

## КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 611.013.576.362.576.364

### ИЗУЧЕНИЕ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК-ГИБРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЛИЯНИИ КЛЕТОК ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ RCC4aza1 И СЕЛЕЗЕНКИ МЫШИ, В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro*<sup>1</sup>

© 2008 г. Е. И. Филясова, О. В. Зацепина, Ю. М. Ходарович, О. А. Ларионов

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

E-mail: fei@mail.ibch.ru

Поступила в редакцию 21.05.07 г.

Окончательный вариант получен 25.10.07 г.

В работе описываются гибриды, полученные при слиянии клеток мышечной тератокарциномы линии RCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши, активированных перед слиянием к пролиферации и обработанных деметилирующим агентом 5-азацитидином. В полученных гибридах экспрессия маркерных генов Т-лимфоцитов *CD11* и *CD45* не проявлялась, что указывает на возможность репрограммирования соматического ядра под действием факторов клетки тератокарциномы. Вне зависимости от условий культивирования гибридные клетки отличались относительной стабильностью числа хромосом, так что в течение 30 пассажей они теряли в среднем не более четырех хромосом. Однако при культивировании в среде с гипоксантином, аминоптеринем и тимидином (селективные условия) дифференцировочный потенциал гибридных клеток понижался по сравнению с клетками, выращиваемыми в неселективной среде, что, вероятно, связано с общим подавлением их метаболизма. Впервые для гибридов клеток тератокарциномы продемонстрирована возможность направленной дифференцировки в кардиомиоциты под действием ДМСО *in vitro*.

*Ключевые слова:* гибридные клетки, репрограммирование, дифференцировка, кардиомиоциты.

За последние годы накоплены многочисленные данные о возможности получения жизнеспособных гибридов между дифференцированными – соматическими и плюрипотентными – эмбриональными стволовыми (ЭС) или эмбриональными карциномальными клетками (ЭК) *in vitro* (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001; Kimura et al., 2002; Mittmann et al., 2002; Pells et al., 2002; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Flasz et al., 2003; Do, Schöler, 2004; Cowan et al., 2005). Такие гибриды обычно получают путем слияния родительских клеток с помощью химических агентов или электрических импульсов и последующего отбора образовавшихся гибридных клеток при культивировании в селективных условиях. Выбор селективных условий определяется свойствами родительских клеток и направлен на удаление неслившихся клеток в течение первых 3–5 сут после получения гибридов. В качестве селективных условий удобно использовать среду с ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин), если один из родителей несет мутацию по гену *hprt*, а другой – не способен к самоподдержанию в культуре. Иссле-

дование свойств получаемых гибридов показывает, что в их составе геном соматической клетки может репрограммироваться под действием факторов, вносимых плюрипотентной клеткой таким образом, что перестают экспрессироваться гены, активно “работающие” в соматических клетках, тогда как экспрессия основных генов плюрипотентной клетки не подавляется. Возможность репрограммирования соматических ядер открывает новые перспективы для применения реконструированных клеток в клеточной терапии многих наследственных и приобретенных заболеваний человека.

Клетки эмбриональной карциномы во многом напоминают ЭС. Они способны долгое время находиться в культуре в недифференцированном состоянии, образуют эмбриоидные тельца при индукции дифференцировки *in vitro*, включаются в состав химерных эмбрионов при инъекциях в бластоцисту и образуют опухоли у иммунодефицитных мышей *in vivo* (Robertson, 1987). Однако в отличие от ЭС клетки ЭК не требуют специальных условий культивирования и могут стать легкодоступным источником репрограммирующих факторов в экспериментах по получению межклеточных гибридов.

<sup>1</sup> Работа поддержана Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

Одним из описанных в литературе свойств гибридов, полученных при слиянии соматических и ЭС-клеток, является нестабильность числа хромосом, так что за несколько пассажей при культивировании в среде без ГАТ число хромосом в гибридных клетках возвращается от тетраплоидного к диплоидному (Matveeva et al., 1998). С другой стороны, в гибридах ЭК-клеток и тимоцитов мыши, а также клеток ЭК и селезенки мыши описано сохранение довольно стабильного и близкого к тетраплоидному числа хромосом, если гибридные клетки культивируются в селективных условиях (в данном случае – в среде с ГАТ) (Rousset et al., 1983; Forejt et al., 1999). Гипердиплоидное число хромосом, а также то обстоятельство, что условия направленной дифференцировки гибридных клеток *in vitro* до сих пор остаются не выясненными, ограничивают возможность медицинского применения гибридов клеток ЭС и ЭК в клеточной терапии. Однако такие гибриды являются подходящей моделью для решения многих фундаментальных вопросов, направленных на выявление механизмов репрограммирования соматического генома, регуляции экспрессии генов и исследования влияния условий культивирования на свойства гибридных клеток.

