

## ЦИТОГЕНЕТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*В.И. Турилова, Т.К. Яковлева*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [tyak@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:tyak@mail.cytspb.rssi.ru)

Развитие техники культивирования клеток, получение постоянных клеточных линий человека и животных и создание в 1978 г. Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур (РККК) стимулировали изучение кариотипов клеточных линий. Основоположителем и координатором работы РККК был профессор Георгий Петрович Пинаев. Центральным банком РККК была определена Коллекция культивируемых клеток позвоночных Института цитологии РАН (ИНЦ РАН), входившая в созданный Г.П. Пинаевым Отдел клеточных культур. Г.П. Пинаев был инициатором исследований по цитогенетике культивируемых клеток, поступавших на хранение в коллекцию ИНЦ РАН. Г.П. Пинаев нашел единомышленников в лице научного сотрудника Лаборатории морфологии клетки ИНЦ РАН, к.б.н. С.Е. Мамаевой и ее учеников. Усилиями этой мощной команды был выполнен цитогенетический анализ самых разнообразных клеточных линий человека и животных. Разработаны подходы к цитогенетическому анализу клеточных линий и критерии объективной оценки его результатов. Сформулированы закономерности кариотипической изменчивости клеточных линий, которые, как оказалось в результате дальнейших исследований, имеют универсальный характер.

Таким образом, в нашей стране было заложено новое направление в биологии клетки в культуре — цитогенетика постоянных клеточных линий человека и животных. Основы и развитие представлений о кариотипической изменчивости клеточных линий, полученных из разных типов новообразований человека, кратко обсуждаются в настоящей работе.

**Ключевые слова:** клеточные линии, полученные из опухолей человека, хромосомная нестабильность, кариотипическая изменчивость, закономерности кариотипической изменчивости.

В эволюции клеток в культуре можно выделить две качественно различные стадии, различающиеся по уровню кариотипической гетерогенности: стадию становления и стадию

стабилизации клеточной линии. На стадии становления, которая отличается выраженной кариотипической гетерогенностью, ведущую роль играет отбор клонов клеток, наиболее приспособленных к существованию в условиях *in vitro*. Стадия стабилизации характеризуется снижением кариотипической гетерогенности и формированием сбалансированной кариотипической структуры клеточной популяции (1). Установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенном соотношении клеток с основным и дополнительными структурными вариантами кариотипа (2, 3). Сбалансированная кариотипическая структура, несмотря на значительную гетерогенность клеточных популяций, была выявлена в разных линиях опухолевого происхождения: в сублиниях HeLa (4, 5), клеточной линии Raji (6) и линиях множественной миеломы (7).

Стадия стабилизации, по-видимому, также неоднородна по вариабельности хромосомного материала и сочетает в себе чередующиеся циклы более и менее выраженной хромосомной нестабильности (8). Когда геном нестабилен (главным образом, под влиянием условий культивирования), наряду с клональными перестройками хромосом появляются неклональные, которые создают генетическое разнообразие, некий эволюционный ресурс, что и обеспечивает выживание клеточной популяции, ее адаптацию к менее благоприятным условиям. При оптимальных условиях культивирования уровень неклональных перестроек может уменьшаться и даже исчезать. На этой фазе кариотип оказывается более стабильным, и клональные перестройки обеспечивают пролиферацию клеток (8). При этом изменение структуры кариотипа может отражаться на комплексе других биологических свойств культивируемых клеток. Следовательно, вопросы об ограничениях, характере и направленности кариотипической изменчивости клеточных линий в условиях их длительного существования в культуре приобретают чрезвычайную актуальность.

Фундаментальный вопрос об эволюции опухолевых клеток *in vitro* заключается в понимании природы культивируемых клеток. Исследования гетерогенности опухолей *in vivo* предполагают два возможных пути прогрессии. Согласно модели клональной эволюции стохастические генетические и/или эпигенетические изменения обеспечивают селективные преимущества доминантному клону, поэтому его опухолевые клетки обладают сходным туморогенным потенциалом (9). Согласно модели опухолевых стволовых клеток, подразумевающей иерархическую организацию, только небольшая часть клеток является туморогенными и создает гетерогенность популяции в процессе дифференцировки (10). По-видимому, динамика популяции опухолевых клеток на разных стадиях прогрессии

преимущественно соответствует то одной, то другой модели. При этом клетки со стволовыми свойствами обеспечивают генетическое разнообразие популяции, а отбор поддерживает наиболее приспособленные варианты (так называемая модель «Back to Darwin», 10). Такая модель вполне согласуется с циклами более и менее выраженной хромосомной нестабильности при эволюции генома опухолевых клеток *in vivo* (8). По-видимому, она отчасти справедлива и для опухолевых клеток в культуре и может объяснять кариотипическую гетерогенность, изменение уровня ploидности клеток, особенно на стадии становления клеточной линии, скорость нарастания хромосомных перестроек и характер кариотипической изменчивости при прогрессии клеток в культуре, наконец, саму возможность получения клеточной линии.

