

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В РАЗВИТИИ И ПРИ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

УДК 575.16

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РОДИТЕЛЬСКИХ АЛЛЕЛЕЙ *Xist* И *Gla* В МЕЖВИДОВЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ *in vitro* ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМ

© 2007 г. М. В. Пузаков, Н. Р. Баттулин, С. А. Темирова,
Н. М. Матвеева, Н. А. Сердюкова, А. С. Графодатский, О. Л. Серов

Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 Новосибирск, пр-т Лаврентьева, д. 10

E-mail: serov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.05.06 г.

Гибридизация *in situ* с использованием меченых видоспецифичного и специфичного для X-хромосомы зондов показала, что в гибридных клетках, полученных путем слияния эмбриональных стволовых клеток *Mus musculus* (генотипа XY) и спленоцитов самки *Mus caroli*, присутствуют две родительские X-хромосомы. В пяти клонах гибридных клеток через образование *in vitro* эмбрионидных телец была индуцирована дифференцировка, процесс которой сопровождался инактивацией в клетках одной из X-хромосом. С помощью обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции мы провели анализ экспрессии аллелей генов *Xist* и *Gla* в эмбрионидных тельцах с учетом того, что экспрессия локуса *Xist* является одним из ключевых событий инактивации X-хромосом, а ген *Gla* использован в качестве маркера активной X-хромосомы. Идентификация аллельных транскриптов локусов *Xist* и *Gla* была основана на обнаруженном нами рестрикционном полиморфизме между *M. musculus* и *M. caroli*. Установлено, что в эмбрионидных тельцах всех исследованных гибридных клонов присутствуют транскрипты обоих родительских аллелей как локуса *Xist*, так и гена *Gla*. Не обнаружено признаков предпочтительной инактивации X-хромосомы *M. musculus* или *M. caroli* в тестированных эмбриональных гибридных клетках, несмотря на первоначальные различия в онтогенетическом статусе между X-хромосомами эмбриональных стволовых клеток и спленоцитов.

Ключевые слова: X-хромосомы, инактивация X-хромосом, эмбриональные стволовые клетки, эмбриональные гибридные клетки, дифференцировка.

Известно, что эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают высокими перспективными потенциальными способностями дифференцироваться как *in vitro*, так *in vivo* во все типы специализированных соматических клеток и гаметы (Hogan et al., 1994; Smith, 2001; Hübner et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004). Потенциал ЭСК сохраняется в гибридных клетках, полученных слиянием ЭСК с клетками взрослого животного (Матвеева и др., 1996; Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001, 2003; Cowan et al., 2005) или незрелыми гемопоэтическими и нейральными клетками (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Do, Schöler, 2004). Более того, под влиянием генома ЭСК в гибридных клетках наблюдаются процессы репрограммирования отдельных хромосом или всего генома, привнесенного дифференцированными клетками. Таким образом, эмбриональные гибридные клетки можно рассматривать как новый экспериментальный подход к восстановлению потенциалов дифференцированных клеток путем репрограммирования их генома (Matveeva et al.,

1998; Ambrosi, Rasmussen, 2005; Cowan et al., 2005). Однако репрограммирующая способность эмбриональных гибридных клеток недостаточно охарактеризована, и анализ ее ограничивается примерами реактивации отдельных генов генома дифференцированных клеток (Tada et al., 2001, 2003; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Do, Schöler, 2004). Наше внимание привлекли сообщения об активном состоянии X-хромосом в эмбриональных гибридных клетках, полученных путем слияния ЭСК генотипа XY с соматическими клетками генотипа XX или XY (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001; Kimura et al., 2002; Farivar et al., 2004). Известно, что гибридные клетки, так же как и ЭСК, способны образовывать *in vitro* эмбрионидные тельца (ЭТ), в которых активно происходят процессы дифференцировки, включая инактивацию одной из X-хромосом (Rastan, 1985; Matveeva et al., 1998; Wutz, Jaenisch, 2000; Farivar et al., 2004). Недавно мы описали хромосомный состав 20 гибридных клонов, полученных слиянием ЭСК *M. musculus* со спленоцитами *M. caroli*, большин-

ство из которых содержали X-хромосомы обоих родительских видов (Пристяжнюк и др., 2005; Matveeva et al., 2005). Таким образом, появляется возможность исследовать экспрессию аллелей родительских X-хромосом в условиях индуцированной *in vitro* дифференцировки. Такой подход позволяет выяснить, случайно или неслучайно происходит инактивация X-хромосом, различавшихся своим онтогенетическим статусом до момента образования гибридных клеток. Представляется, что это более масштабный тест для оценки репрограммирования, поскольку инактивация оценивается, хотя и на уровне отдельных генов, но тем не менее характеризует состояние целой хромосомы. Уместно также подчеркнуть, что инактивация X-хромосом у естественных гибридов F₁, полученных от скрещивания *M. musculus* с *M. caroli*, осуществляется случайным образом (Charman, Shows, 1976).

