

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПЕРЕСЕВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НАСЕКОМЫХ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

© Д. Ю. Пантелеев,¹ В. Т. Какпаков, Т. В. Горелова, Б. В. Андрианов

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва;
¹ электронный адрес: mysobiota@yandex.ru

Пересеваемые клеточные линии насекомых являются особым объектом биологии. Клетки в установившихся линиях по ряду признаков отличаются как от нормальных дифференцированных, так и от эмбриональных клеток насекомых. Иммуортализации клеточной линии обязательно предшествует период дестабилизации генома, проявляющийся в изменении размера генома, кариологии клеток, амплификации некоторых семейств ретротранспозонов и индукции их экспрессии. Существование значительной изменчивости в клеточной линии ставит задачу поиска инвариантных признаков, позволяющих идентифицировать культуру, а также определить границы нормальной изменчивости клеток в культуре. На материале коллекции пересеваемых клеточных линий насекомых Института общей генетики РАН проведена идентификация девяти линий методом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) митохондриальной ДНК. Обсуждается изменчивость в культуре ДНК-полиморфизмов, клеточной кариологии, морфологии, иммунологических и биохимических признаков.

Ключевые слова: пересеваемые клеточные линии насекомых, ПДРФ, ретротранспозоны, персистенция вирусов.

Начиная с пионерской работы Грейса (Grace, 1962), получившего первую пересеваемую клеточную культуру насекомого из эксплантата яичника эвкалиптового шелкопряда *Antheraea eucalypti*, клеточные культуры получены из 71 вида насекомых (Lynn, 2001), если считать только охарактеризованные линии клеток. Клеточные культуры получены из представителей многих отрядов насекомых, однако большинство линий получено от представителей всего двух отрядов: чешуекрылых (Lepidoptera) и двукрылых (Diptera). Наличие клеточной культуры позволяет получать большие количества одинаковых клеток, доступных для экспериментального воздействия. Такая возможность необходима при изучении индуцибельной экспрессии генов, так как экспериментальные воздействия не маскируются гормональной и нервной регуляцией целого организма. Совершенно незаменимы клеточные культуры в исследованиях патогенных вирусов и внутриклеточных паразитов, имеющих важное значение для контроля численности насекомых.

Указанные возможности клеточных культур подразумевают однородность их клеточного состава и стабильность признаков в стандартных условиях культивирования. Для оценки степени соответствия имеющихся клеточных культур насекомых указанным требованиям необходимо рассмотреть методы получения иммуортализованных культур клеток насекомых.

Несмотря на значительное число полученных культур клеток — около 500 (Lynn, 2001), получение новой культуры из заданного вида насекомого пока не является рутинной процедурой. Время получения культуры варьирует от нескольких недель до 1 года непредсказуемым образом. Кроме того, несмотря на многочисленные по-

пытки, культуры клеток медоносной пчелы и некоторых других видов насекомых не удалось получить до сих пор (Mitsuhashi, 2001).

Все имеющиеся культуры можно подразделить на две группы по способу выделения клеток для получения первичной культуры. Первая группа образована культурами, полученными из дезагрегированных тем или иным способом клеток различного происхождения. Чаще в качестве источника получения клеток использовались эмбрионы различных сроков развития. Это вызвано тем обстоятельством, что яйца насекомых легко стерилизуются, эмбриональные клетки легко дезагрегируются механическим способом и обладают значительными пролиферативными потенциалами. Таким способом получены основные клеточные линии дрозофилы, некоторых видов комаров, бабочек и т. д. Тем не менее в качестве источника получения взвеси клеток могут быть использованы как отдельные органы и ткани личинок, куколок или имаго, так и целые организмы (Goodman et al., 2001; Lynn, 2001).

Вторая группа объединяет культуры, полученные из тканевых эксплантатов различного происхождения. Иммуортализованные культуры были получены из тканей яичника куколок и имаго (Mitsuhashi et al., 2003), клеток гемолимфы личинок (Yasunaga-Aoki et al., 2004), клеток жирового тела (Goodman et al., 2001), имагинальных дисков (Vi et al., 1987).