Самым действенным фактором, обуславливающим изменение кариотипа клеток *in vitro*, являются условия культивирования (3, 11). Уже в первой серии работ по цитогенетике старейшей клеточной линии HeLa при непосредственном участии Г.П. Пинаева было продемонстрировано влияние условий культивирования на изменчивость кариотипа клеток и роль отбора в становлении клеточных популяций, культивируемых разными способами (12, 13). Так, при смене способа культивирования клеток M-HeLa со статического на роллерное обнаружено уменьшение числа хромосом в кариотипе, появление новых структурно перестроенных хромосом и, главным образом, перераспределение в популяции доли клеток с ранее выявленными вариантами кариотипа.

Исследования кариотипической изменчивости «безмаркерных» (не имеющих в своем кариотипе структурно перестроенных хромосом) клеточных линий на стадии стабилизации убедительно показали, что отбор в клеточных популяциях происходит не по отдельным хромосомам, а по сбалансированному кариотипу (2). Ограничение количественной и структурной хромосомной нестабильности и стабилизирующая роль отбора были обнаружены и при клональной эволюции клеточных линий карцином толстой кишки (14, 15), яичника (15), и в стволовых клеточных линиях глиомы (16).

Кроме того, в работах по изучению кариотипической изменчивости «безмаркерных» клеточных линий под влиянием факторов культивирования была показана зависимость характера кариотипической изменчивости от исходной структуры кариотипа клеток (11). Структура кариотипа клеточных линий опухолевого происхождения (комплекс численных и структурных перестроек хромосом) определяется тканеспецифическими механизмами онкогенеза. Однако, вопрос о том, в какой степени механизм геномной нестабильности,

лежащий в основе возникновения того или иного типа неоплазий, определяет изменения структуры кариотипа опухолевых клеток при их длительном существовании *in vitro*, остается открытым.

Первым подходом к цитогенетическому анализу клеточных линий с перестроенным кариотипом (G-окрашивание хромосом), позволяющим получить объективную оценку его результатов, был предложенный С.Е. Мамаевой прием построения обобщенного реконструированного кариотипа (ОРК) клеточной линии (4, 13). Прием заключался в реконструкции нормальных хромосом из фрагментов, входящих в состав структурно перестроенных, и построении, таким образом, реконструированного кариотипа клетки, а при анализе 15—25 (до 100) метафазных пластинок — ОРК клеточной линии.

Важно подчеркнуть, что и в настоящее время принципы цитогенетического анализа клеточных линий, основанные на представлении о четкой корреляции между наборами нормальных и аномальных хромосом и построении ОРК, оказываются чрезвычайно полезными при изучении клеточных линий с неизвестным кариотипом и оценке кариотипической структуры клеточных популяций, тем более что в нашей стране метод G-окрашивания хромосом остается наиболее доступным.

Построение ОРК клеточных линий, полученных из опухолей разного тканевого происхождения, позволило выявить ряд закономерностей кариотипической изменчивости опухолевых клеток в культуре (1).

ОРК дал возможность выявить неслучайный характер вовлечения хромосом и хромосомных локусов в численные и структурные перестройки и оценить постоянство и вариабельность хромосомного материала в кариотипе. Впервые было показано, что в культивируемых клетках *in vitro* обеспечивается сохранение как минимум диплоидности по всем хромосомам нормального набора с экстракопированием строго определенных для каждой клеточной линии хромосом и хромосомных районов (17). Таким образом, отбор при становлении клеточной линии идет в направлении клеток, имеющих, по меньшей мере, диплоидное число хромосом, несмотря на то, что в кариотипе могут быть численно и структурно перестроенные хромосомы. В то же время в культивируемых опухолевых клетках могут быть выявлены небольшие потери хромосомного материала (в том числе нуллисомии) (16), которые, безусловно, значимы для онкогенеза, но несопоставимы по масштабу с утратой хромосомного материала, обнаруживаемой в клетках *in vivo* (18). В настоящее время феномен «диплоидности» культивируемых опухолевых клеток остается малоизученным.

