

На правах рукописи



МЕНЗОРОВ АЛЕКСЕЙ ГАВРИИЛОВИЧ

СЕГРЕГАЦИЯ ХРОМОСОМ И МИТОХОНДРИЙ ВО ВНУТРИ- И
МЕЖВИДОВЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2006

Работа выполнена в лаборатории генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
Серов Олег Леонидович
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
Графодатский Александр Сергеевич
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск

доктор биологических наук,
Гуляева Людмила Фёдоровна
Институт молекулярной биологии и
биофизики СО РАМН,
г. Новосибирск

Ведущее учреждение:

Институт биологии гена
РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится 22 марта 2006 года на утреннем заседании диссертационного совета Д-003.011.01 в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева 10, тел/факс: (383)3331278, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан "10" февраля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

А.Д. Груздев

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки обладают плюрипотентными и дажеtotипотентными свойствами, которые сохраняются при длительном культивировании *in vitro* (Hogan et al., 1994; Smith, 2001; Carpenter et al., 2003; Ginis et al., 2003; Hubner et al., 2003; Toyooka et al., 2003; Geijsen et al., 2004). При комбинировании ЭС клеток с эмбрионами ранних стадий развития, ЭС клетки способны участвовать в формировании химер, причем вклад ЭС клеток прослеживается во всех соматических тканях и в зародышевом пути (Robertson et al., 1986; Allan, 1987; Robertson, 1987; Joynert, 1993; Hogan et al., 1994).

В 1996 году впервые была предпринята попытка использовать ЭС клетки для репрограммирования генома дифференцированных клеток. С этой целью плюрипотентные ЭС клетки мыши были слиты со спленоцитами взрослого животного. Полученные в этом эксперименте клеточные гибриды обладали плюрипотентными свойствами, сопоставимыми с ЭС клетками (Матвеева и др., 1996; Matveeva et al., 1998). Эти данные получили подтверждение при анализе гибридов, полученных от слияния ЭС клеток с тимоцитами (Tada et al., 2001; 2003) или незрелыми клетками-предшественниками гемопоэза или нейрогенеза (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). В недавно опубликованных данных по анализу гибридных клеток, полученных слиянием ЭС клеток человека с человеческими фибробластами, также отмечается высокий уровень плюрипотентности, сходный с ЭС клетками (Cowan et al., 2005). Сопоставление процессов репрограммирования в ядрах дифференцированных клеток после их переноса в энуклеированный ооцит или яйцо с таковыми в гибридных клетках типа ЭС-соматическая клетка показывает их значительное сходство и, следовательно, гибридные клетки являются новым перспективным инструментом изучения фундаментальных проблем репрограммирования и восстановления проспективных потенций генома дифференцированных клеток.

Однако, прежде чем изучать молекулярные механизмы поддержания плюрипотентности и репрограммирование генома соматического партнера, необходимо знать хромосомный состав гибридных клеток. До недавнего времени исследованиям этой важной характеристики гибридных клеток типа ЭС-дифференцированная клетка не уделялось должного внимания. В ряде работ по слиянию ЭС и дифференцированных клеток авторы не исследовали кариотип гибридных клеток на том основании, что клетки имели тетраплоидный набор хромосом (Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Однако, по данным других исследователей, в гибридных клетках, полученных слиянием ЭС клеток мыши с тимоцитами и спленоцитами, наблюдается сегрегация хромосом (Matveeva et al., 1998; Матвеева и др., 2001; Tada et al., 2003). Сходные данные были получены при исследовании гибридных клеток, образовавшихся от спонтанного слияния *in vivo* незрелых клеток-предшественников гемопоэза с клетками печени (Wang et al., 2003).

Следует заметить, что применение цитогенетических методов для идентификации родительских хромосом внутривидовых и межвидовых гибридных

клеток (полученных слиянием клеток от близких видов) затруднено или невозможно из-за морфологического сходства гомологичных хромосом. Между тем, дискриминация родительских хромосом возможна с использованием альтернативных методов, например, с помощью микросателлитов в качестве маркеров хромосом. Микросателлиты высокополиморфны у лабораторных линий мышей и равномерно распределены в геноме мыши (Dietrich et al., 1992; 1996). В 1998 году появилась одна из первых работ, в которой микросателлиты использовали для маркирования родительских хромосом у гетероплоидных внутривидовых гибридных клеток (Hines et al., 1998).

При образовании гибридных клеток происходит объединение не только ядерных геномов, но и цитоплазмы родительских клеток. Как отмечалось выше, имеются противоречивые и неполные данные о судьбе родительских хромосом в геноме гибридной клетки типа ЭС-соматическая клетка, а информация об организации гибридной цитоплазмы практически полностью отсутствуют. Учитывая способность митохондриальной ДНК (мтДНК) к репликации, представляется актуальным изучение взаимоотношений родительских митохондриальных геномов в гибридной цитоплазме, что может пролить свет на ее организацию. Следует также отметить, что, согласно некоторым данным, существует взаимосвязь между сегрегацией хромосом и митохондрий. Так, в гибридных клетках от слияния между клетками человека и мыши происходит сегregationия митохондрий того партнера, чьи хромосомы теряются (Francesco et al., 1980). Гибридные клетки от слияния клеток мыши и китайского хомячка, а также мыши и крысы, сохраняли как хромосомы, так и митохондрии обоих партнеров (Hayashi et al., 1982; Zuckerman et al., 1984).