Каков бы ни был источник клеток, процедура получения клеточной культуры сводится к помещению суспензии клеток или эксплантата в специальную питательную среду. Процессы, происходящие в первичной культуре, мало изучены. В первичной культуре наблюда-

ются миграции клеток, их прикрепление к субстрату, агрегация, сопровождающаяся образованием гигантских вакуолизованных клеток, спонтанная дифференцировка с формированием нейроподобных клеток, пульсирующих клеточных комплексов нейромышечного состава. Наблюдаются периоды активного деления и массовой гибели. В случае успеха спустя несколько недель или месяцев при редкой смене среды культура начинает устойчиво расти. Никаких методов направленной трансформации первичной культуры в иммортализованную для клеток насекомых не применялось. Попытки трансформировать первичную культуру креветки онкогенным вирусом обезьяны SV40 не привели к успеху (Taraу et al., 1995).

Первичные культуры клеток более требовательны к составу среды, чем уже установившиеся иммортализованные линии. Предложено несколько вариантов таких сред. Модификации среды Грейса (Mitsuhashi, Inoue, 1988; Mitsuhashi, 2001) подходят для большинства изученных видов насекомых. Тем не менее клетки жука *Dendroctonus valens* погибают в среде Грейса, что потребовало подбора для них особой среды (Sanchez et al., 2004). Как правило, все такие среды включают в себя компоненты с неопределенным составом — дрожжевой экстракт, гидролизат лактальбумина и эмбриональные сыворотки млекопитающих. В некоторых случаях использовались добавки из экстрактов куколок или личинок насекомых (Какпаков и др., 1969). Полученные такими методами культуры могут содержать несколько типов клеток. Лишь немногие культуры были клонированы из одной клетки. Следует отметить, что известные методы клонирования клеток насекомых не позволяют утверждать однозначно, что клоны были получены действительно из одной клетки, а не из небольшой группы (Echalier, 1977). Очевидно, что лишь подробный предварительный анализ признаков культуры и степени их устойчивости может позволить сделать заключение о пригодности данной культуры для экспериментальных исследований.

В настоящей работе обобщены данные по изменчивости кариотипа, изоферментным спектрам, ДНК-полиморфизмам для группы эмбриональных клеточных культур дрозофилы и проведена их идентификация.

Материал и методика

В работе использовали следующие линии клеток: дрозофилы *Drosophila virilis* — 79f7Dv3g (Braude-Zolotarjova et al., 1986) и *D. melanogaster* — 67j25D (Гвоздев, Какпаков, 1968; Какпаков и др., 1969), S2 и S3 (Schneider, 1972), Kc (Echalier, Ohanessian, 1970), комара *Aedes albopictus* — C6/36 (Singh, 1967), тутового шелкопряда *Bombyx mori* — BmN (Grace, 1967), *Blattella germanica* — UM-BGE-1 и UM-BGE-2 (Kurtti, 1974).

Клеточные линии дрозофилы, комара и таракана пасировали на среде C46 (Echalier, 1997) с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (GIBCO), инактивированной нагреванием до 56° С 30 мин 1 раз в нед в разведении 1 : 5 при 26° С. Линию клеток *Bombyx mori* культивировали на среде TnM-НМ (Hink, 1970) с добавлением 5 % инактивированной при тех же условиях эмбриональной телячьей сыворотки (GIBCO).

Все линии мух, использованные в работе, получены из коллекции Института биологии развития РАН. Мух культивировали на стандартной среде для дрозофил с добавлением фильтровальной бумаги.

Митохондриальную ДНК выделяли по модифицированному методу (Андрианов и др., 2003). Усыпленных эфиром мух растирали ручным гомогенизатором при комнатной температуре в Трис-боратном лизирующем растворе. На одну муху должно приходиться не менее 10 мкл буферного раствора. Рабочий раствор готовят перед опытом из пятикратных основных растворов А и Б: раствор А — 0.5 М Трис-борат, рН 9.0, и 5 мМ ЭДТА, рН 9.0; раствор Б — 1.25 М сахараза. После гомогенизации крупный дебрис, состоящий из фрагментов кутикулы, ядер клеток и др. осаждали центрифугированием 4 мин при 3000 g при комнатной температуре. Надосадок переносили в другую пробирку и митохондрии осаждали 10 мин при 16 000 g. Полученный осадок суспендировали в лизирующем растворе (1 % SDS, 100 мМ Трис-НСI, рН 9.0, и 100 мМ ЭДТА, рН 9.0). Лизат прогревали 15 мин при 65° С, переносили на лед и добавляли ацетат аммония до 2.5 М. Осадок созревал 30 мин. Лизат осветляли 10 мин при 16 000 g, после чего митохондриальную ДНК осаждали из надосадка равным объемом изопропанола. Полученную ДНК очищали от примеси РНК обработкой РНКазой А в растворе с низкой ионной силой и использовали для расщепления рестриктазами.