Основная цель работы – изучение возможности получения стабильных гибридов между клетками селезенки взрослой мыши и ЭК-клетками мыши, а также анализ основных свойств гибридных клеток, проявляемых в разных условиях культивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки.** Родительские клетки эмбриональной тератокарциномы мыши линии RSC4aza1 (*hprt*<sup>-</sup>, нормальный кариотип мыши  $2n = 40$ ) были приобретены в Институте цитологии РАН (Всероссийская коллекция клеточных культур, СПб.). Клетки выращивали в среде ДМЕМ (“ПанЭко”, Россия), содержащей 8% фетальной бычьей сыворотки (“HyClone”, США) и антибиотики в стандартной концентрации. Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5%-го CO<sub>2</sub> и высокой влажности. Для предотвращения спонтанной дифференцировки их пересевали не реже, чем каждые 48 ч.

Клетки селезенки мыши F<sub>1</sub> CBA × C57BL/6J (♂, возраст 1.5 г.) выделяли по стандартной методике (St. Groth, de, Scheidegger, 1980), после чего сразу высевали в концентрации около 10<sup>6</sup> на 1 мл среды α-МЕМ (“Sigma”, США), содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки (“HyClone”). В среду добавляли конканавалин А (“ПанЭко”) и 5-азациитидин (“Sigma”) в конечных концентрациях 3 мкг/мл и 5 мкМ соответственно и культивировали в течение 5 сут.

**Получение гибридных клеток.** Активированные клетки селезенки смешивали с клетками RSC4aza1 в соотношении 5 : 1 и индуцировали слияние с помощью 45%-ного полиэтиленгликоля (ПЭГ, MW 1450, “Sigma”) в присутствии 10%-ного диметилсульфоксида (ДМСО, “ПанЭко”) и среды ДМЕМ в течение 1 мин. Сразу после слияния клетки помещали на 24 ч в культуральную среду, содержащую ГАТ (10<sup>-4</sup> М гипоксантина, 7 × 10<sup>-7</sup> М аминоптерина и 10<sup>-5</sup> М тимидина) (“Flow Laboratory”, Италия), а затем переносили в среду без ГАТ. Инкубация контрольных клеток RSC4aza1, не подвергавшихся слиянию, в селективной среде с ГАТ в течение 24 ч приводила к тотальной гибели всех клеток.

**Цитофлуориметрические измерения.** Клетки снимали с субстрата в смеси 0.25%-ного трипсина и 0.025%-ного версена (1 : 1) 5 мин при 37°C. Потом отмывали от сыворотки в 0.1 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ, мМ: 137 NaCl; 2.7 KCl; 6.7 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) и фиксировали 70%-ным этанолом в течение 2–3 ч. Затем клетки либо сразу использовали для анализа, либо хранили при температуре –20°C в течение нескольких недель. Клетки дважды отмывали от спирта раствором ФСБ и инкубировали с 200 мкг/мл РНКазы А (“Roche”, Франция) 30 мин при 37°C. Добавляли 10 мкг/мл раствора йодида пропидия (“Sigma”) и инкубировали 45 мин при 37°C в защищенном от света месте. Измерения проводили на приборе DАКО Galaxy (Дания), в котором в качестве источника излучения используется аргоновый лазер (λ = 488 нм). Интенсивность флуоресцентного сигнала измеряли при длине волны 630 нм (канал FL3). Полученные данные обрабатывали, используя программу ModFitLT, версия 3.0.

**Получение метафазных пластинок хромосом.** Для получения метафазных пластинок из гибридных и родительских клеток в культуральную среду добавляли 50 нг/мл нокодазола (“Sigma”) на 1–2 ч. Адгезивные клетки собирали в смеси 0.25%-ного трипсина и 0.025%-ного версена (3 : 1), инкубировали в 0.56%-ном KCl 10 мин при 37°C и фиксировали в трех сменах абсолютного метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) при температуре –20°C в течение 3 ч. Лимфоциты селезенки собирали центрифугированием, а затем инкубировали в 0.56%-ном KCl и фиксировали так же, как и адгезивные клетки. Клетки наносили на влажные холодные предметные стекла, контролируя качество метафазных пластинок хромосом под микроскопом ICM 405 (“Opton”, Германия). До использования препараты хранили при комнатной температуре не более месяца. Препараты изучали с помощью микроскопа Axiovert 200 (“Carl Zeiss”, Германия), используя фазово-контрастный объектив ПланАпохромат 100 × (числовая апертура 1.3).

