7. Kakani A., Li G., Peng Z. Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*. Planta, 2009, 229 (3): 645–657.

8. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant., 1962, 15 (3): 473–497.

9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011, 124 с.

10. Веселов С.Ю., Вальке Р.С., ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака. Физиология растений, 1999, 46 (1): 34–40.

11. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдимирова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. Уфа: Гилем, 2013, 128 с.

12. Сельдимирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллюсах различного происхождения у пшеницы. Физиология и биохимия культурных растений, 2011, 43 (4): 297–306.

13. **Dello I.R.** Genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. Science, 2008, 322 (5906): 1380–1384.

14. **Brenner W.G., Schmulling T.** Transcript profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses. BMC Plant Biol., 2012, 12 (1): 112–142.

15. **Yoshida S., Saiga S., Weijers D**. Auxin regulation of embryonic root formation. Plant Cell Physiol., 2013, 54 (3): 325–332.

16. Высоцкая Л.Б. Содержание цитокининов в клетках разных зон корней пшеницы. Цитология, 2011, 53 (11): 884–890.

17. **Gupta S., Rashotte A.M.** Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. Plant Cell Rep., 2012, 31 (5): 801–812.

18. **Zhao Y**. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. Curr. Opin. Plant Biol., 2008, 11 (1): 16–22.

# ХАРАКТЕРИСТИКА КАРИОТИПА КЛЕТОК ЛИНИИ DXB-11, ДЕРИВАТА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА СНО-К1

### В.И. Турилова, Т.С. Горячая, Т.К. Яковлева

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, tvak@mail.cytspb.rssi.ru

Линии клеток яичника китайского хомячка СНО (Chinese hamster ovary) являются основой биотехнологического производства широкого спектра белков, используемых в фармакологических целях. Многообразие клеточных линий СНО, их культивирование в разных условиях и разных лабораториях, определяет необходимость цитогенетического контроля. С использованием метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски выполнен анализ кариотипа клеток линии DXB-11 (дериват клеток СНО-К1), дефицитных по

дигидрофолатредуктазе. Это первый анализ кариотипа клеточной линии DXB-11 из Российской коллекции клеточных культур. Показано, что модальный класс клеток (78%) содержал 20 хромосом при выраженной кариотипической гетерогенности, обусловленной неклональными хромосомными перестройками. В кариотипе клеток DXB-11 выявлено 6 нормальных и 14 структурно перестроенных хромосом, из которых происхождение 8-ми не установлено (маркерные хромосомы, mar1—mar8). При сравнении с кариотипом клеток родительской линии CHO-K1 (Филатов, Мамаева, 1985) в кариотипе клеток DXB-11 в неизмененном виде сохранялись хромосомы 1-й и 5-й пар, хромосомы 8, 9 и ряд аномальных хромосом (del(2)(q11q22), add(6), der(X) и 5 маркерных хромосом). В то же время в клетках DXB-11 обнаружены специфичные для этой линии хромосомы del(2)(p16p25), der(6), mar7 и mar8. Появление этих хромосом в кариотипе клеток DXB-11 связано с перестройками хромосом 2 и 7, интактных в CHO-K1, а также фрагментацией и реаранжировками одной из аномальных хромосом кариотипа клеток CHO-K1. В целом, значительное сходство кариотипов клеток линий DXB-11 и CHO-K1 свидетельствует о стабильности генетического материала в клетках CHO.

Ключевые слова: клеточная линия китайского хомячка DXB-11, кариотип, кариотипическая гетерогенность.

Линии клеток яичника китайского хомячка СНО широко используются для синтеза рекомбинантных белков [1]. Клеточная линия DXB-11 получена из клеток СНО-К1 в результате химического мутагенеза с последующим гамма-облучением, и является радиационным мутантом с делецией одного аллеля гена дигидрофолатредуктазы (*dhfr*), локус 2p23 [2], и миссенс-мутацией (T137R) во втором аллеле [1, 3]. Двойная инактивация гена *dhfr* сделала эту клеточную линию удобной системой для введения генетических конструкций, содержащих функциональный ген *dhfr* и ген, продукт которого планируется синтезировать. Дальнейшая селекция рекомбинантных клеток в среде с добавлением метотрексата приводит к амплификации как гена *dhfr*, так и интересующего трансгена. Таким образом, клеточная линия DXB-11 служит родительской линией по отношению к получаемым на ее основе клеточным штаммам-продуцентам.