Митохондриальную ДНК из клеток пересеваемых культур выделяли на поздней стадии логарифмического роста. Плотность культуры определяли в камере Горяева. Для одного выделения брали $5 \cdot 10^7$ клеток (ориентировочно 10 мл культуры). Клетки осаждали при 1000 g 5 мин, промывали в однократном SSC от среды и суспендировали в 2 мл Трис-боратного лизирующего раствора с добавлением 0.1 % неионного детергента NP 40. Дальнейшее выделение и очистку митохондриальной ДНК вели по описанной выше методике выделения митохондриальной ДНК из мух.

Проведение горизонтального электрофореза нуклеиновых кислот в неденатурирующих условиях и расщепление ДНК рестриктазами осуществляли по стандартным протоколам (Маниатис и др., 1969). Приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по методу Какпакова и соавторов (1969).

Результаты и обсуждение

Кариологические маркеры пересеваемых культур клеток насекомых. Подробные данные по эволюции кариотипа пересеваемых клеток дрозофилы в ходе многолетнего культивирования получены на линии 67j25D (Какпаков и др., 1969; Полукарова и др., 1975). Цитогенетический анализ первичной культуры *D. melanogaster*, из которой получена данная линия клеток, не обнаружил существенного отклонения кариотипа от диплоидного. Установившаяся клеточная линия характеризуется изменчивым кариотипом. Многолетний мониторинг кариотипа клеточной линии 67j25D показал чередование периодов стабильного околодиплоидного кариотипа с периодами «кризисов», когда преобладание переходило к триплоидным, тетраплоидным и различным анеуплоидным вариантам (Какпаков и др., 1986). Все эти варианты могут быть найдены в культуре. На рис. 1 приведены типичные картины метафазных хромосом этой линии. Другая пересеваемая линия клеток *D. melanogaster*, наблюдавшаяся в течение 5 лет (Halfer, 1978), также прошла через кариологический кризис после нескольких лет стабильности с преобладанием дипло-