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР).* Геномную ДНК для проведения ПЦР выделяли с помощью магнитных частиц, покрытых SiO<sub>2</sub> (1 выделение – около 10<sup>6</sup> клеток). Для проведения ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), сначала выделяли тотальную РНК из клеток с помощью набора YellowSolve (1 выделение – около 10<sup>6</sup> клеток). Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор для синтеза первой цепи кДНК и смесь случайных гексапраймеров (все использованные наборы и препараты фирмы “Силекс”, Россия). ПЦР проводили в объемах 10 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. Таq-ДНК-полимеразы, 200 мкМ dNTP, праймеры (в конечной концентрации 1 пмоль/мкл) и 0.2–1 мкг ДНК или кДНК. Температура отжига и время элонгации праймеров были адаптированы к оптимальным условиям ПЦР для каждой используемой пары праймеров. Температуры денатурации и элонгации и соответствующие времена были подобраны на основании стандартных условий функционирования Таq-полимеразы. Для микросателлитного анализа, выполненного с помощью ПЦР, были использованы следующие праймеры: для повтора D2Mit30 (хромосома 2) D2Mit30\_F

(5'-CATCCAAGCAGTAACGTTAGACG-3')

и D2Mit30\_R

(5'-AAATGTTACACCCTCTGCGG-3');

для повтора D6Mit15 (хромосома 6) D6Mit15\_F

(5'-CACTGACCCTAGCACAGCAG-3')

и D6Mit15\_R

(5'-TCCTGGCTTCCACAGGTAAGT-3');

для повтора D6Mit102 (хромосома 6) D6Mit102\_F

(5'-CCATGTGGATATCTTCCCTTG-3')

и D6Mit102\_R

(5'-GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG-3');

для повтора D8Mit4 (хромосома 8) D8Mit4\_R

(5'-CCAACTCATCCCCAAAGGTA-3')

и D8Mit4\_R

(5'-GTATGTTCAAGGCTGGGCAT-3').

Для изучения экспрессии генов *Oct4* и  $\beta$ -актина использовали пары праймеров Oct4\_F

(5'-GGAGCTAGAACAGTTTGC-3'),

Oct4\_R

(5'-CTTCCCTCCACCCACTTC-3')

и Act\_F

(5'-GAAATCGTGCCTGACATCAAAG-3'),

Act\_R

(5'-TGTAGTTTCATGGATGCCACAG-3')

соответственно. Для изучения экспрессии генов *CD11* и *CD45*, специфичных для Т-лимфоцитов, использовали пары праймеров CD11\_F

(5'-ACACTGTGGCCTGGATGACCTC-3'),

CD11\_R

(5'-GGTAAGTGAACACTCGGCCTCC-3')

и CD45\_F

(5'-GCGAAGGAAAGCAGACTTATGGAG-3'),

CD45\_R

(5'-CGAGGATGGATGCATGCTTGTG-3')

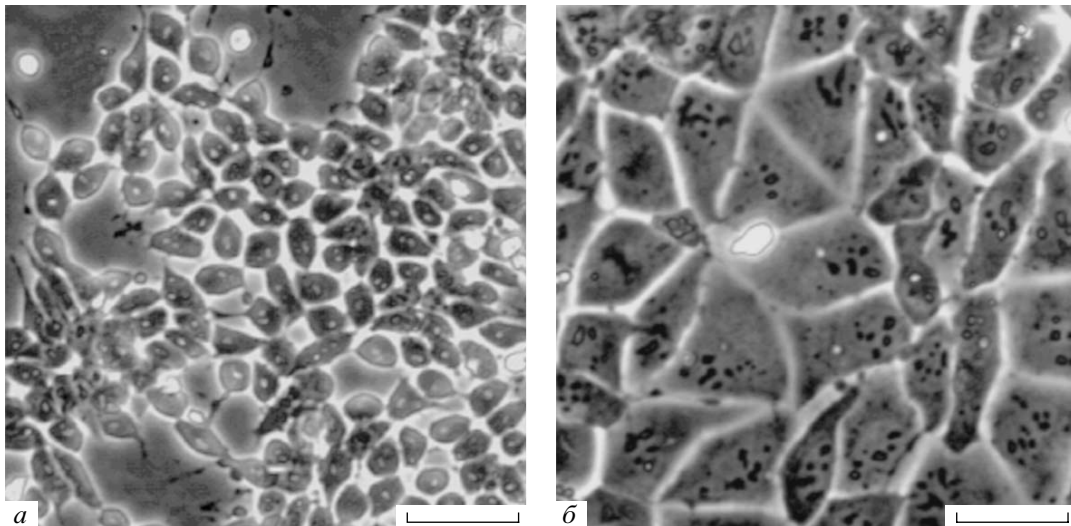
соответственно.