Таким образом, не вызывает сомнений актуальность изучения судьбы родительских хромосом в геноме гибридных клеток типа ЭС-дифференцированная клетка, полученных от слияния диплоидных клеток разных линий мышей или близких видов, с использованием микросателлитов, позволяющих дискриминировать родительские гомологии. Представляется не менее актуальным изучение поведения родительских митохондрий в цитоплазме гибридных клеток для выявления связи между формированием генома гибридной клетки и ее цитоплазмы.

Цели и задачи исследования

При выполнении работы преследовали две цели: 1) описать с помощью микросателлитов поведение родительских хромосом в гибридных клетках, полученных слиянием ЭС клеток *M. musculus* линии 129/Ola со спленоцитами или эмбриональными фибробластами мышей линии DD/c, и в наборе клонов межвидовых гибридных клеток, полученных слиянием ЭС клеток *M. musculus* со спленоцитами *M. caroli*; 2) исследовать судьбу родительских митохондрий в цитоплазме внутри- и межвидовых гибридных клеток, используя полиморфизм родительских мтДНК.

Для достижения этих целей были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Провести поиск полиморфных микросателлитов, способных дискриминировать каждую пару родительских хромосом у линий мышей 129/Ola и DD/c и у линии мышей 129/Ola *M. musculus* и азиатской мыши *M. caroli*. Оптимизировать условия полимеразной цепной реакции (ПЦР) для анализа аллельных вариантов микросателлитов и оценить чувствительность метода путем анализа искусственной смеси геномной ДНК мышей *M. musculus* линии 129/Ola и *M. caroli*.

2. Провести анализ микросателлитов, маркирующих каждую пару родительских хромосом, в 3-х клонах серии НЕСС, полученных от слияния ЭС клеток мышей 129/Ola и спленоцитов взрослой мыши DD/c, и в 5-ти клонах серии НЕСФ, полученных от слияния ЭС клеток и эмбриональных фибробластов мышей DD/c, с целью описания их хромосомного состава.

3. Провести анализ микросателлитов, маркирующих каждую пару родительских хромосом, в 20-ти клонах серии НМС, полученных от слияния ЭС клеток *M. musculus* и спленоцитов азиатской мыши *M. caroli*, с целью описания их хромосомного состава.

4. Провести секвенирование D-петли, генов третьей субъединицы цитохромоксидазы, третьей и шестой субъединицы НАД-Н дегидрогеназы мтДНК у мышей линий 129/Ola и DD/c с целью выявления нуклеотидных замещений, позволяющих дискриминировать их мтДНК.

5. Исследовать родительское происхождение мтДНК в 3-х клонах серии НЕСС, 5-ти клонах серии НЕСФ и в 20-ти клонах серии НМС. Провести анализ мтДНК индивидуальных клеток в некоторых гибридных клонах для оценки межклональной вариабельности.

Научная новизна и практическая значимость

1. В работе впервые подробно детализированы условия применения полиморфных микросателлитов в качестве маркеров родительских хромосом в меж- и внутривидовых гибридных клетках, полученных слиянием диплоидных ЭС клеток со спленоцитами и эмбриональными фибробластами. Предлагаемый подход имеет хорошую воспроизводимость, менее трудоемок, чем цитогенетический анализ, и позволяет провести быструю оценку хромосомного состава гибридных клеток.

2. С помощью анализа микросателлитов впервые выявлено сохранение всех хромосом плuriпотентного и практически всех соматического партнера, за исключением хромосомы 14, во внутривидовых гибридных клетках, полученных слиянием ЭС клеток с фибробластами, в противоположность выраженной потере соматических хромосом в гибридных клетках типа ЭС-спленоцит. Важно подчеркнуть, что выявление такой сегрегации хромосом у внутривидовых гибридных клеток с помощью традиционных цитогенетических методов возможно лишь для единичных хромосом.

3. С помощью анализа мтДНК впервые показана предпочтительная сегрегация митохондрий соматического партнера в гибридных клетках, полученных слиянием ЭС клеток со спленоцитами другой линии мышей и спленоцитами близкого вида, *M caroli*.

Описанную сегрегацию родительских хромосом и митохондрий соматического партнера следует учитывать при оценке плюрипотентности гибридных клеток и в экспериментах, связанных с изучением механизмов репрограммирования.

Полученные в ходе данной работы результаты используются при чтении лекций спецкурса «Генетика развития» в Новосибирском государственном университете (НГУ).

Апробация работы и публикации.

Результаты работы были представлены на международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2002), на интеграционной междисциплинарной конференции молодых ученых СО РАН и высшей школы (Иркутск, 2003), на международной научной конференции молодых ученых и студентов (Алматы, 2003), на 1-м съезде Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003), на международном симпозиуме «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия» (Санкт-Петербург, 2004), на 3-ем съезде ВОГиС (Москва, 2004), на школе-конференции «Актуальные проблемы биологии развития и биотехнологии» (Москва, 2005), на VI международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Москва, 2005).

Материалы диссертации изложены в 2-х статьях, опубликованных в отечественном и международном журналах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 103-х страницах, иллюстрирована 11-ю рисунками и содержит 13 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы культуры клеток: ЭС клетки линия HM-1 (ГФРТ⁺), 20 первичных ГАТ-резистентных гибридных клонов, полученных от слияния ЭС клеток линии HM-1 *M musculus* и спленоцитов самки азиатской мыши *M caroli* (ГФРТ⁺) (серия НМС); 8 внутривидовых гибридных клонов, полученных от слияния ЭС клеток линии HM-1 *M musculus* со спленоцитами (3 клона, серия HESS) и эмбриональными фибробластами (5 клонов, серия HESF) мыши линии DD/c (ГФРТ⁺). Кроме того, в работе использовали 3 субклона внутривидовых гибридных клонов и 7 субклонов межвидовых гибридных клонов.