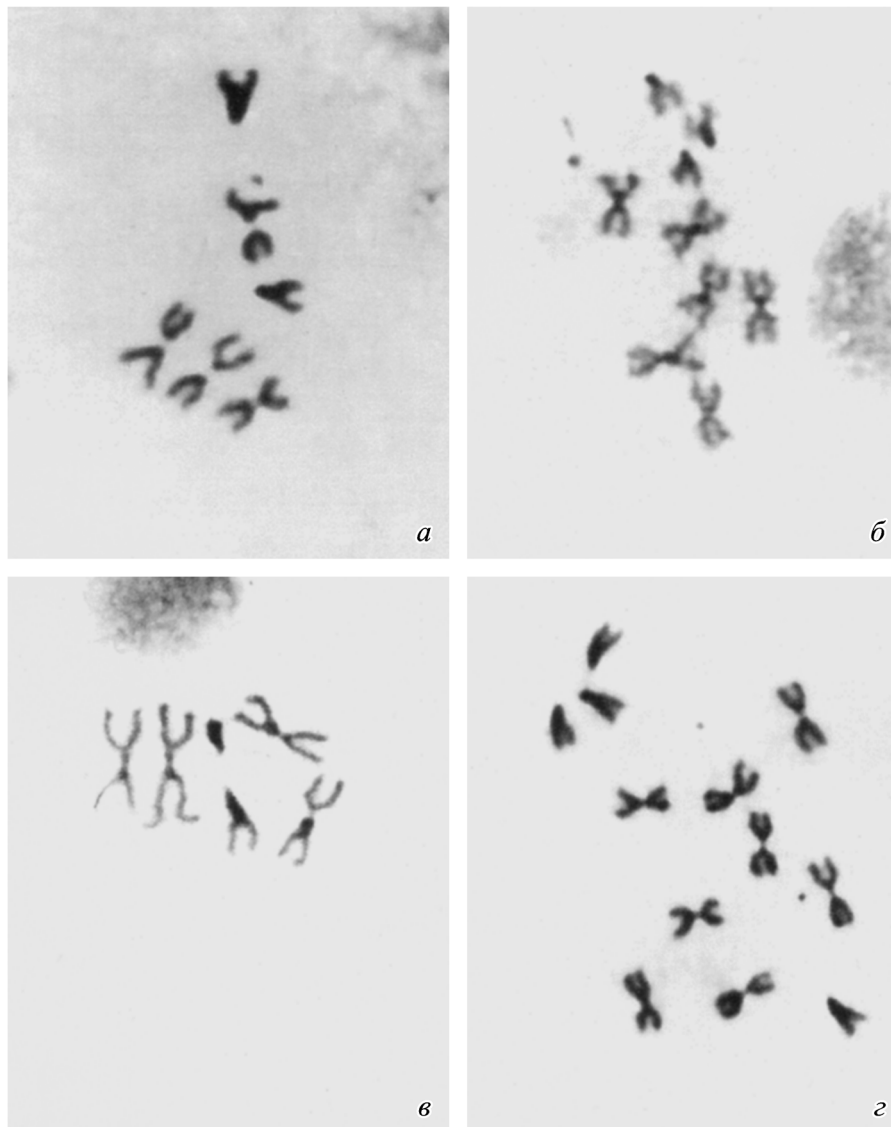


Рис. 1. Кариотипы отдельных клеток из пересеваемой линии 67j25D.

a — диплоидный, *б* — триплоидный, *в* — aberrantный (аномалия X-хромосомы), *з* — тетраплоидный. Окраска азуром—эозином. Об. 60×, ок. 12×.

Fig. 1. Karyotypes of individual cells of 67j25D line.

a — diploid, *б* — triploid, *в* — aberrant, *з* — tetraploid. Azur—eosin staining. Ob. 60×, oc. 12×.

идного кариотипа. Природа этих кризисов, вероятно, связана с неблагоприятными для клеток условиями. Экспериментально показано, что неблагоприятный состав среды (Dolfini, Gottardi, 1966) или сильное разведение культуры при засеве (Какпаков, Полукарова, 1975) вызывает быстро развивающуюся анеуплоидию, причем при восстановлении оптимальных условий анеуплоидные субклоны способны длительное время сохранять свой кариотип неизменным. Истинная полиплоидия нетипична для клеток дрозофилы. На фоне общей полиплоидности некоторые хромосомы теряются, чаще всего возникают моносомии по хромосоме X и хромосоме 4 (Echalier, 1997). Нарушение ploidy в культуре легко развивается под действием лектинов (Becker, 1972; Какпаков, Полукарова, 1975). Обработка клеток конканавалином А приводит к слиянию клеток и их вакуолизации. Часть двуядерных клеток не способна к делению и гибнет. Изучение образования двуядерных клеток в

смеси двух культур, одна из которых имела радиоактивно меченные ядра, позволило установить, что жизнеспособные двуядерные клетки возникают не путем слияния, а путем задержки цитотомии после деления ядер (Какпаков, Полукарова, 1975). В некоторых опытах доля тетраплоидных клеток достигала почти 100 %.

Прижизненные наблюдения за ростом культуры выявляют весьма сходные события с теми, которые наблюдаются при обработке клеток лектинами или полиэтиленгликолем. На рис. 2 приведена последовательная съемка одной группы клеток. Наблюдается деление клеток, их слияние, вакуолизация и гибель некоторых клеток.