Многолетнее существование клеток линии DXB-11, культивирование их в разных условиях и разных лабораториях определяют необходимость цитогенетического контроля. Кроме того, кариологическая характеристика родительской линии важна для подтверждения клонального

происхождения штаммов-продуцентов, а также для определения влияния особенностей кариотипа родительских стабильность продуктивность дериватных клеток на Ν рекомбинантных клеточных штаммов. Хромосомы клеточной линии DXB-11 были представлены в публикации Milbrandt с соавторами [4] без детального анализа кариотипа. Целью настоящей работы был цитогенетический анализ и выявление особенностей кариотипа клеток DXB-11 по сравнению с клетками родительской линии CHO-K1.

#### Материал и методы

Для культивирования клеток постоянной линии DXB-11 (Российская коллекция клеточных культур) использовали ростовую среду, содержащую 90 % F12 (Биолот, Россия) и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Hy Clone standard, CША). Клетки культивировали во флаконах площадью 25 см<sup>3</sup> (Nunc, Дания) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 90 % влажности при 37 °C в течение 4 недель. Цитогенетический анализ клеточной линии DXB-11 проведен на 8-м пассаже после декриоконсервации (30 сут культивирования). Для накопления клеток в метафазе митоза в культуральную среду добавляли колцемид (KaryoMax, Gibco, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл на 1 час. Препараты метафазных хромосом (0.075 M KCl) в течение 15 мин при комнатной температуре и фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты [3: 1]. Суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные предметные стекла. Дифференциальное окрашивание метафазных хромосом на G–диски выполняли по методу Ozkinay, Mitelman [5].

Модальное число хромосом и размах изменчивости клеток по числу хромосом определяли при их подсчете в 100 метафазных пластинках. Долю полиплоидных клеток в популяции оценивали при просмотре 1000 метафазных пластинок. Кариотипировали 25 метафазных пластинок.

Препараты анализировали под световым микроскопом Axiophot (Opton, Германия). Для анализа кариотипов клеток использовали микроскоп Axio Imager. M1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованный системой автоматического кариотипирования Ikaros4 Karyotyping System (MetaSystems, Германия). Идентификацию хромосом китайского хомячка, окрашенных на Gдиски, проводили в соответствии с номенклатурой, предложенной Ray, Mohandas [6]. Кариотип и структурно перестроенные хромосомы описаны и представлены в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека, ISCN 2009 [7].

### Результаты

Число хромосом в клетках DXB-11 варьировало от 18 до 22-х (табл. 1). Модальный класс клеток (78 %) содержал 20 хромосом. Уменьшение числа хромосом в кариотипе было связано с появлением дицентрических хромосом, а увеличение – с фрагментацией хромосом и присутствием их коротких и длинных плеч в виде самостоятельных хромосом. Доля полиплоидных клеток в популяции составляла 9.8 %.

Таблица 1

## Распределение клеток по числу хромосом

Число хромосом в	18	19	20	21	22
клетке					
Число клеток	2	6	78	13	1

При ограниченной количественной изменчивости и четко выраженном модальном числе хромосом клетки DXB-11 характеризовались хромосомной нестабильностью и разнообразием структурных перестроек. Анализ 25 метафазных пластинок с числом хромосом, равным 20, показал, что 7 клеток (28 %) имели вариант кариотипа, представленный на рисунке. В составе кариотипа выявлено 6 нормальных и 14 структурно перестроенных хромосом, включая 8 маркерных, происхождение которых не установлено. В остальных 18 клетках (72 %) отмечены неповторяющиеся структурные перестройки с вовлечением разных хромосом кариотипа.