Культивирование клеток проводили по методу, описанному Матвеевой с соавторами (Matveeva et. al., 1998).

Выделение ДНК проводили с помощью DNAzol согласно рекомендациям производителя (Life Technology, США), и фенольно-хлороформным методом по Маниатису соавторами (Маниатис и др., 1984).

Для дискриминации хромосом *M. musculus* 120/Ola, *M. musculus* DD/c и *M. caroli* в гибридных клетках использовали метод ПЦР-анализа аллельных вариантов микросателлитов (Dietrich et al., 1992) с описанными в этой работе модификациями.

Для дискриминации родительских мтДНК использовали аллель-специфичный полиморфизм мтДНК. Выделение мтДНК из единичных клеток проводили согласно методу, описанному в работе Зукотти и Монка (Zuccotti, Monk, 1995) с описанными в этой работе модификациями.

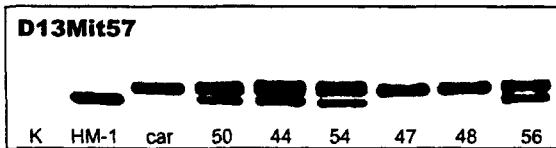
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий ПЦР для аллельных вариантов микросателлитов

Праймеры для микросателлитов, опубликованные в базе данных Джексоновской лаборатории (Jackson Laboratory, <http://www.informatics.jax.org>), были разработаны для проведения ПЦР при «стандартных» для большинства маркеров условиях. Однако последовательности ДНК, гомологичные праймерам, могут различаться у разных линий и, тем более, видов мышей, что может быть причиной отсутствия продукта ПЦР в «стандартных» условиях (Dietrich et al., 1992). В базе данных отсутствовала информация о полиморфизме микросателлитов у мышей линии DD/c и мышей *M. caroli*. Мы провели поиск полиморфных маркеров и из 86-ти микросателлитов выбрали маркеры, позволяющие дискриминировать родительские хромосомы во внутри- и межвидовых гибридных клетках. При анализе клеточных гибридов с помощью молекулярных маркеров следует учитывать возможность сегрегации хромосом одного из партнеров по слиянию и внутриклональную вариабельность хромосомного состава. В таком случае, микросателлиты, маркирующие родительские хромосомы, могут быть представлены в различном количественном соотношении в разных клонах. В связи с этим возникла необходимость в адаптации метода ПЦР микросателлитов для их использования в качестве маркеров родительских хромосом в геноме гибридных клеток. Для каждого маркера были индивидуально подобраны условия ПЦР – температура отжига праймеров и концентрация MgCl₂. Целью оптимизации было нахождение таких условий ПЦР, при которых амплификация обоих аллельных вариантов микросателлитов осуществлялась бы с равной или близкой к этому эффективностью. Нами был определен порог выявления микросателлитов в смеси «родительских» ДНК, который варьирует от 5 до 10%. Достигнутая чувствительность метода для большинства маркеров близка к разрешающей способности цитогенетического метода. При рутинном анализе 20-25 метафазных пластинок чувствительность цитогенетического метода принято оценивать в 4-5%.

На рисунке 1 представлен пример ПЦР-анализа присутствия микросателлитов в гибридных клонах серии НМС.

Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР микросателлитов в межвидовых гибридных клонах серии НМС, на примере маркера хромосомы 13



HM-1 – присутствие продукта ПЦР хромосомо-специфичного микросателлита *M. musculus*,
cat – присутствие продукта ПЦР хромосомо-специфичного микросателлита *M. caroli*,
K – отрицательный контроль (без добавления ДНК).

Номерами обозначены клоны серии НМС.

Сегрегация хромосом во внутривидовых гибридных клонах

Как уже упоминалось, в гибридных клетках нередко наблюдается сегрегация (потеря) хромосом одного из партнеров по слиянию (Рингерц. Сэвидж, 1979). Подсчет числа хромосом в трех клонах HESS2, HESS3 и HESS4 показал, что их кариотипы содержат от 41 до 43 хромосом вместо ожидаемых 80-ти, что свидетельствует о сегрегации хромосом (Matveeva et al., 1998; Матвеева и др.. 2001). В противоположность этим данным, проведенный подсчет хромосом в клонах серии HESF показал присутствие в их кариотипах от 70-ти до 80-ти хромосом, что указывает на умеренную сегрегацию хромосом.

Возникает вопрос, сегрегация хромосом какого родителя происходит в клонах серии HESS и HESF? Хромосомный состав гибридных клонов HESS был проанализирован ранее (Матвеева и др., 2001), однако, после оптимизации метода и добавления новых маркеров, анализ этих клонов был проведен нами повторно. Всего было исследовано 3 первичных клона серии HESS, 5 первичных клонов серии HESF и субклоны HESF1-1, HESF3-1, HESF5-2, полученные из индивидуальных клеток соответствующих первичных клонов. В таблице 1 представлены суммарные результаты анализа микросателлитов, маркирующих родительские хромосомы в гибридных клетках серий HESS и HESF.