*Дифференцировка клеток in vitro.* Для получения эмбрионных телец клетки снимали с субстрата, как описано выше, переносили в чашки для выращивания суспензионных культур (“Sarstedt”, Германия) в концентрации около 10<sup>5</sup> кл/мл и культивировали в присутствии 1%-ного ДМСО в суспензионном состоянии до формирования эмбрионных телец (в среднем около 5 сут). Для дифференцировки гибридных клеток в кардиомиоциты клетки высевали в концентрации около 10<sup>5</sup> кл/мл и культивировали в течение 5 сут в присутствии 1%-ного ДМСО. За это время клетки формировали сплошной монослой. Затем их культивировали в среде без ДМСО, заменяя среду для культивирования через 1 сут. На 7–8-е сут на чашках обнаруживали островки пульсирующих клеток. Анализ митохондрий в пульсирующих клетках производили путем добавления к культуральной среде родамина 6G в концентрации 6 нг/мл на 15 мин при 37°C. Клетки изучали с помощью светового микроскопа ВН2 (“Olympus”, Япония), используя водоиммерсионный объектив U ПланАпохромат (“Olympus”, модель UPLAPO60 × W/1.2, числовая апертура 1.2, увел. × 60).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Получение гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит селезенки.* Клон гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит был получен в результате слияния клеток мышшиной тератокарциномы линии PCC4aza1 и клеток селезенки взрослой мыши F<sub>1</sub> CBA × C57BL/6J (♂), активированных к пролиферации с помощью конканавалина А в присутствии деметилирующего агента 5-азациитидина. Эффективность образования гибридов составляла 1 клон на 5 × 10<sup>6</sup> подвергающихся слиянию клеток PCC4aza1. Полученные гибридные клетки по морфологии подобны родительским клеткам тератокарциномы, но превосходят их по размерам (рис. 1).

*Доказательство гибридной природы полученных клонов.* Методом ПЦР был проведен микросателлитный анализ на маркерные последовательности хромосом 2, 6 и 8 линий мышей, из



**Рис. 1.** Морфология клеток линии PCC4aza1 (а) и тетраплоидных потомков гибридной клетки PCC4aza1 × лимфоцит селезенки (б) (фазовый контраст). Масштаб: 50 мкм.

которых получены исходные родительские клетки. Он показал, что в гибридных клетках присутствуют микросателлитные последовательности обоих видов родительских клеток – и клеток PCC4aza1, и клеток селезенки. На рис. 2 приведены результаты такого анализа на маркеры хромосом 2 и 8.

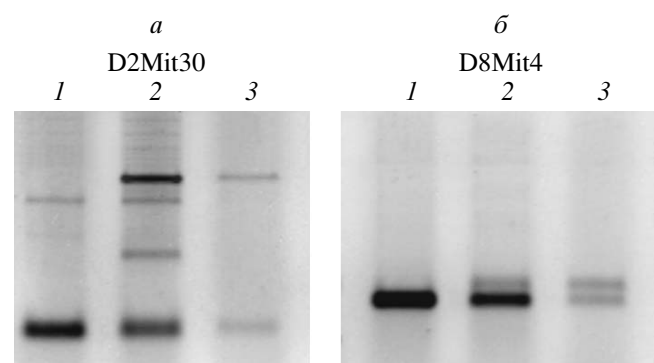
*Влияние селективной среды на хромосомную стабильность гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит селезенки.* После слияния клеток и первоначальной селекции в течение 24 ч на среде, содержащей ГАТ, гибридные клетки в течение первых 16 пассажей выращивали в неселективных условиях (среда ДМЕМ без ГАТ). После этого часть клеток перевели в селективные условия культивирования (среда ДМЕМ с добавлением ГАТ), а оставшиеся продолжали культивировать в среде без ГАТ.

При определении общего числа хромосом в метафазных пластинках, полученных из гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит раннего (6-го) и позднего (25–27-го) пассажей культивирования в неселективных условиях, было показано, что гибридные клетки содержали около 78 ( $77.2 \pm 2.4$ ) хромосом на раннем и около 74 ( $74.4 \pm 2.2$ ) хромосом на поздних пассажах культивирования, т. е. за 25–27 пассажей выращивания в неселективных условиях гибриды теряли в среднем четыре хромосомы.

Аналогичные результаты были получены при подсчете среднего числа хромосом в гибридных клетках, культивируемых с 17-го по 26–30-й пассажи в селективных условиях. Так, в гибридных клетках 17-го пассажа среднее число хромосом составляло порядка  $76.0 \pm 0.8$ , а на 26–30-м пассажах –  $76.1 \pm 1.7$ . Эти значения близки к среднему

числу хромосом в “поздних” гибридах, выращиваемых в неселективных условиях ( $74.4 \pm 2.2$ ). Таким образом, гибриды PCC4aza1 × лимфоцит сохраняли относительно стабильное число хромосом независимо от условий культивирования. Данные по среднему числу хромосом в гибридных клетках на разных пассажах и в разных условиях культивирования представлены в таблице.