Наше сообщение посвящено анализу экспрессии генов *Xist* (кодирует специфический транскрипт неактивной X-хромосомы) и *Gla* (кодирует α -галактозидазу) в условиях индуцированной *in vitro* дифференцировки эмбриональных гибридных клеток типа ЭСК *M. musculus*–спленоцит *M. caroli*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культуры клеток. В работе использовали ЭСК *M. musculus*, линию НМ-1 (Magin et al., 1992) и 20 клонов гибридных клеток серии НМС, полученных слиянием клеток НМ-1 со спленоцитами взрослой самки *M. caroli*. Условия получения и культивирования гибридных клеток описаны ранее (Серов и др., 2003; Matveeva et al., 2005).

Идентификация X-хромосом *M. musculus* и *M. caroli* в эмбриональных гибридных клетках. Идентификацию родительских X-хромосом в гибридных клетках серии НМС проводили с помощью гибридизации *in situ* с использованием видоспецифичного ФИТЦ-меченного зонда pMSat5, который дает сильный сигнал над центромерами хромосом *M. musculus*, но не *M. caroli* (Пристяжнюк и др., 2005; Matveeva et al., 2005), и меченного дигоксигенином X-хромосомспецифичного зонда, “раскрашивающего” (painting) X-хромосомы обоих видов. Биотинилирование видоспецифичного зонда pMSat5 и условия гибридизации *in situ* описаны ранее (Matveeva et al., 2005).

Сортировку и амплификацию сортированных хромосом мыши с помощью DOP-(degenerated oligonucleotide primer) полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили сотрудники Университета Кембриджа по методу, описанному ранее (Telepius et al., 1992; Yang et al., 2000). Конечным продуктом являлись так называемые DOP-библиотеки. Библиотека сортированных X-хромосом мы-

ши была реамплифицирована с помощью ПЦР в 18 циклах. Условия реамплификации: 1 мкл DOP-библиотеки добавляли к 20 мкл ПЦР-смеси: 10 mM *tris*-HCl, pH 8.3; 250 мкМ смеси нуклеотидов дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ; 2 мкМ DOP-праймера; 2.5 mM MgCl₂ и 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили в режиме: денатурация 94°C – 1 мин; отжиг 56°C – 1 мин; элонгация цепей при 72°C – 2 мин и завершающая элонгация цепей при 72°C – 8 мин. Мечение библиотеки X-хромосомы мыши проводили с помощью ПЦР, как описано выше, но использовали дТТФ и дигоксигенин-11-дУТФ в соотношении 2 : 1.

X-хромосомспецифичный зонд растворяли в гибридизационном буфере (2 мкл зонда и 15 мкл гибридизационного буфера на стекло). Денатурацию зонда производили при 95°C в течение 6 мин, затем при 37°C в течение 1 ч, а детекцию – смешиванием антидигоксигенин–родамина и ФИТЦ–авидина, после чего смесь наносили по 20 мкл на одно покровное стекло и инкубировали 40 мин во влажной камере при 37°C. Отмывали в 4 × SSC, содержащем 0.1%-ный Tween 20, три раза по 2 мин при 37°C. Обезвоживали последовательно в спиртах и высушивали при комнатной температуре. Хромосомы подкрашивали в растворе DAPI, отмывали в 2 × SSC, затем в воде. Препараты высушивали при комнатной температуре; под покровное стекло наносили по 5 мкл раствора антифейда.

Препараты анализировали на микроскопе Axioskop 2 (“K. ZEISS”, Германия). Ввод цифровой информации производили с помощью CCD-камеры VC-44 (PCO). Изображение обрабатывали с помощью пакета прикладных программ ISIS3 (*In situ* Imaging System), “MetaSystems GmbH”, Германия.

Получение ЭТ из гибридных клеток. Культуры гибридных клеток трипсинизировали (0.025%-ный трипсин, 0.037%-ный ЭДТА на фосфатном буфере в модификации Дульбекко, “Sigma”, США) и суспендировали стандартным способом. Клеточную суспензию высевали на обработанные 1%-ной агарозой чашки в ростовую среду, не содержащую подавляющего дифференцировку фактора LIF. ЭТ формировались на 4–5-е сут культивирования, а на 9–12-е их анализировали (Robertson, 1987; Matveeva et al., 1998).

Выделение геномной ДНК и секвенирование фрагментов генов *Xist* и *Gla* *M. caroli*. ДНК гибридных клонов и родительских клеток выделяли с помощью DNAzol (“Life Technologies”, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Из тканей мышей линии 129/Ola и *M. caroli* ДНК выделяли фенол-хлороформным методом.

