromosome in hybrid cells. Based on parental chromosome ratio, all 20 hybrid clones were separated in some different groups: from the group containing practically tetraploid *M. musculus* genome with single *M. caroli* chromosomes to hybrids with dominance of *M. caroli* chromosome homologues. In 8 hybrid cells clones we observed prevalence of chromosomes originated from ESC in ratio from 5 : 1 to 3 : 1. Another hybrid cells clones have either equal (1 : 1, 1 : 2) ratio of *M. musculus* to *M. caroli* chromosomes or with the prevalence of ESC- (2 : 1) or splenocyte- (1 : 2) originated parental chromosome homologues. In 3 hybrid cells clones, we observed preferable segregation of ESC-originated pluripotent chromosomes. This phenomenon was found for the first time and it possibly indicates compensation of the epigenetic differences between parental chromosomes of ESC- and splenocyte -origination.

Key words: embryonic stem hybrid cells, double-color *in situ* hybridization, chromosome homologues, ploidy, segregation of chromosomes.