*Влияние селективной среды на метаболизм гибридных клеток.* При переводе части клеток начиная с 17-го пассажа в селективные условия культивирования гибридные клетки продолжали



**Рис. 2.** Микросателлитный ПЦР-анализ на маркеры хромосом 2 (а) и 8 (б) мышей линий, из которых были получены клетки PCC4aza1 и лимфоциты селезенки, подтверждающий гибридную природу полученных клеток PCC4aza1 × лимфоцит. В качестве матрицы использовали ДНК, выделенную из родительских клеток PCC4aza1 (1), гибридов PCC4aza1 × лимфоцит (2) и лимфоцитов селезенки (3).

Длина ПЦР-фрагментов для маркеров, п.о.: D2Mit30 – 280 (129/Ola) и 136 (CBA), 320 (C57BL/6); D8Mit4 – 156 (129/Ola) и 195 (CBA), 156 (C57BL/6).

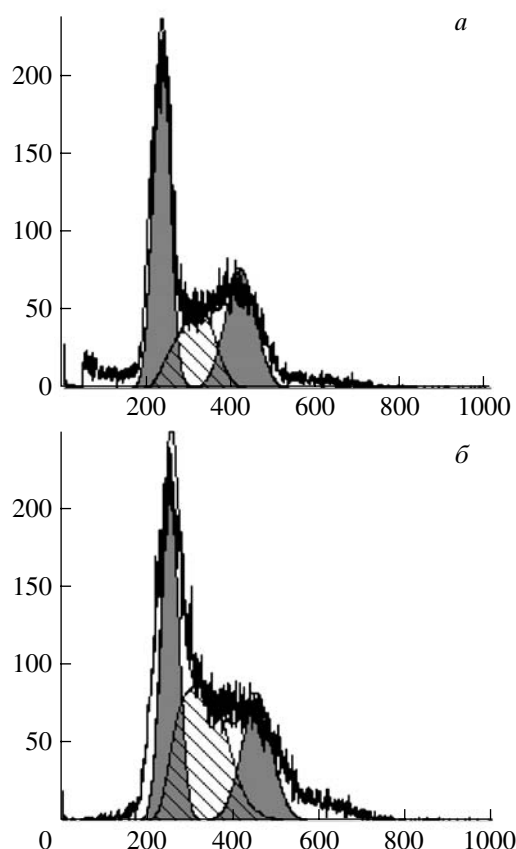
Среднее число хромосом в гибридных клетках PCC4aza1 × лимфоцит на разных пассажах в зависимости от условий культивирования

Среда культивирования	Число	
	пассажей	хромосом среднее
Без ГАТ	6	78 (77.2 ± 2.4)*
То же	17	76 (76.0 ± 0.8)
»	25–27	74 (74.4 ± 2.2)
С ГАТ**	26–30	76 (76.1 ± 1.7)

\* Среднее ± среднее квадратичное отклонение.

\*\* Начиная с 17-го пассажа.

нормально расти, а их морфология не отличалась от таковой клеток, которые росли в отсутствие ГАТ. Однако в селективных условиях скорость роста гибридных клеток снижалась. Об этом свидетельствовали результаты цитофлуориметрического анализа клеточного цикла на поздних пас-



**Рис. 3.** Влияние разных сред (*a* – неселективная, *b* – селективная) на клеточный цикл гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит. (▨) – доля клеток в *S*-фазе клеточного цикла, %: *a* – 24.96; *b* – 42.04. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции в канале FL3; по оси ординат – число проанализированных клеток.

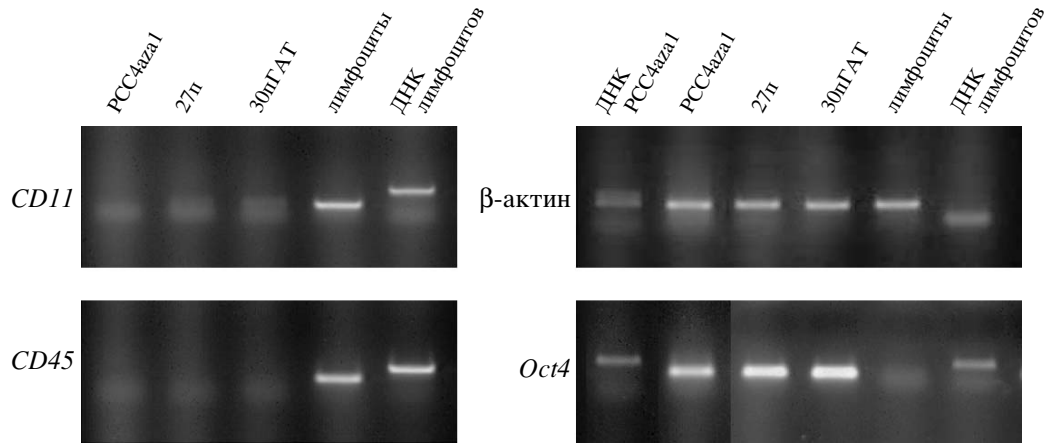
сажах (27–30-й) культивирования гибридов, выращиваемых в неселективных и селективных условиях (рис. 3). Из приведенных данных видно, что в селективной среде доля клеток, находящихся в *S*-фазе, составляет 42% против 25% таких же клеток, культивированных в неселективных условиях.