Фрагменты генов *Xist* и *Gla* *M. caroli* подвергали амплификации с помощью ПЦР. Реакцию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл,

Таблица 1. Условия проведения обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции генов *Actb*, *Xist* и *Gla* в эмбриональных стволовых и гибридных клетках

Ген	Последовательность праймера	Длина фрагмента, п.н.		Концентрация MgCl ₂ , mM	Температура отжига, °C
		геномной ДНК	кДНК		
<i>Actb</i>	5'- ACGCACGATTTCCCTCTCAGC-3'	913	459	2.0	58
	5'- GGCCAGAGCAAGAGAGGTATCC-3'				
<i>Xist</i>	5'- ATCTAAGACAAAATACATCATTCCTG-3'	250	250	3.0	55
	5'- CTTGGACTTAGCTCAGGTTTTGTGTC-3'				
<i>Gla</i>	5'- GTTCATGCAGATGGCAGAGC-3'	1234	318	2.5	58
	5'- CAGTGACAACCATCAAATTTTAGC-3'				

содержащей: ПЦР-буфер (65 mM *tris*-HCl, pH 8.8; 16 mM (NH₄)₂SO₄ и 0.01%-ный Tween 20); от 2.0 до 3.0 mM MgCl₂; по 0.2 mM каждого дезокси-нуклеотида (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ); по 1 мкМ прямого и обратного праймеров. Описание праймеров дано в табл. 1. В реакционную смесь затем добавляли 0.5 ед. Taq-полимеразы и 0.5–1.0 мкг геномной ДНК *M. caroli*. Условия проведения ПЦР на автоматическом амплификаторе РТС-100 (“MJ Research Inc.”, США): денатурация ДНК при 95°C – 3 мин с последующей амплификацией (30 циклов); денатурация при 95°C – 30 с; отжиг праймеров при температуре, указанной в таблице, – 30 с; элонгация при 72°C – 30 с. После циклической амплификации проводили элонгацию при 72°C в течение 3 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 3–4%-ном агарозном геле в буфере *tris*-ЭДТА-борат.

Полученные продукты ПЦР очищали путем выделения из геля с помощью Concert Gel Extraction Systems (“Life Technology”, США) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили с помощью BigDye Terminator Ready Reaction Kit 3.0 (“Pelkin Elmer”, США) на ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer с использованием меченных флуорохромами ддНТФ (ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0). Секвенирование проводили в Центре коллективного пользования “Секвенирование ДНК” СО РАН. Данные по секвенированию фрагмента 2–3 экзонов гена *Gla* и экзона 7 локуса *Xist* зарегистрированы в GenBank (№ DQ218140 и DQ218138 соответственно).

Выделение РНК и анализ транскриптов генов *Xist* и *Gla* с помощью обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Суммарную РНК из ЭСК, ЭТ и тканей взрослых мышей выделяли с помощью Trizol Reagent (“Life Technology”, США) согласно протоколу производителя.

Для синтеза кДНК использовали набор реактивов Reverse Transcription System (“Promega”,

США) после предварительной обработки РНК ДНКазой I, (“Sigma Aldrich”, США) с использованием случайных праймеров. Амплификацию транскриптов генов *Xist* и *Gla* с кДНК проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров (табл. 1) и условий, описанных выше.

Рестрикционный анализ проводили с использованием наборов эндонуклеаз рестрикции *Dra*I и *Hin*I (“СибЭнзим”) согласно рекомендациям производителя и 5 ед. фермента в 20 мкл реакционной смеси, которую инкубировали в течение 2 ч при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 18 клонах гибридных клеток серии НМС были идентифицированы родительские X-хромосо-

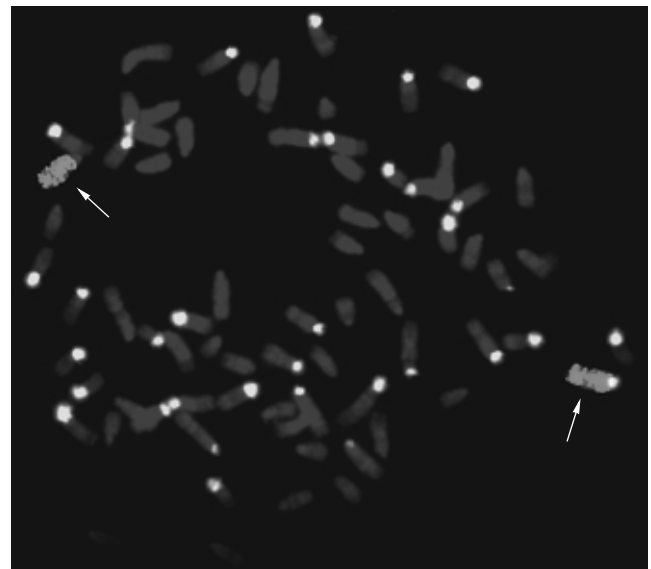


Рис. 1. Метафазные хромосомы клетки НМС41 после гибридизации *in situ* с использованием двухцветной метки: красным окрашиваются X-хромосомы, а зеленым – центромеры хромосом *M. musculus*, но не *M. caroli*. Стрелками указаны X-хромосомы *M. musculus* (справа) и *M. caroli* (слева).