Изменчивость кариотипа клеток пересеваемых культур других видов насекомых сходна с изменчивостью клеток дрозофилы. Культура клеток москита *Psorophora confinnis* сохраняет околоплоидный набор хромосом и постепенное увеличение частоты aberrantных метафаз с

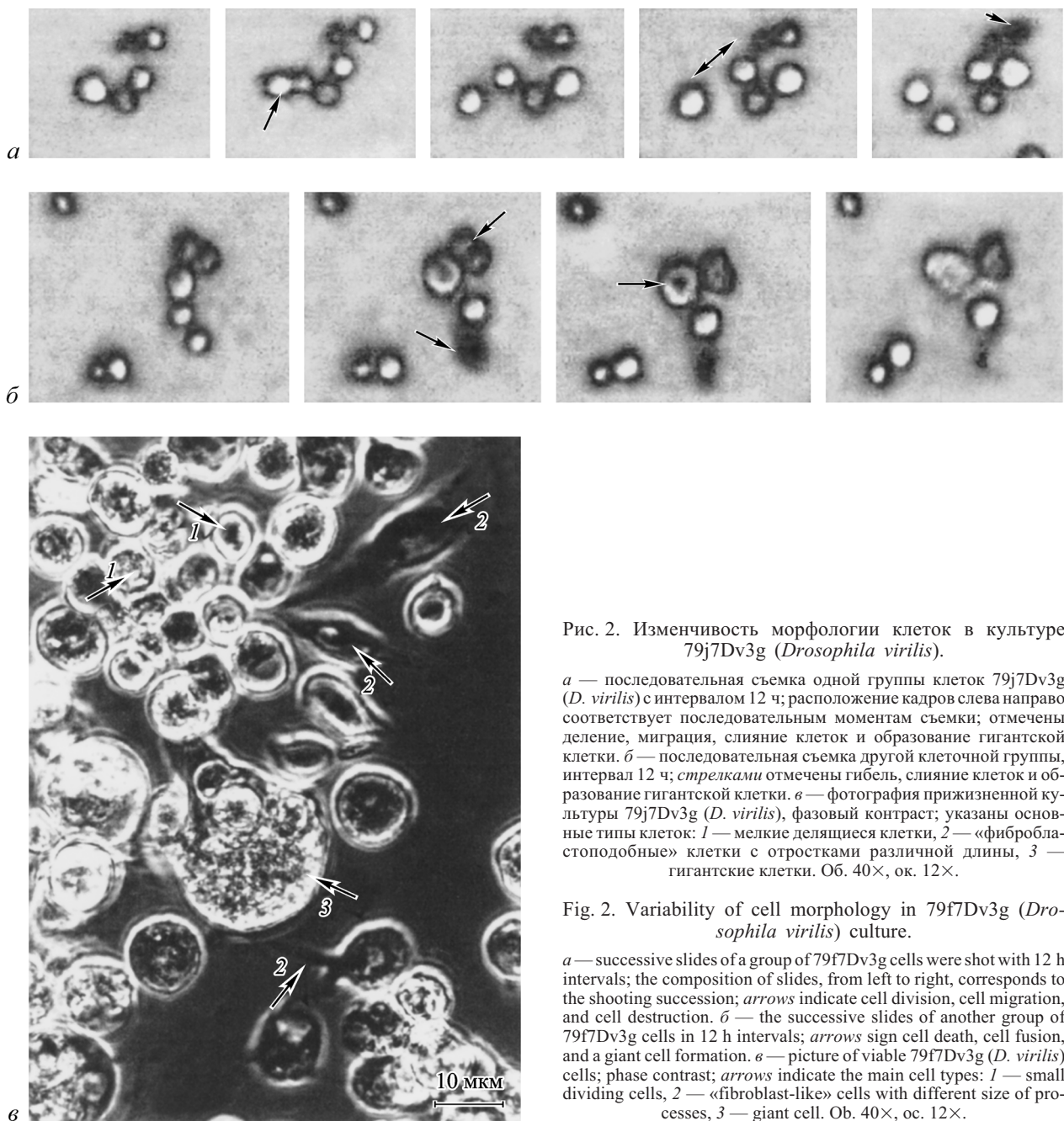


Рис. 2. Изменчивость морфологии клеток в культуре 79j7Dv3g (*Drosophila virilis*).

a — последовательная съемка одной группы клеток 79j7Dv3g (*D. virilis*) с интервалом 12 ч; расположение кадров слева направо соответствует последовательным моментам съемки; отмечены деление, миграция, слияние клеток и образование гигантской клетки. *б* — последовательная съемка другой клеточной группы, интервал 12 ч; *стрелками* отмечены гибель, слияние клеток и образование гигантской клетки. *в* — фотография прижизненной культуры 79j7Dv3g (*D. virilis*), фазовый контраст; указаны основные типы клеток: 1 — мелкие делящиеся клетки, 2 — «фибробластоподобные» клетки с отростками различной длины, 3 — гигантские клетки. Об. 40×, ок. 12×.