**Репрограммирование соматического ядра в составе гибрида.** Анализ экспрессии маркерных генов лимфоцитов *CD11* и *CD45* в гибридных клетках PCC4aza1 × лимфоцит показал отсутствие продуктов экспрессии этих генов в гибридах при всех условиях культивирования. Это свидетельствует о процессе репрограммирования соматического ядра лимфоцита в составе гибридной клетки под действием факторов клетки PCC4aza1 (рис. 4). Кроме этого, гибридные клетки, так же как и родительские клетки тератокарциномы, экспрессировали ген *Oci4*, являющийся маркером плюрипотентных клеток, причем уровень его экспрессии был сопоставим с таковым в клетках PCC4aza1 (рис. 4).

**Дифференцировка гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит *in vitro*.** Способность гибридных клеток к дифференцировке изучали путем добавления к среде культивирования 1% ДМСО. При этом клетки либо переводили в суспензионное состояние, либо продолжали выращивать в виде моносоля. Полученные результаты показали, что суспензионные гибридные клетки в неселективных условиях хуже образовывали эмбрионидные тельца, чем родительские PCC4aza1, и полностью теряли способность формировать эмбрионидные тельца при культивировании в среде с ГАТ. Индукция дифференцировки гибридных клеток, прикрепленных к субстрату, показала, что независимо от условий культивирования они дифференцировались преимущественно в эндодермальные, о чем можно судить по изменению их морфологии. Следует отметить, что в аналогичных условиях клетки тератокарциномы PCC4aza1 были не способны дифференцироваться по эндодермальному пути. Только адгезивные гибридные клетки, культивируемые в неселективных условиях, были способны дифференцироваться в кардиомиоциты. Об их дифференцировке в кардиомиоциты говорило появление на препаратах кластеров пульсирующих клеток, в которых после окраски родамином 6G выявляли многочисленные митохондрии. Родительские клетки PCC4aza1, по результатам нашей работы, в аналогичных условиях не проявляли способности дифференцироваться в кардиомиоциты и содержали одиночные митохондрии (Paquin et al., 2002; St. John et al., 2005).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения гибридных клеток PCC4aza1 × лимфоцит мы использовали клетки селезенки



**Рис. 4.** Результаты ОТ-ПЦР, иллюстрирующие экспрессию генов *CD11* и *CD45*, специфичных для Т-лимфоцитов, маркерного гена плюрипотентных клеток *Oct4* и гена  $\beta$ -актина (положительный контроль проведения ОТ-ПЦР) в гибридных и родительских клетках.

В качестве матрицы для проведения ОТ-ПЦР использовали кДНК клеток PCC4aza1 (PCC4aza1), гибридных клеток PCC4aza1  $\times$  лимфоцит на 27-м пассаже культивирования в неселективных условиях (27п) и 30-м пассаже культивирования в селективных условиях (30пГАТ), лимфоцитов селезенки мыши (лимфоциты); геномную ДНК клеток PCC4aza1 (ДНК PCC4aza1) и лимфоцитов (ДНК лимфоцитов).

мышы, предварительно активированные к пролиферации конканавалином А и обработанные деметилирующим агентом 5-азациитидином в течение 5 сут. По нашим сведениям, гибриды ЭК-клеток с активированными к пролиферации лимфоцитами получены в нашей работе впервые. Известно, что 5-азациитидин способствует деметилированию ДНК и подавляет активность ДНК метилтрансфераз (Cheng, 1995). Этот агент широко используют для изучения роли метилирования ДНК в механизмах клеточной дифференцировки и активации генов (Taylor, Jones, 1979; Fukuda, 2001). Обработка клеток 5-азациитидином способствует репрограммированию ядер соматических клеток как в гибридах с ЭС-клетками (Do, Shöler, 2004), так и при переносе ядер в энуклеированные ооциты (Jones et al., 2001; Enright et al., 2003), повышая вероятность получения жизнеспособных гибридов. В работе Сулливана с соавторами показано, что эффективность репрограммирования ядер соматических клеток при слиянии с ЭС-клетками значительно повышается, если соматические клетки находятся в  $G_0$ -фазе клеточного цикла (Sullivan et al., 2006). Сравнительно низкая эффективность получения гибридных клонов – один клон на  $5 \times 10^6$  клеток PCC4aza1, – наблюдаемая в настоящей работе, по-видимому, связана с состоянием родительских лимфоцитов. В наших условиях слияние производили с лимфоцитами, активированными к пролиферации, хотя однозначно установить стадию клеточного цикла, на которой находилась родительская соматическая клетка в момент слияния, не представляется возможным. Нельзя также исключить, что эффективному репрограммированию соматичес-