Следует отметить сохранение маркеров всех хромосом плuriпотентного партнера в клонах внутривидовых гибридных клеток. В то же время мы наблюдали интенсивную потерю маркеров хромосом соматического партнера в клонах серии HESS и сохранение всех, или практически всех маркеров хромосом соматического партнера в клонах серии HESF. В гибридных клонах серии HESF отмечено только отсутствие аллельного варианта микросателлита D14Mit38, маркирующего хромосому 14 мышей линии DD/c, в клонах HESF1, HESF3 и трех субклонах. Таким образом, данные о присутствии хромосомо-специфичных микросателлитов и результаты подсчета хромосом в клонах серии HESF свидетельствуют об умеренной сегрегации родительских хромосом, в отличие от клонов серии HESS, где наблюдается потеря большинства хромосом соматического партнера. Различия в сегрегации хромосом в клонах HESS и HESF, вероятно, связаны с типом клеток соматического партнера, участвовавших в гибридизации.

Таблица 1. Распределение хромосомо-специфичных микросателлитов линии мышей DD/c во внутривидовых гибридных клонах

N	Маркер	Клоны серии HESS			Клоны серии HESF					Субклоны HESF		
		2	3	4	1	2	3	4	5	1-1	3-1	5-2
1	D1Mit200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	D2Mit9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	D3Mi218	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	D4Mit11	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
5	D5Mit346	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	D6Mit201	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	D7Mit309	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	D8Mit248	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	D9Mit181	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	D10Mit109	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	D11Mit2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	D12Mit270	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D13Mit10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
14	D14Mit38	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
15	D15Mit14	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	D16Mit4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
17	D17Mit66	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
18	D18Mit36	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
19	D19Mit10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
X	DXMit159	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

N – хромосомная локализация микросателлита,

(+) – присутствие хромосомо-специфичного микросателлита DD/c,

(-) – отсутствие хромосомо-специфичного микросателлита DD/c.

Все хромосомо-специфичные микросателлиты ЭС клеток НМ-1 выявляются во всех гибридных клонах и субклонах, в таблице они не показаны

Сегрегация хромосом в межвидовых гибридных клонах

С помощью анализа микросателлитов в 20-ти клонах серии НМС было проведено первое описание поведения родительских гомеологов 17-ти аутосом в клонах межвидовых гибридных клеток типа ЭС-соматическая клетка.

Из данных таблицы 2 следует, что из 20-ти исследованных клонов в 13-ти отмечена потеря микросателлитов, маркирующих хромосомы исключительно *M. caroli*, при сохранении всех маркеров *M. musculus*. Наиболее значительная потеря маркеров хромосом *M. caroli* была отмечена в 5-ти клонах: НМС15, НМС47, НМС48, НМС54 и НМС58, в которых выявлено от 3-х до 8-ми маркеров хромосом соматического партнера. В 8-ми клонах наблюдалась умеренная потеря

микросателлитов *M. caroli*, например, в клонах HMC29, HMC30 и HMC56. Семь клонов сохраняли все маркеры хромосом *M. caroli*.

В целом, проведенный анализ микросателлитов в гибридных клонах серии HMC выявил выраженную межклональную вариабельность как по количеству хромосом соматического партнера, так и по содержанию индивидуальных хромосом. Условно можно выделить три типа клонов: сохраняющие все маркеры хромосом соматического партнера, с умеренной потерей маркеров хромосом соматического партнера (менее 10-ти) и с отсутствием большинства маркеров соматического партнера.

Как упоминалось выше, в ряде исследований показано, что гибридные клетки мыши типа ЭС-дифференцированная клетка сохраняют тетраплоидный набор хромосом, появившийся в результате слияния двух диплоидных клеток (Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). При сопоставлении наших данных с результатами этих исследователей необходимо отметить несколько существенных отличий в способах получения гибридных клеток типа ЭС-соматическая клетка. Во-первых, для получения гибридных клеток использовался полизтиленгликоль, индуцирующий слияние любых типов клеток (Рингерц, Свидж, 1979), тогда как Тада с соавторами (Tada et al., 2001; 2003) получали гибриды типа ЭС-тимоцит посредством электрослияния. Образование гибридных клеток в экспериментах других исследователей (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Wang et al., 2002) происходило путем спонтанного слияния родительских клеток либо *in vitro*, либо *in vivo*. Известно, что разные типы клеток различаются по склонности к спонтанному слиянию, наиболее присущему макрофагам (Wang et al., 2002). К этому следует добавить, что анализ микросателлитов, позволяющий идентифицировать родительские хромосомы в гибридных клетках, проводился нами для большинства клонов гибридных клеток на 14-30 пассажах, тогда как для описанных гибридных клеток подсчет хромосом и ограниченный цитогенетический анализ осуществлялся на более ранних пассажах (не позднее 10-го), кроме того, в цитируемых работах дискриминация родительских аутосом не проводилась (Tada et al., 2001; 2003; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Возможно, выбор плорипотентного партнера также оказывает влияние на сегрегацию хромосом в гибридных клетках. Так, по данным Тада (Tada et al., 2003) 62% гибридных клеток, полученных слиянием ЭС клеток линии NM-1 с тимоцитами, сохраняли тетраплоидный набор хромосом, тогда как гибридные клетки, полученные от слияния ЭС-клеток линии MP4 *M. musculus molossinus* с тимоцитами, все были тетраплоидными.