Fig. 2. Variability of cell morphology in 79f7Dv3g (*Drosophila virilis*) culture.

a — successive slides of a group of 79f7Dv3g cells were shot with 12 h intervals; the composition of slides, from left to right, corresponds to the shooting succession; *arrows* indicate cell division, cell migration, and cell destruction. *б* — the successive slides of another group of 79f7Dv3g cells in 12 h intervals; *arrows* sign cell death, cell fusion, and a giant cell formation. *в* — picture of viable 79f7Dv3g (*D. virilis*) cells; phase contrast; *arrows* indicate the main cell types: 1 — small dividing cells, 2 — «fibroblast-like» cells with different size of processes, 3 — giant cell. Ob. 40×, oc. 12×.

увеличением возраста культуры (Bello et al., 2001). Клетки чешуекрылых преимущественно гетероплоидны с увеличенным числом хромосом, вплоть до 14 n (Mitsuhashi et al., 2003; Yasunaga-Aoki et al., 2004). Следует отметить, что точное прочтение кариотипа у этих видов невозможно из-за большого числа микрохромосом. Полученные данные позволяют заключить, что кариотип — чрезвычайно изменчивый, ненадежный и к тому же малоустойчивый маркер пересееваемой клеточной культуры.

Гетерогенность клеточной культуры может быть даже больше, чем способен выявить морфологический и кариологический анализ. Измерение среднего содержания ДНК на клетку линии 67j25D с окоплоидным кариотипом оказалось равно 2.0 пг на клетку (Tarantul et

al., 1971), что в 5.5 раза больше размера диплоидного генома *D. melanogaster*. Очевидное противоречие может быть объяснено наличием в культуре неделящихся клеток с увеличенным содержанием ДНК, возможно, за счет частичной политенизации хромосом.

Сравнение размеров генома двух линий с окоплоидным кариотипом 67j25D (*D. melanogaster*) и 79f7Dv3g (*D. virilis*) также оказалось не соответствующим ожидаемому исходя из размеров диплоидных геномов этих видов. Диплоидный геном *D. virilis* равен 0.68 пг на клетку, что примерно в 2 раза больше генома *D. melanogaster* — 0.36 пг на клетку (Laird, 1971). Для сравнения среднего содержания ДНК в клетках сравниваемых линий были составлены смеси из равного числа клеток обеих линий. ДНК одной из них была радиоактивно помечена. Затем