кого ядра и получению гибридов препятствовала длительная обработка лимфоцитов 5-азациитидином, которая приводила к снижению общего уровня метилирования ДНК. Поскольку при культивировании выделенных лимфоцитов селезенки с конканавалином А *in vitro* активируются только Т-лимфоциты, можно сделать вывод о том, что мы получили гибриды между клетками PCC4aza1 и Т-лимфоцитами. Полученные в работе гибридные клетки не отличались по некоторым свойствам от гибридов ЭК-клеток с неактивированными клетками селезенки (Жданова и др., 1991; Forejt et al., 1999). В наших гибридах также прекращалась экспрессия генов, специфичных для Т-лимфоцитов – *CD11* и *CD45*, тогда как экспрессия гена *Oct4* – маркера плюрипотентных клеток – сохранялась. Отличительной особенностью полученных нами гибридов является относительная стабильность числа хромосом.

Известно, что условия культивирования оказывают влияние на сохранность хромосом в гибридных клетках, хотя характер этого влияния, по разным данным, может отличаться. Так, в одних работах для поддержания хромосомной стабильности гибридные клетки культивировали на селективной среде, содержащей ГАТ (Rousset et al., 1983; Mise et al., 1996; Forejt et al., 1999). В других, напротив, авторы, изучавшие гибридные клетки, полученные слиянием ЭС-клеток и клеток селезенки мыши, показали, что гибриды с числом хромосом, близким к тетраплоидному, за 5–7 пассажей теряют соматические хромосомы, так что общее число хромосом быстро возвращается к диплоидному (Matveeva et al., 1998). В наших условиях число хромосом оказывалось стабильным

как при выращивании клеток в среде с ГАТ (селективные условия), так и при культивировании в неселективной среде. Можно предположить, что хромосомная стабильность полученных гибридных клеток связана с действием 5-азациитидина, который способствует снижению уровня метилирования ДНК в хромосомах соматической клетки. Как известно, ДНК различных генов в ЭК-клетках находится в деметилированном состоянии, что сопряжено с их активной экспрессией (Mise et al., 1996; Forejt et al., 1999).

Для изучения влияния условий культивирования гибридов на способность к дифференцировке *in vitro* мы проанализировали возможность дифференцировки гибридных клеток в кардиомиоциты, о наличии которых можно судить по появлению островков пульсирующих клеток. В литературе сведений о способности к дифференцировке гибридов ЭК-клеток и соматических клеток в кардиомиоциты не обнаружено. Известно, что у клеток тератокарциномы РСС4аза1 невозможно индуцировать дифференцировку в кардиомиоциты ни с помощью ДМСО, ни под действием ретиноевой кислоты (Forejt et al., 1999). Это согласуется с полученными нами данными – нам также не удалось дифференцировать клетки РСС4аза1 в кардиомиоциты. Ряд исследователей отмечали более высокий потенциал гибридных клеток к дифференцировке по сравнению с исходными родительскими клетками тератокарциномы (Kamp, van der et al., 1984; Forejt et al., 1999). По-видимому, это связано с активацией в процессе репрограммирования некоторых генов, “молчащих” как в соматических, так и в ЭК-клетках. Однако у гибридов РСС4аза1 × лимфоцит повышенный потенциал к дифференцировке наблюдали только при культивировании в неселективных условиях (в среде без ГАТ). Можно высказать предположение, что пониженная способность гибридов к дифференцировке в среде с ГАТ объясняется включением запасных путей биосинтеза пуриновых и пиримидиновых оснований, вызванным присутствием в среде ГАТ. Вероятно, этим также объясняется неспособность гибридных клеток в присутствии ГАТ к образованию эмбриоидных тел и кардиомиоцитов, а также уменьшение их пролиферативной активности и увеличение доли клеток в S-периоде клеточного цикла.

Тада и др. показали, что тетраплоидные гибриды ЭС-клеток и тимоцитов мыши, дифференцированные *in vitro* в дофаминергические нейроны, после трансплантации в мозг мышей остаются жизнеспособными, включаются в состав нервных тканей мозга и продолжают экспрессировать маркер дофаминергических нейронов – тирозингидроксилазу (Tada et al., 2003). Известно, что у различных видов млекопитающих, включая человека, пloidность кардиомиоцитов весьма изменчива, и процент тетраплоидных клеток среди