Таблица 2. Соотношение родительских X-хромосом в клонах эмбриональных гибридных клеток НМС1, НМС28, НМС29, НМС41 и НМС56

Клеточные гибриды	Число анализируемых пластинок	Клетки с копиями X-хромосом		Клетки с одной X-хромосомой <i>M. musculus</i>
		три (две – <i>M. musculus</i> , одна – <i>M. caroli</i>)	два (по одной <i>M. musculus</i> и <i>M. caroli</i>)	
НМС1	35	–	28 (80)	7 (20)
НМС28	28	–	28 (100)	–
НМС29	16	–	16 (100)	–
НМС41	40	3 (8)	37 (92)	–
НМС56	41	–	37 (90)	4 (10)

Примечание: в скобках – %.

мы с помощью “двухцветной” гибридизации *in situ*, в результате которой X-хромосомы *M. musculus* и *M. caroli* окрашивались в красный цвет, а в X-хромосоме *M. musculus* дополнительно присутствовал сигнал зеленого цвета над центромерой (рис. 1). Таким образом, хромосомспецифичный зонд позволил определить общее число X-хромосом в гибридной клетке, а видоспецифичный позитивный сигнал над центромерой X-хромосомы *M. musculus* – надежно дискриминировать ее от X-хромосомы *M. caroli* (рис. 1). При слиянии клеток НМ-1 *M. musculus* генотипа XY со спленоцитами взрослой самки *M. caroli* в гибридной клетке ожидается присутствие трех X-хромосом, две из которых принадлежат *M. caroli* и одна – *M. musculus*. Однако в большинстве изученных клонов клетки содержали две X-хромосомы – по одной *M. musculus* и *M. caroli*. Мы отобрали пять гибридных клонов, в которых содержание двух родительских X-хромосом в большинстве клеток было близко к 1 : 1, хотя в клонах НМС1 и НМС56 присутствовало небольшое количество клеток с одной X-хромосомой *M. musculus* (без *M. caroli*), а в клоне НМС41 – с двумя X-хромосо-

мами *M. musculus* и одной *M. caroli* (табл. 2). Эти клоны были использованы для индукции в них дифференцировки через образование ЭТ. Следует заметить, что отобранные клоны имели разное число аутосом: клон НМС29-3 был околодиплоидным, НМС28 и НМС56 – околотриплоидными, а НМС1 и НМС41 – триплоидно-тетраплоидными (Присяжнюк и др., 2005; Matveeva et al., 2005).

Как упоминалось выше, для описания процесса инактивации X-хромосом в ЭТ мы использовали два маркерных гена – *Gla* и *Xist*, первый из которых является маркером активной X-хромосомы (причем только в ЭСК, в спленоцитах он неактивен), тогда как второй – не только маркером неактивной X-хромосомы, но и ключевым элементом самого процесса инактивации. Для дискриминации транскриптов родительских аллелей генов *Gla* и *Xist* использовали обнаруженный нами рестрикционный полиморфизм между *M. musculus* и *M. caroli* (рис. 2). Аллели гена *Gla* у *M. musculus* и *M. caroli* различаются по наличию сайта для эндонуклеазы рестрикции *HinfI* у *M. caroli*, отсутствующего у *M. musculus*. Аллели гена *Xist* у *M. musculus* и *M. caroli* различаются по

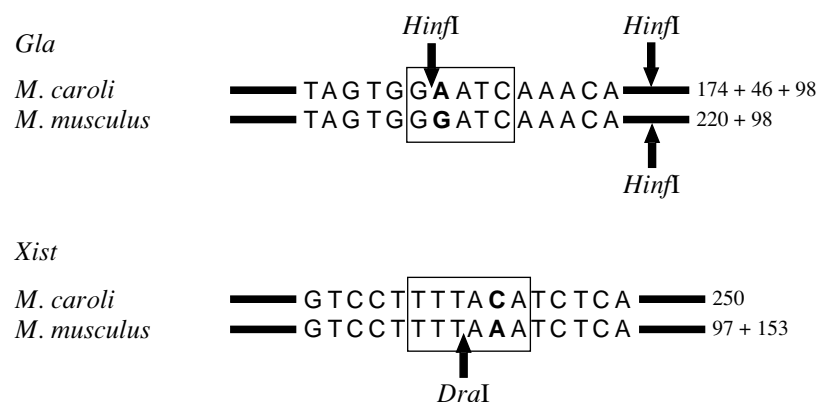


Рис. 2. Аллельспецифичные сайты для рестриктаз: *HinfI* в гене *Gla* и *DraI* – в локусе гена *Xist* у мышей *M. caroli* и *M. musculus*. Слева – ожидаемые размеры фрагментов ДНК после обработки рестриктазами продуктов ПЦР, п.н.