В кариотипе клеток DXB-11 среди нормальных хромосом только хромосомы 1-й и 5-й пар представлены двумя гомологами, хромосомы 8 и 9 – одним гомологом, остальные хромосомы структурно перестроены. Эти перестройки представляют собой сложную комбинацию делеций, инверсий и транслокаций хромосомного материала, что позволяет лишь частично идентифицировать материал нормальных хромосом в составе аномальных. Так, материал одного из гомологов хромосомы 3 присутствует в составе короткого плеча mar1 (часть 3р) и длинного плеча mar4 (часть 3q). Маг6 по существу является структурно перестроенным вторым гомологом хромосомы 3. Материал хромосомы 4 распределен между der(X) и mar1, в которых частично присутствуют 4р и 4q, соответственно. Материал хромосомы 7 обнаруживается в составе mar7, а хромосомы X — предположительно в составе mar8. Небольшие размеры и реаранжировки хромосом 8, 9 и 10 не позволяют их выявить. Повидимому, материал этих хромосом находится в составе неидентифицированных хромосом.



Рисунок. Вариант кариотипа клеток линии DXB-11.

 $20,-X,der(X)(Xpter \rightarrow Xq11::?::4p21 \rightarrow 4pter),del(2)(pter \rightarrow p25::p16 \rightarrow qter),$ 

 $del(2)(pter \rightarrow q11::q22 \rightarrow qter), -3, -3, -4, del(4)(pter \rightarrow q11::q12 \rightarrow qter), add(6)(?::p11 \rightarrow qter), del(2)(pter \rightarrow q11::q22 \rightarrow qter), -3, -3, -4, del(4)(pter \rightarrow q11::q12 \rightarrow qter), add(6)(?::p11 \rightarrow qter), del(2)(pter \rightarrow q11::q12 \rightarrow qter), del(2)(pter \rightarrow qter), d$ 

 $der(6)(?::6q14 \rightarrow 6p13::6q14 \rightarrow 6qter), -7, -7, -8, -9, -10, -10, +8mar.$ 

mar1: der(?4)(3p?ter $\rightarrow$ 3p21::?::?4cen $\rightarrow$ 4q16::4q?::4q110 $\rightarrow$ 4qter),

mar3: der(?9)(?::9q21 $\rightarrow$ ?9cen $\rightarrow$ 9p12::?), mar4: der(?)(? $\rightarrow$ ?cen $\rightarrow$ 3q?13 $\rightarrow$ 3q27::?),

mar6: der(?3)(  $3?q12 \rightarrow 3p2?7::3q13 \rightarrow 3q27::?$ ), mar7: der(?)(? $\rightarrow$ ?cen::?::7q?13 $\rightarrow$ 7q?26::?).

Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы.

В соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека (ISCN, 2009) к маркерам (mar) отнесены аномальные хромосомы, центромерный район которых не идентифицирован.

В редкие структурные перестройки с разной частотой вовлекались все хромосомы кариотипа. Наиболее нестабильными хромосомами оказались mar2 и mar5. Делеции разных районов длинного плеча (q-плеча) mar5 выявлены в 8 из 18 (44,4%) клеток. Перестройки mar2 — появление дополнительного материала на q-плече или делеции разных его локусов —

50

обнаружены в 7 из 18 (38,9%) клеток. Неоднократно в структурные перестройки, в основном, транслокации, вовлекались хромосомы 1, 4, 5, 8, add(6), mar6, mar7 и mar8.

В целом, несмотря на кариотипическую гетерогенность, между клетками не выявлено существенных различий по составу хромосомного материала, что свидетельствует о значительной сбалансированности кариотипа клеток DXB-11.

### Обсуждение

Сравнительный анализ кариотипов клеток DXB-11 и CHO-K1 [Филатов, Мамаева, 8] показал, что обе клеточные линии имеют одинаковое гиподиплоидное число хромосом (2n=20), при этом в клетках DXB-11 структурно перестроенных хромосом было больше. Представляет интерес сопоставить состав нормальных и перестроенных хромосом в клетках этих линий.

При первом описании кариотипа клеток линии СНО в 1969 г. 9 рутинно окрашенных аномальных хромосом были обозначены буквой Z [9]. При анализе кариотипа с использованием дифференциального окрашивания хромосом, 13 перестроенных хромосом клеток СНО были идентифицированы и обозначены Z1—Z13 [10]. В настоящей работе сопоставление структурно перестроенных хромосом клеток линий DXB-11 и CHO-K-1 проведено в соответствии с описанием хромосом клеточной линии CHO, представленном в работе Deaven, Petersen [10].