Таблица 2 Распределение хромосомо-специфичных микросателлитов *M. caroli* в клонах гибридных клеток серии НМС

N	Маркер	Гибридные клонсы серии НМС																			
		1	2	4	6	15	21	23	27	28	29	30	41	42	44	47	48	50	54	56	58
1	D1Mit200	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
2	D2Mit9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
3	D3Mit103	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
4	D4Mit111	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
5	D5Mit346	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-
6	D6Mit102	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
7	D7Mit17	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	±	+	+	+	-	-	+	-	+	-
8	D8Mit248	+	+	+	+	±	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
9	D9Mit181	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	±	+	-	+	±
10	D10Mit109	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
11	D11Mit67	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
12	D12Mit270	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	±
13	D13Mit57	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	-
14	D14Mit11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
15	D15Mit14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	±	+	±	+	±
16	D16Mit4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
17	D17Mit66	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
18	D18Mit135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
19	D19Mit78	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
X	DXMit31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

N – хромосомная локализация микросателлита,

(+) – присутствие продукта ПЦР хромосомо-специфичного микросателлита *M. caroli*,

(–) – отсутствие продукта ПЦР хромосомо-специфичного микросателлита *M. caroli*,

(±) – нестабильность выявления маркера при анализе клонов на разных пассажах культивирования.

Во всех гибридных клонах серии НМС были выявлены микросателлиты, маркирующие все хромосомы плuriпотентного партнера, в таблице они не представлены.

Межклональная вариабельность межвидовых гибридных клонов по содержанию хромосом соматического партнера может быть связана с гетерогенностью популяции спленоцитов. В селезенке встречаются как зрелые неделяющиеся лимфоциты, так и активно делящиеся клетки, в том числе гемопоэтические клетки, близкие по свойствам к стволовым клеткам. Известно, что при несовпадении клеточных циклов в первые моменты после слияния может наблюдаться интенсивная сегрегация хромосом (Рингерц, Сэвидж, 1979). Можно предположить, при слиянии ЭС клеток с неделяющимися клетками, такими как зрелые В-лимфоциты, происходит интенсивная сегрегация хромосом соматического партнера, а при слиянии с активно делящимися клетками хромосомы соматического партнера сохраняются с большей вероятностью.

Сегрегация митохондрий во внутривидовых гибридных клонах

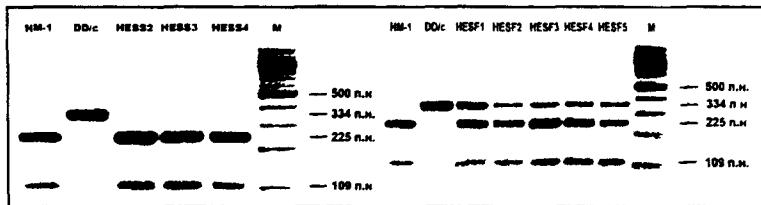
Для дискриминации митохондрий во внутривидовых гибридных клонах мы использовали полиморфизм mtДНК. Нами были секвенированы несколько последовательностей mtДНК мышей линий 129/Ola и DD/c и в гене третьей субъединицы цитохромоксидазы была найдена нуклеотидная замена A-G в положении 9348 между мышами линий 129/Ola (GenBank Ac. No. AY836751) и DD/c (GenBank Ac. No. AY836752). В последовательности mtДНК мышей линии 129/Ola был идентифицирован сайт для рестриктаазы *Tth*III, который отсутствует у DD/c. Порог выявления mtДНК DD/c в смеси продуктов ПЦР mtДНК двух родительских линий мышей составляет 2%.

Анализ mtДНК во внутривидовых гибридных клонах показал, что все клонны от слияния ЭС клеток со спленоцитами не содержат mtДНК соматического происхождения при пороге выявления mtДНК DD/c 2%. В то же время, все пять клонов от слияния ЭС клеток с эмбриональными фибробластами содержали mtДНК как плорипotentного, так и соматического партнера (Рис. 1). Сохранение родительских mtДНК обоих типов свидетельствует об отсутствии заметной сегрегации родительских митохондрий в гибридных клетках такого типа.

Суммируя данные анализа родительских mtДНК в клонах внутривидовых гибридных клеток, можно отметить зависимость сегрегации митохондрий от типа соматического партнера. Мы наблюдали потерю mtДНК в гибридных клонах типа ЭС-спленоцит и сохранение обоих родительских типов mtДНК в гибридных клонах типа ЭС-эмбриональный фибробласт. Возможно, различия в сегрегации mtДНК в этих типах гибридных клеток объясняются разным числом митохондрий в родительских клетках. Например, можно предположить, что количество митохондрий, вносимых в гибридную клетку спленоцитом, существенно меньше, чем количество митохондрий в ЭС клетках. В этом случае сегрегация митохондрий спленоцитов будет происходить с большей вероятностью из-за случайных процессов. Известно, что фибробласты человека содержат 1600-2000 молекул mtДНК (Legros et al., 2004), в то время как лимфоциты содержат 240-420 молекул mtДНК (Szuhai et al., 2001), а моноциты периферической крови около 400 (Gahan et al., 2001). Кроме того, митохондрии могут содержать более одной молекулы mtДНК в зависимости от клеточного типа. Однако сложно корректно оценить роль

этих факторов, так как отсутствуют данные о количестве митохондрий в ЭС клетках.

Рис. 1. Идентификация родительских mtДНК в клонах серий HESS и HESF



M – маркер с шагом 100 п.н (Ladder 100 bp, Medigen).