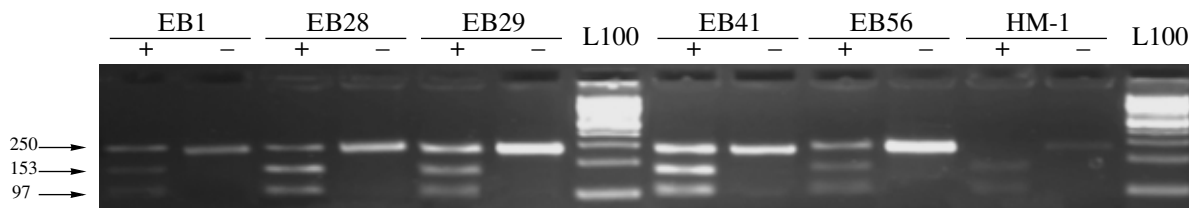


Рис. 3. Экспрессия аллелей *M. caroli* и *M. musculus* гена *Xist* в эмбрионных тельцах EB1, EB28, EB29, EB41, EB56, образовавшихся из клеток клонов НМС1, НМС28, НМС29, НМС41 и НМС56, и из эмбриональных стволовых клеток НМ-1.

“+”, “-” – наличие или отсутствие обработки ПЦР-продуктов рестриктазой *DraI*. L100 – молекулярный маркер с шагом 100 п.н.; слева – размеры фрагментов до и после рестриктазной обработки, п.н.

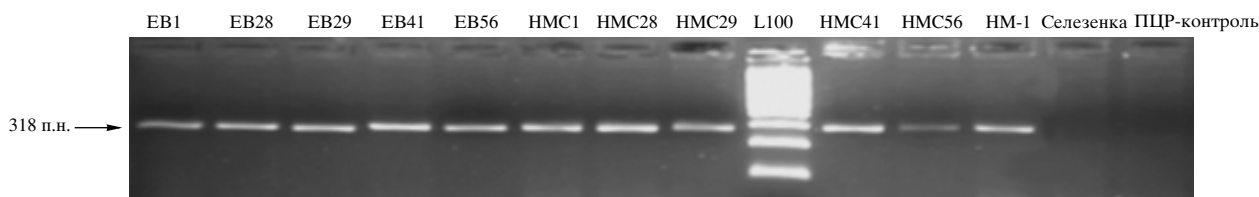


Рис. 4. Результаты анализа экспрессии гена *Glu* с помощью обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции в гибридных кломах НМС1, НМС28, НМС29, НМС41 и НМС56 и в эмбрионных тельцах (EB1, EB28, EB29, EB41, EB56), образовавшихся из клеток этих клонов. Видно, что экспрессия гена *Glu* отсутствует в селезенке, тогда как в эмбриональных стволовых клетках (НМ-1) она высокая. Слева указан ожидаемый размер фрагмента; L100 – см. на рис. 3.

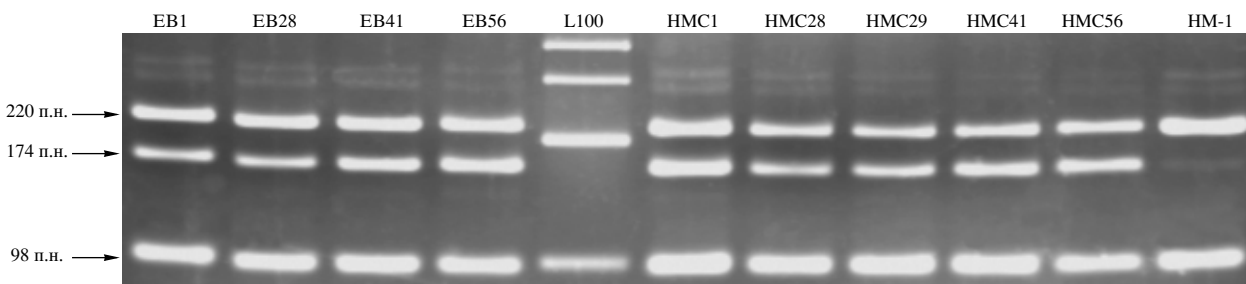


Рис. 5. Результаты анализа транскрипции аллелей гена *Glu* с помощью обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции в гибридных кломах НМС1, НМС28, НМС29, НМС41, НМС56 и в эмбрионных тельцах (EB1, EB28, EB41, EB56), образовавшихся из клеток этих клонов.