В отличие от клеток СНО-К1, в кариотипе которых было обнаружено 9 нормальных и 11 аномальных хромосом [8], в клетках DXB-11 в результате структурных перестроек хромосом 2, 4 и 7 число аномальных хромосом увеличилось до 14 (табл. 2).

Сравнительный анализ состава нормальных и структурно перестроенных хромосом в трех родственных линиях СНО показал, что хромосомы 1-й и 5-й пар, 8, 9, а также аномальные хромосомы del(2)(q11q22), add(6), mar1, mar2, mar6, возможно, del(4) и mar3, являются общими для всех линий (табл. 2).

Маркерные хромосомы mar4 и mar5, а также der(X) отсутствуют в клетках CHO, характерны для клеток CHO-K1 и сохраняются в клетках DXB-11. Аномальные хромосомы del(2)(p16p25), der(6), mar7 и mar8 специфичны для клеток DXB-11 и отличают их от клеток CHO-K1. Так, появление аномальной хромосомы del(2)(p16p25) связано со способом получения клеточной линии DXB-11 и делецией локуса гена *dhfr.* Вместо der(6), выявленного в клетках DXB-11, в клетках CHO-K1 и клетках CHO присутствует другая структурно перестроенная хромосома, также der(6), обозначенная Z11 (CHO-K1) и Z9 (CHO). Хромосома Х и хромосома 7 в клетках СНО присутствуют в неизмененном виде [10]. В клетках линии СНО-К1 хромосома 7 остается интактной, а хромосома X вовлекается в перестройки и образует der(X) – Z2 и Z1, который включает материал хромосом X и 7 [8]. По-видимому, появление маркерных хромосом mar7 и mar8 в клетках DXB-11 связано с фрагментацией и дальнейшими перестройками хромосомы, обозначенной Z1 в кариотипе клеток CHO-K1.

Таблица 2.

Сопоставление структурно перестроенных хромосом в клетках линий DXB-11, CHO-K1 и CHO.

DXB-11	CHO-K1	СНО
2n=20	2n=20	2n=21
	(8)	(10)
del(2)(p16p25)		
del(2)(q11q22)	Z3	Z2
del(4)(q11q12)	—	Z5
add(6)(p11)	Z5	Z8
der(6)(?::6q14→6p13::6q14→6qter)	—	—
der(X)t(X;?;4)(q11;?;p21)	Z2	—
mar1	Z6	Z7
mar2	Z8	Z11
mar3	?Z12	?Z13
mar4	Z4	—
mar5	Z10	
mar6	Z9	Z4
mar7	—	
mar8	—	?Z10

Таким образом, сходство хромосомного материала в клетках DXB-11 и CHO-K1, несмотря на вариации структурных перестроек, свидетельствует о стабильности генетического материала в клетках CHO при их длительном существовании в условиях *in vitro*.

Предполагается, что способность хромосом китайского хомячка к структурным перестройкам может быть обусловлена локализацией теломерных повторов (TTAGGG)<sub>п</sub> в прицентромерных районах, которые наиболее часто вовлекаются в образование аномальных хромосом [11,12].

В отличие от клеток СНО [13] и СНО-К1 [8] клетки DXB-11 характеризовались выраженной кариотипической гетерогенностью. Высокая доля клеток с неклональными перестройками может быть связана как с условиями культивирования, так и с особенностями генома мутантных клеток DXB-11. Кариотипическая гетерогенность (сосуществование клеток с разными вариантами кариотипа) отмечена для ряда клонов и субклонов клеток линии СНО-К1, что не исключает стабильности кариотипической структуры популяции [14]. Хотя выполненный нами анализ ограниченного числа клеток DXB-11 не позволил судить о кариотипической структуре популяции, вполне вероятно, что такая форма стабильности свойственна и клеточной линии DXB-11.