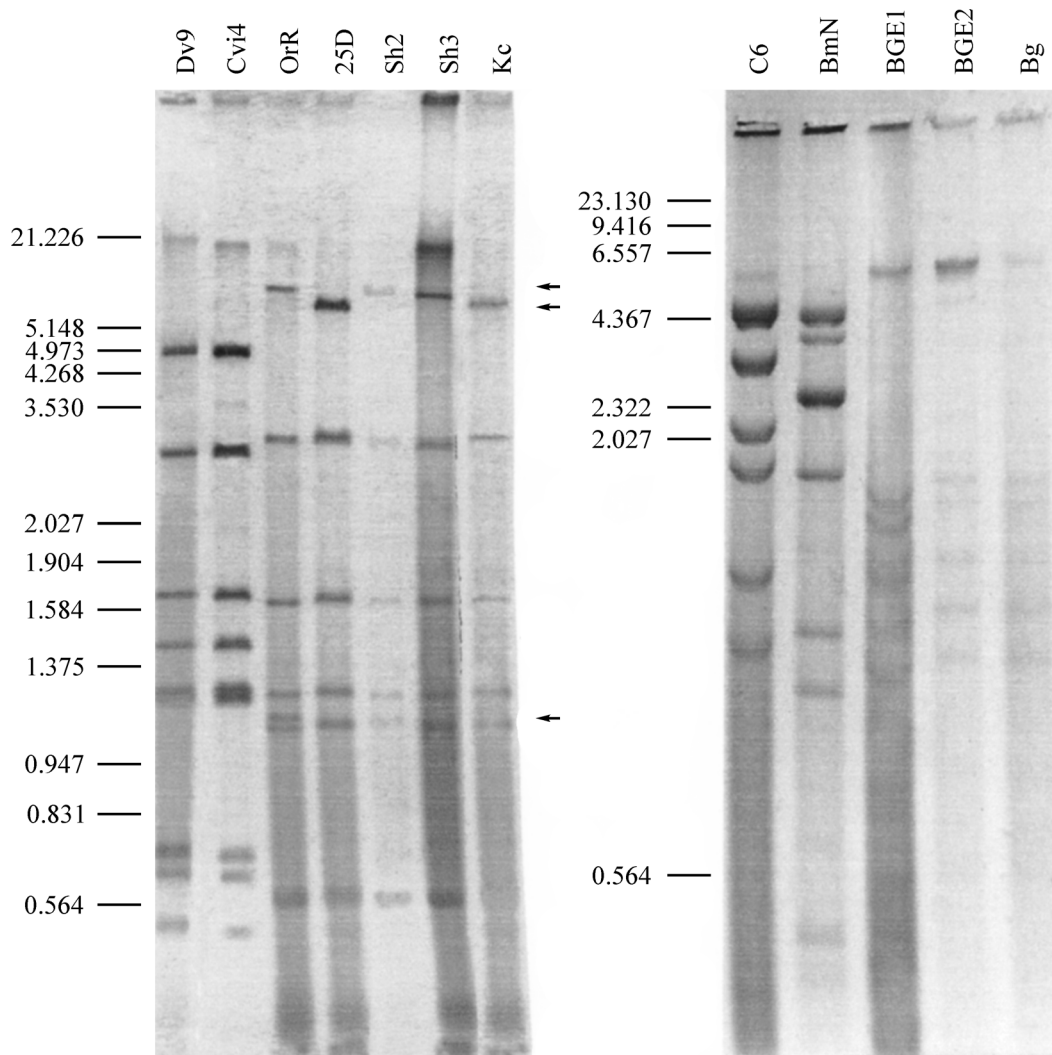


Рис. 3. *HinfI* ПДРФ митохондриальной ДНК из пересеваемых клеточных культур и насекомых, из которых эти клеточные культуры получены.

Dv9 — имаго *Drosophila virilis*, линия дикого типа Dv9; Cvi4 — линия клеток 79f7Dv3g *D. virilis*; OrR — имаго *D. melanogaster*, линия дикого типа OrR; 25D — линия клеток 67j25D *D. melanogaster*; Sh2 — линия клеток Sh2 *D. melanogaster*; Sh3 — линия клеток Sh3 *D. melanogaster*; Kc — линия клеток Kc *D. melanogaster*; C6 — линия клеток C6/36 *Aedes albopictus*; BmN — линия клеток BmN *Bombyx mori*; BGE1 — линия клеток UM-BGE-1 *Blattella germanica*; BGE2 — линия клеток UM-BGE-2 *B. germanica*; Bg — имаго *B. germanica*. Фракционирование ДНК в 1.5%-ном агарозном геле. Окраска бромидом этидия. Указаны полиморфные сайты митохондриальной ДНК клеточных культур *D. melanogaster*. Маркер молекулярной массы: слева — λ Eco R1, *HindIII*; справа — λ *HindIII*.

Fig. 3. *HinfI* RFLP of mitochondrial DNA from continuous cell lines and from inspert species — donors of these cell lines.

Dv9 — imago *Drosophila virilis*, wild type line — Dv9; Cvi4 — cell line 79f7Dv3g *D. virilis*; OrR — imago *D. melanogaster*, wild type line Oregon R; 25D — cell line 67j25D *D. melanogaster*; Sh2 — cell line Sh2 *D. melanogaster*; Sh3 — cell line Sh3 *D. melanogaster*; Kc — cell line Kc *D. melanogaster*; C6 — cell line C6/36 *Aedes albopictus*; BmN — cell line BmN *Bombyx mori*; BGE1 — cell line UM-BGE-1 *Blattella germanica*; BGE2 — cell line UM-BGE-2 *B. germanica*; Bg — imago *B. germanica*. DNA separating was accomplished in 1.5 % agarose gel. Staining with Ethidium bromide. Arrows indicate polymorphic sites in mitochondrial DNA of *D. melanogaster* cell lines. Molecular weight marker: on the left — λ Eco R1, *HindIII*, on the right — λ *HindIII*.