Присутствие в кариотипе двух гомологов или копий хромосом каждой пары не исключает генетических дефектов. Как было показано, существенную роль в туморогенезе играет однородительская дисомия, ОРД (uniparental disomy, UPD), которая обнаружена во множестве типов опухолей человека (19). ОРД представляет тип хромосомных аномалий, когда в нормальном диплоидном кариотипе человека пара гомологов представлена хромосомами только одного из родителей. В соматических клетках ОРД возникает в результате митотической рекомбинации и приводит к потере гетерозиготности, как по отдельным хромосомам, так и по отдельным хромосомным локусам без изменения числа копий ДНК (19). ОРД часто маскирует предшествующие генетические (мутации, делеции) и эпигенетические (метилирование) изменения, которые затрагивают как гены, в том числе, импринтированные, так и последовательности микроРНК (20). ОРД рассматривают как один из ключевых механизмов инактивации супрессорных генов и/или активации онкогенов (20).

Очевидно, что в клеточных линиях гомологичные хромосомы могут быть представлены измененными копиями и/или имеет место экстракопирование хромосом и хромосомных районов, содержащих скорее аномальные гены, что приводит к поддержанию опухолевого фенотипа и увеличению пролиферативного потенциала клеток.

Внедрение методов молекулярной цитогенетики (различных вариантов гибридизации ДНК *in situ* с использованием проб на центромерные районы, целые хромосомы и отдельные хромосомные локусы, сравнительной геномной гибридизации, comparative genome hybridization, CGH) и анализа геномного профиля (arrayCGH, single nucleotide polymorphism, SNP-based mapping) позволило подтвердить справедливость представлений о структуре кариотипа опухолевых клеточных линий, полученных на основе методов классической цитогенетики (21).

Стало очевидно, что в клеточных линиях, полученных из разных типов неоплазий человека, вовлечение хромосом и хромосомных локусов в перестройки имеет опухолеспецифический характер (7, 22—24). В опухолевых клетках *in vitro* сохраняются не только первичные онкогенные транслокации и/или делеции, но и весь комплекс реаранжировок генома опухолевых клеток *in vivo*. Сохраняется, поддерживается и углубляется специфический для определенных типов опухолей хромосомный дисбаланс, причем его углубление, возможно, происходит также посредством опухолеспецифических механизмов. Например, в процессе культивирования клеток K562 происходит экстракопирование реаранжированного фрагмента хромосом 9 и 22, содержащего гибридный ген *BCR/ABL1*, в составе хромосомы

der(22)t(9;13;22)(q34;q31;q11) (25), а в клеточных линиях острого миелобластного лейкоза с делецией длинного плеча хромосомы 5 в кариотипе — экстракопирование фрагментов хромосом 8 и 11, содержащих патогенетически значимые гены *MYC* и *MLL* (26).

Опухолевые клеточные линии преимущественно используются в качестве моделей для изучения механизмов возникновения и прогрессии новообразований (23) и оценки эффективности противоопухолевых препаратов (27). Более того, представления о молекулярном патогенезе отдельных типов неоплазий человека получены именно при всестороннем исследовании клеточных линий. Существенно меньше внимания уделяется исследованию закономерностей кариотипической изменчивости популяций опухолевых клеток *in vitro* как автономных динамических систем.

Гетерогенность каждого типа новообразований по генетическим, морфологическим, клиническим характеристикам, с одной стороны, и получение все возрастающего числа клеточных линий — с другой, свидетельствуют об уникальности клеточных линий, сохранении ими опухолевой индивидуальности (реализация определенного механизма патогенеза в индивидуальном геноме). Показательным является отсутствие одинаковых структурных перестроек хромосом в линиях одного опухолевого происхождения. Скорее, сходный паттерн изменений числа копий ДНК (копийный дисбаланс), достигаемый различными механизмами, объединяет клеточные линии в рамках одного типа опухолевых заболеваний (22, 24). Поэтому для исследования механизмов молекулярного патогенеза и первичного тестирования потенциальных противоопухолевых препаратов создаются панели клеточных линий. Наиболее известной из них является NCI-60 drug-screening panel (27).