Известно, что мутантные сублинии клеток СНО-К1, устойчивые к колхицину, несмотря на перестройки отдельных хромосом, в значительной степени сохраняют структуру кариотипа клеток родительской линии [15]. Такая же закономерность обнаружена и при анализе рекомбинантных клеточных линий СНО, полученных на основе другой дефицитной по дигидрофолатредуктазе клеточной линии DG44 [16]. При этом не выявлено корреляции между стабильной продукцией зеленого флуоресцентного белка, ген которого был введен в качестве трансгена, и присутствием (или отсутствием) в кариотипе клеток дополнительных хромосомных перестроек [16].

Таким образом, вопрос о зависимости стабильности и продуктивности клеточных штаммовпродуцентов от структурного варианта кариотипа и/или особенностей кариотипической структуры популяции родительской линии остается открытым. В связи с кариотипической гетерогенностью клеточной линии DXB-11 представляет интерес проводить клонирование и кариотипирование отдельных клонов данной линии и оценку продуктивности получаемых на основе этих клонов штаммов-продуцентов.

Авторы выражают глубокую благодарность Н.Н. Мамаеву и Т.Л. Гиндиной (Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова) за возможность использования автоматического анализатора изображений хромосом (Ikaros4 Karyotyping System for transmitted light, MetaSystems, Германия).

### Список литературы

1. **Wurm F.M.** CHO quasispecies — implications for manufacturing processes. Processes, 2013, 1: 296–311.

2. Funanage V.L., Myoda T.T. Localization of Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to band p23 of chromosome 2. Somat. Cell Mol. Genet., 1986, 12, 6: 649–655.

53

3. Urlaub G., Chasin L.A. Isollation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. Proc Natl Acad Sci U S A., 1980, 77, 7: 4216–4220.

4. **Milbrandt J.D., Azizkhan J.C., Hamlin J.L.** Amplification of a cloned Chinese hamster dihydrofolate reductase gene after transfer into a dihydrofolate reductase-deficient cell line. Mol Cell Biol., 1983, 3, 7: 1274–1282.

5. Ozkinay C., Mitelman F. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and Cbanding in human chromosomes. Hereditas, 1979, 90, 1: 1–4.

6. **Hamerton J.L.** Report of the committee on chromosome markers. Cytogenet Cell Genet., 1976, 16, 1-5: 83–91.

7. ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer L.G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds); S. Karger, Basel 2009.

8. Филатов Л.В., Мамаева С.Е. Стабильность кариотипа двух постоянных линий клеток китайского хомячка — СНО-К1 и V-79. Цитология, 1985, 27, 9: 1031–1038.

9. **Kao F.T., Puck T.T.** Genetics of somatic mammalian cells. IX. Quantitation of mutagenesis by physical and chemical agents. J Cell Physiol., 1969, 74, 3: 245–258.

10. **Deaven L.L.**, **Petersen D.F**. The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. Chromosoma, 1973, 41, 2:129–144.

11. Bravo M.V., Bianchi M.S., Bolzán A.D. Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells. Mutat Res., 2012, 731, (1-2): 133–139.

12. Cao Y., Kimura S., Itoi T., Honda K., Ohtake H., Omasa T. Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. Biotechnol Bioeng., 2012, 109, 6: 1357–1367.

13. Worton R.G., Ho C.C., Duff C. Chromosome stability in CHO cells. Somatic Cell Genet., 1977, 3, 1: 27–45.

14. Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология, 1981, 23, 7: 818–830.

15. Гринчук Т.М., Игнатова Т.Н., Ефимова Е.В., Сорокина Е.А. Кариотипические особенности клеток китайского хомячка линии СНО-К1, устойчивых к колхицину. Цитология. 1986, 28, 1: 63–68.

16. Derouazi M., Martinet D., Besuchet N., Schmutz N., Flaction R., Wicht M., Bertschinger M., Hacker D.L., Beckmann J.S., Wurm F.M. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 340, 4: 1069–1077.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ,

## АПОПТОЗ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.С. Смирнова, Д.М. Даниленко, Т.Д. Смирнова, Н.В. Дунаева, К.В. Сивак

ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, <u>cellcultures@influenza.spb.ru</u>

При экспериментальном тестировании противовирусных препаратов широко используются культивируемые клетки. В настоящей работе проведено сравнительное изучение влияния противовирусных препаратов – ингавирина, триазавирина, рибавирина и ремантадина на