кардиомиоцитов колеблется от 2–7 (у кроликов, собак и крыс) до 10 (у мышей) и даже 50 у взрослого человека (Adler et al., 1996). Эти данные делают оправданным возможное применение дифференцированных в кардиомиоциты гибридных клеток для коррекции дисфункциональных изменений сердечной мышцы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жданова Н.С., Байбородин С.И., Керкис А.Ю. и др. Поведение X-хромосом во внутри- и межвидовых гибридах клеток тератокарциномы мыши РСС4аза1 // Онтогенез. 1991. Т. 22. С. 158–167.
- Adler C.-P., Freidburg H., Herget G.W. et al. Variability of cardiomyocyte DNA content, ploidy level and nuclear number in mammalian hearts // Virchows Arch. 1996. V. 429. P. 159–164.
- Cheng X. DNA modification by methyltransferases // Curr. Opin. Struct. Biol. 1995. V. 5. P. 4–10.
- 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.
- Enright B.P., Kubota C., Yang X. et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine // Biol. Reprod. 2003. V. 69. P. 96–901.
- Flasza M., Shering A.F., Smith K. et al. Reprogramming in inter-species embryonal carcinoma-somatic cell hybrids induces expression of pluripotency and differentiation markers // Clon. Stem Cells. 2003. V. 5. P. 339–354.
- Forejt J., Saam J.R., Gregorova S. et al. Monoallelic expression of reactivated imprinted genes in embryonal carcinoma cell hybrids // Exp. Cell Res. 1999. V. 252. P. 416–422.
- Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering // Artif. Organs. 2001. V. 25. P. 187–193.
- Jones K.L., Hill J., Shin T.Y. et al. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation // Mol. Reprod. Devel. 2001. V. 60. P. 208–213.
- Kamp A.W., van der, Roza-de Jongh E.J., Houwen R.H. et al. Developmental characteristics of somatic cell hybrids between totipotent mouse teratocarcinoma and rat intestinal villus cells // Exp. Cell Res. 1984. V. 154. P. 53–64.
- 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.
- 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.
- Mittmann J., Kerckis I., Kawashima C. et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells and their hybrids during embryoid body formation // Genet. Mol. Biol. 2002. V. 25. P. 103–111.

- Mise N., Sado T., Tada M. et al. Activation of the inactive X chromosome induced by cell fusion between a murine EC and female somatic cell accompanies reproducible changes in the methylation pattern of the Xist gene // *Exp. Cell Res.* 1996. V. 223. P. 193–202.
- Paquin J., Danalache B.A., Jankowski M. et al. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 9550–9555.
- Pells S., Di Domenico A.I., Gallagher E.J. et al. Multipotentiality of neuronal cells after spontaneous fusion with embryonic stem cells and nuclear reprogramming *in vitro* // *Clon. Stem Cells.* 2002. V. 4. P. 331–338.
- Robertson E.J. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1987. 268 p.
- Rousset J.P., Bucchini D., Jami J. Hybrids between F9 nullipotent teratocarcinoma and thymus cells produce multidifferentiated tumors in mice // *Devel. Biol.* 1983. V. 96. P. 331–336.
- St. Groth S.F., de, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics // *J. Immunol. Methods.* 1980. V. 35. P. 1–21.
- St. John J.C., Ramalho-Santos J., Gray H.L. et al. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte *in vitro* differentiation from human embryonic stem cells // *Clon. Stem Cells.* 2005. V. 7. P. 141–153.
- Sullivan S., Pells S., Hooper M. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by embryonic stem cells is affected by cell cycle stage // *Ibid.* 2006. V. 8. P. 174–188.
- Tada M., Takahama Y., Abe K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells // *Curr. 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.
- Taylor S.M., Jones P.A. Multiple new phenotypes induced in 10T1 / 2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine // *Cell.* 1979. V. 17. P. 771–779.
- 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.
- Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P. et al. Changing potency by spontaneous fusion // *Ibid.* 2002. V. 416. P. 545–548.

## Growth and Differentiation of Cell Hybrids Obtained by Fusing Mouse PCC4aza1 Teratocarcinoma Cells and Mouse Spleen Cells under Different *in vitro* Culture Conditions

E. I. Filyasova, O. V. Zatsepina, Yu. M. Khodarovich, and O. A. Larionov

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia  
e-mail: fei@mail.ibch.ru*

**Abstract**—Cell hybrids obtained by fusing mouse PCC4aza1 teratocarcinoma cells and spleen cells induced to proliferation and treated with the demethylating agent 5-azacytidine prior to fusion are described. The obtained hybrids demonstrated no expression of T lymphocyte marker genes *CD11* and *CD45*, which indicates possible somatic nucleus reprogramming by factors present in teratocarcinoma cells. Irrespective of culture conditions, cell hybrids demonstrated a relatively stable chromosome number: they lost on average no more than four chromosomes after 30 passages. Culturing in medium containing hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (selective conditions) decreased the differentiation capacity of cell hybrids compared to nonselective conditions, which is likely due to the inhibition of their metabolism. For the first time, teratocarcinoma cell hybrid differentiation into cardiomyocytes under the influence of DMSO has been demonstrated *in vitro*.

*Key words:* cell hybrids, reprogramming, differentiation, cardiomyocytes.