HM-1 – продукты обработки фрагмента mtДНК клеток HM-1 рестриктазой *Tth111I*;
DD/c – фрагмент mtДНК мышей линии DD/c.

Другое объяснение различий в сегрегации митохондрий между гибридами типа ЭС-сплоноцит и ЭС-эмбриональный фибробласт – возможная различная организация митохондрий в сплоноцитах и эмбриональных фибробластах. Так, для фибробластов человека в культуре показано, что mtДНК организована в нуклеоиды (нуклеопротеиновые комплексы), обогащенные mtTFA (митохондриальный транскрипционный фактор А). Каждый нуклеоид содержит от 2-х до 8-ми молекул mtДНК, в среднем 2.3 молекулы. Более того, показан обмен молекулами mtДНК между отдельными митохондриями (Legros et al., 2004). Показано также, что у млекопитающих может происходить слияние митохондрий (Ishihara et al., 2003; Mattenberger et al.. 2003). То есть, при образовании гибридных клеток, родительские митохондрии, возможно, могут сливаться или обмениваться молекулами mtДНК. Для объяснения случаев стабильного сохранения гетероплазмии по mtДНК была предложена гипотеза митохондриального нуклеоида (Jacobs et al., 2000). По этой гипотезе, группа молекул mtДНК объединена в нуклеоид и при репликации образуются дочерние нуклеоиды, генетически идентичные. При этом нуклеоид может содержать генетически различающиеся копии молекул mtДНК. То есть, возможно, присутствие mtДНК обоих родительских типов в гибридных клетках типа ЭС-фибробласт можно объяснить такого рода гетероплазмийей.

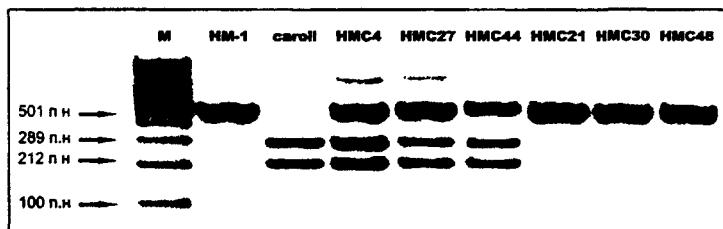
Сегрегация митохондрий в межвидовых гибридных клонах

При анализе родительских mtДНК в клонах межвидовых гибридных клеток серии НМС мы использовали подход, аналогичный изложенному выше. Район D-петли mtДНК *M caroli* был секвенирован сотрудником лаборатории Д.М. Ларкиным и в последовательности *M caroli* был идентифицирован сайт для рестриктазы *Dra*I, который отсутствует у *M musculus*. Порог выявления mtДНК *M caroli* в смеси продуктов ПЦР mtДНК двух родительских видов составляет 0,2%.

Анализ mtДНК в клонах серии НМС показал, что из 20-ти исследованных клонов в 17-ти присутствует mtДНК только плорипотентного партнера, тогда как в

3-х клонах – HMC4, HMC27 и HMC44, присутствует mtДНК обоих родительских видов. В качестве примера, на рис. 2 приведены результаты анализа родительских mtДНК в клонах HMC4, HMC27, HMC44, HMC21, HMC30 и HMC48.

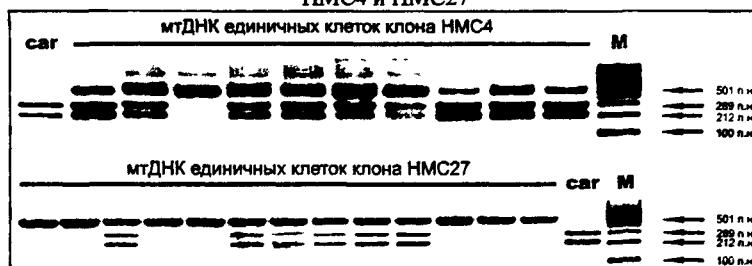
Рис. 2. Идентификация родительских mtДНК в клонах серии HMC



M – маркер с шагом 100 п.н. (Ladder 100 bp, Medigen), фрагмент 100 п.н. подписан на рисунке;
HM-1 – фрагмент mtДНК мышьей *M. musculus*;
caroli – продукты обработки фрагмента mtДНК *M. caroli* рестриктазой *Dra*I

Для оценки внутриклональной вариабельности мы провели анализ mtДНК в индивидуальных клетках в клонах HMC4 и HMC27. На рис. 3 представлены результаты этого анализа.

Рис. 3. Идентификация родительских mtДНК в индивидуальных клетках клонов HMC4 и HMC27



car – продукты обработки фрагмента mtДНК *M. caroli* рестриктазой *Dra*I,
M – маркер с шагом 100 п.н. (Ladder 100 bp, Medigen), фрагмент 100 п.н. подписан на рисунке

Анализ mtДНК 31-й клетки клона HMC4 показал, что единичные клетки могут содержать mtДНК как исключительно соматического партнера, так и плорипотентного. В то же время, есть и промежуточные варианты. Такое распределение генотипов свидетельствует о том, что в клоне HMC4 происходит случайная двусторонняя сегрегация родительских митохондрий. В клоне HMC27 при анализе суммарной ДНК наблюдается преобладание mtДНК плорипотентного партнера. В то же время, анализ единичных клеток показал, что часть клеток HMC27 содержит mtДНК только плорипотентного партнера, в то время как

остальные клетки содержат mtДНК обоих родительских типов. Наличие клеток с приблизительно равным соотношением родительских mtДНК, то есть с существенно большей долей mtДНК *M. caroli*, чем в среднем в популяции, свидетельствует в пользу предположения о случайной сегрегации родительских митохондрий и в клоне НМС27.