НМ-1 – эмбриональные стволовые клетки. Присутствие ПЦР-продукта размером 220 п.н. маркирует активность аллеля *M. musculus*, а размером 174 п.н. – экспрессию аллеля *M. caroli*; фрагмент размером 98 п.н. образуется при обработке ПЦР-продуктов обоих аллелей рестриктазой *HinfI*. L100 – см. на рис. 3.

наличию сайта для эндонуклеазы рестрикции *DraI* у *M. musculus*, не выявленного у *M. caroli*.

Анализ транскрипции родительских аллелей генов *Glu* и *Xist* проводили в ЭТ EB1, EB28, EB29, EB41 и EB56, полученных из суспензионных культур гибридных клонов НМС1, НМС28, НМС29, НМС41 и НМС56 соответственно (рис. 3, 4). На рис. 3 представлены результаты анализа ОТ-ПЦР экспрессии гена *Xist* в ЭТ, где видно, что экспрессия гена *Xist* обнаруживается во всех ЭТ и существенно выше, чем в клетках НМ-1. Следовая активность гена *Xist* обусловлена эффектом дистального промотора, при котором продукты

транскрипции нестабильны. Обработка ферментом *DraI* продуктов амплификации с кДНК гена *Xist* выявила экспрессию обоих аллелей гена *Xist* во всех исследованных ЭТ, о чем свидетельствует появление фрагментов размером 130 и 118 п.н., маркирующих активность аллеля *M. musculus*, и фрагмента размером 248 п.н., маркирующего активность аллеля *M. caroli* (рис. 3). Судя по визуальной оценке, соотношение транскриптов обоих аллелей соответствует примерно 1 : 1 без признаков преобладания какого-либо из них (рис. 3).

При анализе экспрессии гена *Glu* в пяти исследованных гибридных кломах, в ЭТ, полученных

из клеток этих клонов, и в ЭСК транскрипты этого гена были обнаружены, тогда как в спленоцитах – нет (рис. 4). Отсутствие экспрессии *Gla* в клетках селезенки было показано ранее Фриманом и др. (Freeman et al., 1998). Обработка продуктов ОТ-ПЦР эндонуклеазой рестрикции *HinfI* показала, что во всех исследованных клеточных гибридах и полученных из них ЭТ наблюдается высокая активность обоих родительских аллелей гена *Gla*, по визуальной оценке, примерно в равном соотношении (рис. 5). Этот вывод основан на присутствии фрагментов в 220 и 174 п.н., маркирующих аллели *M. musculus* и *M. caroli* соответственно (рис. 5).

В целом полученные данные указывают на случайную инактивацию X-хромосом *M. musculus* и *M. caroli* в гибридных клетках в ходе индуцированной *in vitro* дифференцировки, поскольку ни в одном из тестируемых клонов мы не обнаружили признаков видимой предпочтительной экспрессии аллелей генов *Gla* или *Xist* одной из родительских X-хромосом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что гены *Gla* и *Xist* локализованы в X-хромосоме и профиль их экспрессии меняется в процессе инактивации X-хромосом. Прямым маркером инактивации является наличие транскриптов гена *Xist*, который кодирует нетранслируемую РНК и экспрессируется с неактивной X-хромосомы. Более того, транскрипция гена *Xist* необходима для инициации инактивации (Lee, Jaenisch, 1997). В ЭСК (генотипов XX и XY) транскрипты гена *Xist* нестабильны, присутствуют в незначительных количествах и контролируются дистальным промотором (Panning et al., 1997), тогда как в дифференцированных клетках этот ген транскрибируется на высоком уровне с неактивной X-хромосомы и регулируется проксимальным промотором (Avner, Heard, 2001). Таким образом, сравнение экспрессии аллелей гена *Xist* потенциально позволяет получить представление о случайном или неслучайном характере инактивации тестируемых гомологов X-хромосом в ходе дифференцировки *in vitro* гибридных клеток.