В Американской коллекции клеточных культур (ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>) в качестве надежных экспериментальных платформ для изучения онкогенеза и разработки подходов к противоопухолевой терапии сформированы панели опухолевых клеточных линий, сгруппированных на основании разных характеристик: тканевого происхождения, характера генетических нарушений, молекулярного автографа, или конкретного измененного гена (*EGFR*, *MYC*, *RAS*, *RB1*, *TP53* и др.).

Интегральный анализ структурно-функциональной организации генома клеточных линий на уровне кариотипа, последовательностей ДНК, транскриптома, метилома и применение биоинформационной стратегии привели к появлению цитогеномики. Огромный поток результатов такого многоуровневого анализа определил необходимость создания информационных ресурсов.

Сведения о различных характеристиках клеточных линий содержатся, в частности, в разделе Cancer Chromosomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyquery.cgi>) информационного ресурса Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), on-line Энциклопедии по опухолевым клеточным линиям человека и животных (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>), на сайте Немецкой коллекции клеточных культур и микроорганизмов (DSMZ, <http://www.dsmz.de/home.html>). Российская коллекция клеточных культур предоставляет сведения о клеточных линиях в Каталоге РККК на сайте ИИЦ РАН (<http://www.cytspb.rssi.ru/>). Вместе с тем, в большинстве информационных ресурсов цитогенетические данные приведены далеко не всегда и часто ограничены кратким описанием кариотипов клеточных линий. В нашем коллективе (28) была предпринята попытка создания варианта базы данных по цитогенетике опухолевых клеточных линий человека "Cytogenetics of Human Tumor Cell Lines", которая также находится на сайте ИИЦ РАН. Этот ресурс требует усовершенствования программного обеспечения и дальнейшего наполнения.

Предполагается, что изучение молекулярных механизмов патогенеза неоплазий как *in vivo*, так и на клеточных линиях, будет способствовать развитию представлений о реализации тканеспецифических механизмов онкогенеза в динамике кариотипа и закономерностях эволюции генома опухолевых клеток *in vitro*. Дальнейшие исследования позволят оценивать область применения клеточных линий опухолевого происхождения как в качестве моделей конкретных типов новообразований человека, так и для решения определенных молекулярно-биологических задач.

Исследование кариотипической изменчивости клеточных линий опухолевого происхождения представляется чрезвычайно важным при мониторинге изменений кариотипа культивируемых стволовых клеток, принимая во внимание возможность их злокачественной трансформации.

### Список литературы

1. **Мамаева С.Е.** Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология, 1996, 38, 8: 787—814.
2. **Полянская Г.Г.** Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи совр. биол., 2000, 120: 529-539.
3. **Poljanskaya G.G., Vakhtin Yu.B.** The karyotypic structure of cell populations in vitro as integral system. Цитология, 2003, 45: 115—131.
4. **Мамаева С.Е.** Цитогенетика клеток в культуре. В кн.: «Биология клетки в культуре», Л., изд-во Наука, 1984: 195—234.