Можно предположить несколько причин, объясняющих предпочтительную сегрегацию mtДНК соматического партнера в большинстве межвидовых гибридных клонов. Во-первых, может существенно различаться количество митохондрий в родительских клетках. В этом случае, вследствие случайных процессов, в гибридной клетке с большей вероятностью останутся митохондрии партнера, имеющего большее число митохондрий. Во-вторых, последовательности mtДНК D-петли *M. caroli* и *M. musculus* существенно отличаются (около 20% различий), что может сказываться на скорости репликации mtДНК различного родительского происхождения. Однако анализ mtДНК единичных клеток клона НМС4 показывает, что отличия в последовательности D-петли не приводят к преимущественной сегрегации митохондрий одного из партнеров.

Подводя итоги изучения родительских mtДНК в клонах гибридных клеток серии НМС, можно сделать вывод, что, как и в случае внутривидовых гибридных клеток, имеет место предпочтительная потеря митохондрий соматического партнера в большинстве клонов серии НМС. В то же время, в одном из клонов этой серии, НМС4, не выявлено признаков предпочтительной утраты митохондрий соматического партнера. Более того, анализ индивидуальных клеток этого клона свидетельствует о двусторонней сегрегации митохондрий, по-видимому, равновероятной.

Возможно различие в сегрегации митохондрий в гибридных клетках серий HESS, HESF и НМС, объясняется различиями в скорости репликации mtДНК в родительских типах клеток. Известно, что скорость репликации митохондрий различна для разных типов клеток. Логично предположить, что в быстро делящихся ЭС клетках репликация митохондрий происходит быстро, так как ЭС клетки имеют короткий клеточный цикл. После объединения родительских цитоплазм в гибридной клетке, митохондрии спленоцитов *M. caroli* могут какое-то время сохранять низкую скорость репликации и, соответственно, их доля в геноме гибридных клеток будет уменьшаться. Различия в скорости деления митохондрий, возможно, объясняют сегрегацию митохондрий во внутривидовых клонах от слияния со спленоцитами и сохранение обоих типов mtДНК в гибридах от слияния с эмбриональными фибробластами. Время удвоения ЭС клеток составляет 10-12 часов, фибробластов – 22-24 часа. Соответственно, митохондрии ЭС клеток и фибробластов могут обладать сходной скоростью репликации, в отличие от митохондрий спленоцитов, которые активно не делятся.

Возникает вопрос о связи между сегрегацией родительских хромосом и митохондрий. Сравнение гибридных клонов серий HESS и HESF показывает, что в клонах серии HESS наблюдается предпочтительная сегрегация хромосом соматического происхождения и mtДНК соматического партнера, а в клонах серии

HESF – сохранение как хромосом, так и мтДНК обоих партнеров. То есть, наблюдается тенденция к совместной потере или, наоборот, присутствию хромосом и мтДНК соматического партнера. Однако анализ гибридных клонов серии HMC показывает, что, несмотря тенденцию к сохранению всех маркеров хромосом и мтДНК соматического партнера в клонах HMC4 и HMC44, в ряде клонов, в которых отсутствуют признаки сегрегации хромосом, отсутствует мтДНК спленоцитов, например, в клоне HMC41. В то же время, в клоне HMC27 выявлена умеренная потеря хромосом соматического партнера, но присутствуют оба типа мтДНК. Таким образом, направление сегрегации сходно как в ядерных, так и в митохондриальных геномах, но однозначной связи между этими процессами не выявляется.

Проведенный анализ хромосомного состава позволит в дальнейшем проводить исследование плюрипотентности полученных клонов. Следует подчеркнуть, что незнание реального соотношения хромосом родительских геномов исследователями, изучающими репрограммирование соматического генома на уровне отдельных генов и, особенно, на геномном уровне, например, с применением микрочиповой технологии, потенциально может привести к получению некорректных результатов. Полученные данные показывают, что микросателлитный анализ, позволяющий дискриминировать родительские хромосомы, является адекватным способом описания хромосомного состава гибридных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из 86-ти тестированных микросателлитов проведен подбор полиморфных маркеров, которые позволяют дискриминировать гомеологии всех хромосом *M. musculus* и азиатской мыши *M. caroli*. Выявлено 10 новых микросателлитов, способных надежно дискриминировать гомологи 10-ти хромосом мышей линий 129/Ola и DD/c. Отобранные микросателлиты позволили идентифицировать родительские хромосомы в меж- и внутривидовых гибридных клетках типа ЭС-спленоцит и ЭС-фибробласт.
2. Установлено, что в 5-ти клонах гибридных клеток типа ЭС-фибробласт присутствуют практически все маркеры хромосом соматического партнера, за исключением маркера хромосомы 14 в 2-х клонах, а также все маркеры хромосом плюрипотентного партнера. Умеренная потеря хромосом соматического партнера контрастирует с выраженной потерей этих хромосом в гибридных клетках типа ЭС-спленоцит.
3. Анализ микросателлитов в 20-ти клонах межвидовых гибридных клеток, полученных слиянием ЭС клеток *M. musculus* и спленоцитов *M. caroli*, показал сохранение всех маркеров хромосом плюрипотентного партнера, тогда как присутствие маркеров хромосом соматического партнера значительно варьировало в разных клонах. По этому критерию клонам делятся на три группы: с присутствием всех маркеров хромосом соматического партнера, с умеренной потерей маркеров

хромосом соматического партнера и с отсутствием большинства маркеров соматического партнера. Впервые показана предпочтительная сегрегация 17-ти индивидуальных хромосом соматического партнера.