Прежде чем перейти к обсуждению полученных результатов, необходимо вкратце описать судьбу родительских X-хромосом при формировании и культивировании эмбриональных гибридных клеток. На момент слияния ЭСК *M. musculus* (XY) со спленоцитами самки *M. caroli* генотип гибридных клеток представлен тремя X-хромосомами. Активная X-хромосома *M. caroli* должна обеспечить выживание гибридных клеток в селективной среде ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин), поскольку X-хромосома клеток линии НМ-1 несет мутантный аллель гена *Hprt*, кодирующего гипоксантинфосфорибозил-

трансферазу (Magin et al., 1992), а аллели дикого типа присутствуют в X-хромосомах *M. caroli*. Однако, как показал цитогенетический анализ с применением двойной метки, большинство исследованных клонов серии НМС содержали одну из двух X-хромосом спленоцитов вместо ожидаемых двух. Известно, что все соматические диплоидные клетки самок млекопитающих имеют по одной активной и неактивной X-хромосоме. Таким образом, при слиянии спленоцитов с ЭСК гибридный геном первоначально содержит две X-хромосомы *M. caroli*, одна из которых в ходе культивирования гибридных клеток была потеряна. Учитывая, что поздняя репликация неактивной X-хромосомы может стать фактором ее предпочтительной сегрегации из гибридных клеток, можно предположить, что именно эта X-хромосома спленоцитов была потеряна. К сожалению, мы не имели возможности маркировать X-хромосомы спленоцитов *M. caroli*, поэтому об этом можно судить только предположительно.

Если взять за основу вариант, когда в гибридных клетках сохранилась активная X-хромосома спленоцитов *M. caroli*, то она отличается от X-хромосомы ЭСК своим онтогенетическим статусом. Это видно на примере отсутствия активности гена *Gla* в спленоцитах (рис. 4) и его высокой активности в ЭСК. В клетках всех исследованных гибридных клонов и ЭТ, образовавшихся из них, обнаружена экспрессия аллеля *Gla* *M. caroli* (рис. 4, 5), что указывает на реактивацию этого аллеля. По визуальной оценке соотношения аллельных продуктов *Gla* в ЭТ, при дифференцировке гибридных клеток *in vitro* не выявлено признаков предпочтительной инактивации гомолога X-хромосомы спленоцита *M. caroli* по сравнению с X-хромосомой ЭСК.

Анализ экспрессии родительских аллелей локуса *Xist* в ЭТ также свидетельствует об отсутствии заметной предпочтительной инактивации одной из родительских X-хромосом, поскольку, по визуальной оценке, аллельные транскрипты представлены в равных соотношениях (рис. 3). Важно также заметить, что не выявлено существенных различий в экспрессии родительских аллелей *Gla* и *Xist* между клонами, значительно различающимися по числу аутосом, например НМС29 с околодиплоидным набором хромосом, и клонами НМС1 и НМС41, содержащими триплоидно-тетраплоидный набор. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу случайной инактивации X-хромосом *M. musculus* и *M. caroli* в эмбриональных гибридных клетках, несмотря на первоначальные онтогенетические различия родительских хромосом. Предположительно это может быть результатом “стирания” эпигенетических различий в родительских X-хромосомах под действием генома плюрипотентного партнера, поскольку свойства эмбриональных ги-

бридных клеток подобны или даже идентичны плюрипотентным свойствам ЭСК (Matveeva et al., 1998; Vasilkova et al., 2007).