5. **Savelyeva L., Mamaeva S.** Heterogeneity and balance of chromosomes in human cell line M-HeLa-76: analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1987, 28, 2: 311—325.
6. **Savelyeva L., Mamaeva S.** Population analysis of karyotypic heterogeneity of the Raji Burkitt lymphoma cell line. Analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1988, 34, 1: 63—75.
7. **Турилова В.И., Смирнова Т.Д.** Кариотипическая изменчивость клеточных линий множественной миеломы человека. *Цитология*, 2012, 54, 8: 621—635.
8. **Ye C.J., Liu G., Bremer S.W., Heng H.H.** The dynamics of cancer chromosomes and genomes. *Cytogenet. Genome Res.*, 2007, 118 (2-4): 237—246.
9. **Nowell P.C.** Clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, 194, 4260: 23—28.
10. **Greaves M.** Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol.*, 2010, 20, 2: 65—70.
11. **Полянская Г.Г.** Кариотипическая изменчивость в клеточных линиях и структура кариотипа. Информационный бюллетень «Клеточные культуры». СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2009, 24: 15—24.
12. **Литвинчук Л.Ф., Мамаева С.Е., Ковтунович Н.Г., Пинаев Г.П.** Кариотип постоянных клеточных линий. I. Изменчивость кариотипа клеток M-HeLa при статическом и роллерном способах культивирования. *Цитология*, 1986, 28, 1: 56—62.
13. **Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Пинаев Г.П.** Характеристика кариотипа постоянных клеточных линий. II. Изменчивость и сбалансированность хромосомного набора клеток M-HeLa. *Цитология*, 1986, 28, 2: 193—203.
14. **Gagos S., Iliopoulos D., Tseleni-Balafouta S., Agapitos M., Antachopoulos C., Kostakis A., Karayannakos P., Skalkeas G.** Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity: studies on two immortal colon cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1996, 90, 2:157—165.
15. **Roschke A.V., Stover K., Tonon G., Schäffer A.A., Kirsch I.R.** Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia*, 2002, 4, 1:19—31.
16. **Baronchelli S., Bentivegna A., Redaelli S., Riva G., Butta V., Paoletta L., Isimbaldi G., Miozzo M., Tabano S., Daga A., Marubbi D., Cattaneo M., Biunno I., Dalprà L.** Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines. *PLoS One*, 2013, 8, 2:e57462. doi: 10.1371/journal.pone.0057462.
17. **Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Пинаев Г.П.** Закономерности кариотипической изменчивости в перевиваемых клеточных линиях человека. *ДАН СССР*, 1983, 270, 2: 456—458.
18. **Roschke A.V, Rozenblum E.** Multi-Layered Cancer Chromosomal Instability Phenotype. *Front Oncol.*, 2013, 3: 302. eCollection 2013.
19. **Tuna M., Knuutila S., Mills G.B.** Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med.*, 2009, 15, 3: 120-128. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.005.
20. **Lapunzina P., Monk D.** The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol Cell.*, 2011,103, 7: 303-317. doi: 10.1042/BC20110013.
21. **MacLeod R.A, Drexler H.G.** Classical and molecular cytogenetic analysis. *Methods Mol Biol.*, 2013, 946, 39-60. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8-4.
22. **Grigorova M., Lyman R.C., Caldas C., Edwards P.A.** Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet.*, 2005, 162, 1: 1—9.

23. MacLeod R.A., Nagel S., Scherr M., Schneider B., Dirks W.G., Uphoff C.C., Quentmeier H., Drexler H.G. Human leukemia and lymphoma cell lines as models and resources. *Curr Med Chem.* 2008, 15, 4: 339—359.
24. Knutsen T., Padilla-Nash H.M., Wangsa D., Barenboim-Stapleton L., Camps J., McNeil N., Difilippantonio M.J., Ried T. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49, 3: 204—223.
25. Gribble S.M., Roberts I., Grace C., Andrews K.M., Green A.R., Nacheva E.P. Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2000, 118, 1: 1—8.
26. Яковлева Т.К., Ярцева Н.М., Турилова В.И. Прогрессия кариотипа клеточных линий острого миелобластного лейкоза человека. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2011, 27: 34—45.
27. Roschke A.V., Tonon G., Gehlhaus K.S., McTyre N., Bussey K.J., Lababidi S., Scudiero D.A., Weinstein J.N., Kirsch I.R. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res.*, 2003, 63, 24: 8634—8647.
28. Турилова В.И., Ярцева Н.М., Бикташева Н.П., Бикташев А.Г., Яковлева Т.К. Создание проблемно-ориентированной базы данных по цитогенетике опухолевых клеточных линий человека. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», СПб, изд-во Политехн. ун-та, 2007, 22: 33—39.

## **БЫСТРАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ АКТИНОВЫХ МИКРОФИЛАМЕНТОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ВНЕШНИХ ИНДУКТОРОВ**

***Д.Е. Бобков***

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [bobkovde@yandex.ru](mailto:bobkovde@yandex.ru)

Обзор посвящён роли актинового цитоскелета в координации проведения внутриклеточных сигналов. При действии на культивируемые немышечные клетки различных биологически активных молекул, таких как ростовые факторы, гормоны и белки внеклеточного матрикса, происходит быстрая реорганизация актинового цитоскелета, которая заключается в частичной или полной разборке актиновых структур с последующим постепенным восстановлением организации цитоскелета. В процессе этой реорганизации можно выделить три последовательные стадии. Первым этапом является ранний клеточный ответ, который включает формирование раффлов и/или микровыростов на периферии клетки. На втором этапе происходит разборка стресс-фибрил и дезорганизация всех типов пучков микрофиламентов, кроме тех, которые находятся в микровыростах. Эти стадии реорганизации системы актиновых микрофиламентов не зависят от типа иммобилизованных лигандов, на которых распластаются клетки. На третьем этапе происходит восстановление