4. Впервые показано, что во внутривидовых гибридных клонах, полученных от слияния ЭС клеток со спленоцитами, происходит полная потеря мтДНК соматического партнера при сохранении мтДНК ЭС клеток, в то же время в гибридных клетках типа ЭС-фибробласт наблюдается сохранение мтДНК как плорипotentного, так и соматического партнёров, то есть отсутствуют признаки сегрегации родительских митохондрий.

5. Показано, что в 17-ти исследованных межвидовых гибридных клонах присутствует мтДНК только плорипotentного партнера, тогда как в 3-х клонах (HMC4, HMC27 и HMC44), присутствует мтДНК обоих родительских видов. Таким образом, впервые установлена предпочтительная сегрегация митохондрий соматического партнера в большинстве клонов гибридных клеток типа ЭС-спленоцит.

6. С помощью анализа индивидуальных клеток гибридных клонов, в которых присутствует мтДНК обоих родительских видов, установлено, что сегрегация родительских митохондрий в этих клонах носит случайный двусторонний характер.

7. Сопоставление сегрегации маркеров родительских хромосом и мтДНК показывает предпочтительную сегрегацию как хромосом, так и митохондрий соматического партнера в гибридных клетках, полученных от слияния ЭС и соматических клеток, хотя прямой связи между этими процессами не выявлено.

Список публикаций по теме диссертации:

1. Пристяжнюк И.Е., Темирова С.А., Мензоров А.Г., Круглова А.А., Матвеева Н.М., Серов О.Л. Видимая и «скрытая» сегрегация родительских хромосом в эмбриональных стволовых гибридных клетках // Онтогенез. 2005. Т. 36, № 2. С. 151-158.
2. Matveeva N.M., Pristyazhnyuk I.E., Temirova S.A., Menzorov A.G., Vasilkova A.A., Shilov A.G., Smith A., Serov O.L. Unequal segregation of parental chromosomes in embryonic stem cell hybrids // Mol. Reprod. Dev. 2005. V. 71. P. 305-314.
3. Матвеева Н.М., Пристяжнюк И.Е., Пузаков М.В., Мензоров А.Г., Василькова А.А., Голубица А.Н., Железова А.И., Темирова С.А., Серов О.Л. Эмбриональные стволовые гибридные клетки – модель для изучения контроля плорипотентности в условиях *in vitro* // Цитология. Санкт-Петербург. 2004 Т. 46, № 10. С. 927-928.
4. Мензоров А.Г. Сегрегация хромосом во внутривидовых клеточных гибридах, полученных от слияния эмбриональных стволовых и соматических клеток мыши // Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии (23-25 апреля 2003 г., г. Алматы): Тезисы III международной научной конференции молодых ученых и студентов, посвященной 70-летию Казахского

национального университета имени аль-Фараби. Казахский национальный университет имени аль-Фараби. Алматы. 2003. С. 114.

5. Мензоров А.Г., Круглова А.А., Матвеева Н.М., Серов О.Л. Сегрегация хромосом и митохондрий в межвидовых эмбриональных гибридных клетках мыши. Труды 3-го съезда ВОГиС. Москва. 6-12 июня 2004. Т. 2. С. 403.
6. Мензоров А.Г., Круглова А.А., Темирова С.А., Серов О.Л. Характеристика ядерного и митохондриального геномов во внутри- и межвидовых эмбриональных стволовых гибридных клетках мыши // VI Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. Звенигород. Москва. 2005. С. 99-100.
7. Мензоров А.Г., Круглова А.А., Шилов А.Г., Матвеева Н.М. Использование микросателлитов для идентификации родительских хромосом в эмбриональных гибридных клетках // Научные школы Сибири: взгляд в будущее. Труды второй интеграционной междисциплинарной конференции молодых ученых СО РАН и высшей школы (Иркутск, 6-10 октября 2003 г.). Издательство Института географии СО РАН. Иркутск. 2003. С. 107-108.
8. Мензоров А.Г., Серов О.Л.. Сегрегация митохондрий во внутри- и межвидовых эмбриональных гибридных клетках мыши // Онтогенез. 2005. Т. 36, № 5. С. 383.
9. Пузаков М.В., Кизилова Е.А., Матвеева Н.М., Шилов А.Г., Мензоров А.Г., Василькова А.А., Серов О.Л. *In vitro*-анализ плорипотентности клеточных гибридов, полученных от слияния эмбриональных стволовых клеток и спленоцитов мыши // Цитология. 2003. Т. 45, № 9. С. 917-918.
10. Серегин А.В., Пузаков М.В., Мензоров А.Г. Сегрегация хромосом во внутривидовых и межвидовых клеточных гибридах, полученных от слияния эмбриональных стволовых и соматических клеток мыши и анализ их плорипотентности // Материалы XL Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология Новосиб. гос. университет. Новосибирск. 2002. С. 101-103.

Подписано к печати 1/II 2006
Формат бумаги 60 × 90 1/16. Печ. л. 1. Уч. изд. л. 0,7.
Тираж 100 экз. Заказ 6.

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.

2006A

3633

P - 3633