Авторы выражают благодарность профессору М.А. Фергюсон-Смит (M.A. Ferguson-Smith; Centre for Veterinary Science, Department of Clinical Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK) за образцы сортированных индивидуальных хромосом мыши.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Matveeva N.M., Shilov A.G., Байбородин С.И. Гибриды между эмбриональными и соматическими клетками мыши сохраняют плюрипотентность // Докл. РАН. 1996. Т. 249. С. 129–132.
- Присяжнюк И.Е., Темирова С.А., Мензоров А.Г. и др. Видимая и “скрытая” сегрегация родительских хромосом в эмбриональных стволовых гибридных клетках // Онтогенез. 2005. Т. 36. № 2. С. 151–158.
- Серов О.Л., Матвеева Н.М., Кузилова Е.А. и др. “Хромосомная память” родительских геномов в эмбриональных гибридных клетках // Там же. 2003. Т. 34. № 3. С. 216–227.
- Ambrosi D.J., Rasmussen T.P. Reprogramming mediated by stem cell fusion // J. Cell Mol. Med. 2005. V. 9. P. 320–330.
- Avner P., Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. P. 59–67.
- Chapman V.M., Shows T.B. Somatic cell genetic evidence for X-chromosome linkage of three enzymes in the mouse // Nature. 1976. V. 259. P. 665–667.
- Cowan C.A., Atienza J., Melton D.A. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells // Science. 2005. V. 309. P. 1369–1373.
- Do J.T., Schöler H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells // Stem Cells. 2004. V. 22. P. 941–949.
- Farivar S., Yamaguchi S., Sugimoto M. et al. X-chromosome inactivation in differentiating mouse embryonic stem cells carrying X-linked GFP and lacZ transgenes // Int. J. Devel. Biol. 2004. V. 48. P. 629–635.
- Freeman T.C., Dixon A.K., Campbell E.A. et al. Expression mapping of mouse genes // MGI Direct Data Submission. 1998. (<http://www.informatics.jax.org/searches/reference.cgi?46734>)
- Geijsen N., Horoschak M., Kim K. et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells // Nature. 2004. V. 427. P. 148–154.
- Hogan B., Beddington R., Constantini F. et al. Manipulating the mouse embryo. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1994. 487 p.
- Hübner K., Fuhrmann G., Christenson L.K. et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells // Science. 2003. V. 300. P. 1251–1256.
- Kimura H., Tada M., Hatano S. et al. Chromatin reprogramming of male somatic cell-derived Xist and Tsix in ES hybrid cells // Cytogenet. Genome Res. 2002. V. 99. P. 106–114.
- Lee J.T., Jaenisch R. Long-range cis-effects of ectopic X-inactivation centers on a mouse autosome // Nature. 1997. V. 386. P. 275–279.
- Magin T.M., McWhir J., Melton D.W. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency // Nucl. Acid. Res. 1992. V. 20. P. 3795–3796.
- Matveeva N.M., Shilov A.G., Kaftanovskaya E.M. et al. In vitro and in vivo study of pluripotency in intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes // Mol. Reprod. Devel. 1998. V. 50. P. 128–138.
- Matveeva N.M., Pristyazhnyuk I.E., Temirova S.A. et al. Unequal segregation of parental chromosomes in embryonic stem cell hybrids // Ibid. 2005. V. 71. P. 305–314.
- Panning B., Dausman J., Jaenisch R. X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization // Cell. 1997. V. 90. № 5. P. 907–916.
- Rastan S., Robertson E.J. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation // J. Embryol. Exp. Morphol. 1985. V. 90. P. 379–388.
- Robertson E.J. Embryo-derived stem cell lines // Teratocarcinomas and embryonic stem cells. A practical approach. Oxford: IRL Press, 1987. P. 71–112.
- Smith A.G. Embryo-derived stem cells of mice and men // Ann. Rev. Cell Devel. Biol. 2001. V. 17. P. 435–462.
- Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells // Cur. Biol. 2001. V. 11. P. 1553–1558.
- Tada M., Morizane A., Kimura H. et al. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells // Devel. Dyn. 2003. V. 227. P. 504–510.
- Telenius H., Pelmeur A.H., Tunnacliffe A. et al. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes // Genes Chromosomes Cancer. 1992. V. 4. P. 226–257.
- Terada N., Hamazaki T., Oka M. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion // Nature. 2002. V. 416. P. 542–545.
- Toyooka Y., Tsunekawa N., Akasu R. et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 11457–11462.
- Vasilkova A.A., Kisilova N.A., Pusakov M.V. et al. Dominant manifestation of pluripotency in embryonic stem cell hybrids with various numbers of somatic chromosomes // Mol. Reprod. Devel. 2007. In press.
- Wutz A., Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered using ES cell differentiation // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 695–705.
- Yang E., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. Comparative chromosome map of the laboratory mouse and Chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting // Chromosome Res. 2000. V. 8. P. 219–227.
- Ying Q.-L., Nichols J., Evans E.P. et al. Changing potency by spontaneous fusion // Nature. 2002. V. 416. P. 545–548.

**Analysis of Expression of Parental Alleles *Xist* and *Gla*
in Interspecific Embryonic Hybrid Cells during Induced
in vitro Inactivation of X-Chromosomes**

**M. V. Puzakov, N. R. Battulin, S. A. Temirova, N. M. Matveeva,
N. A. Serdyukova, A. S. Grafodatsky, and O. L. Serov**

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, pr. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

E-mail: serov@bionet.nsc.ru

Abstract—The results of in situ hybridization with labeled species specific and X-chromosome-specific probes suggest that hybrid cells obtained by fusion of *Mus musculus* embryonic stem cells (genotype XY) and splenocytes of *M. caroli* females contain two parental X-chromosomes. In five clones of hybrid cells, differentiation was induced in embryoid bodies in vitro, which was accompanied by inactivation of one of X-chromosomes. We analyzed the expression of *Xist* and *Gla* alleles in the embryoid bodies using RT-PCR with an account that expression of locus *Xist* is one of key events in X-chromosome inactivation, while gene *Gla* was used as a marker of active X-chromosome. Identification of allele transcripts of loci *Xist* and *Gla* was based on restriction polymorphism between *M. musculus* and *M. caroli* that we had described. Transcripts of both parental alleles of loci *Xist* and *Gla* were present in the embryoid bodies of all studied hybrid clones. No preferential inactivation of *M. musculus* or *M. caroli* X-chromosome was found in the tested embryonic hybrid cells despite the initial differences in ontogenetic status between X-chromosomes of embryonic stem cells and splenocytes.

Key words: X-chromosome, X-chromosome inactivation, embryonic stem cells, embryonic hybrid cells, differentiation.