суммарную ДНК из всех смесей выделяли и соотношения величин геномов клеточных линий вычисляли по наблюдаемому уменьшению удельной радиоактивности контроля. Пять независимых измерений показали очень близкие результаты. Геном клеток 79f7Dv3g оказался меньше генома 67j25D, составляя примерно 80 % от последнего (Андрианов и др., 1991). Это наблюдение также соответствует предположению о том, что часть клеток в культуре клеток дрозофилы постоянно покидает митотический цикл, вступает в дифференцировку и геном этих клеток полиплоидизируется, что, естественно, никак не отражается на кариотипе делирующей части популяции,

который остается околодиплоидным. Рассмотрение данных по кариологии клеточных культур производит впечатление сильно нарушенного генома. Это, однако, не совсем верно. Как минимум часть клеток сохраняет нормальный геном, способный направлять созревание ряда видов плюрипотентных клеток. Убедительные доказательства наличия нормальных клеток в культуре дрозофил были получены в опытах по пересадке клеток из линии Kc в ранние эмбрионы дрозофилы (Illmensee, 1978). Пересаженные клетки были обнаружены в бластомере эмбриона и позднее — в составе ряда тканей личинок имаго.

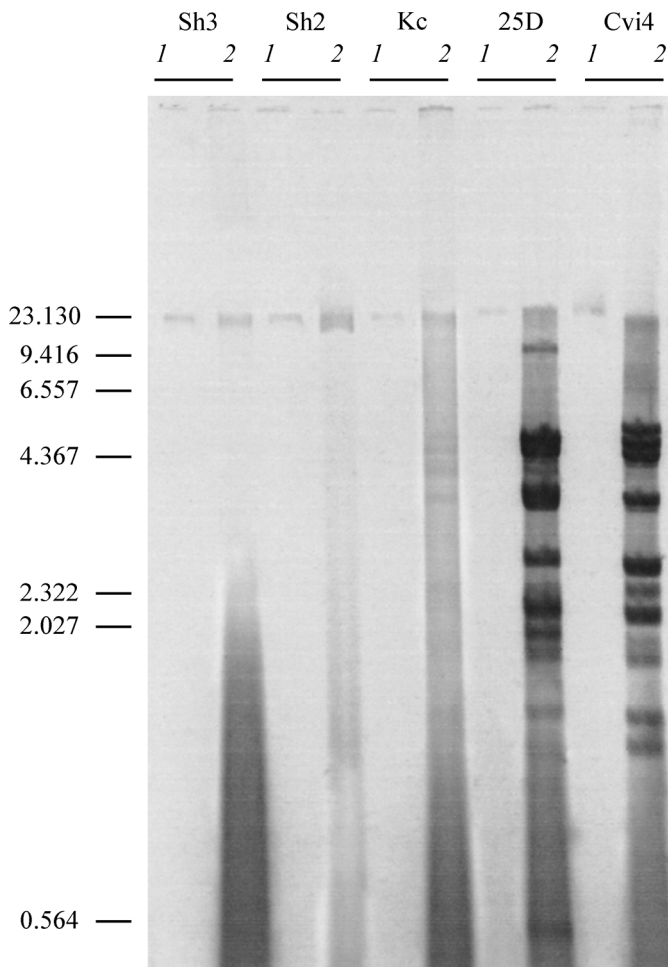


Рис. 4. Персистирующие РНК-вирусы в клеточных линиях *Drosophila*.

Фракционирование суммарной клеточной нуклеиновой кислоты из $5 \cdot 10^6$ клеток в неденатурирующем 1%-ном агарозном геле. Окраска бромидом этидия. Обозначения клеточных линий те же, что и на рис. 3. 1 — препарат цитоплазматических нуклеиновых кислот, обработанный РНКазой А в растворе с низкой ионной силой; 2 — тот же препарат без обработки. Маркер молекулярной массы — λ HindIII.

Fig. 4. RNA viruses persisting in *Drosophila* cell lines.

Fractioning of the total nucleic acid derived from the cytoplasm of $5 \cdot 10^6$ cells in a 1% non denatured agarose gel. Staining with Ethidium bromide. Designation of cell lines are the same as in Fig. 3. 1 — a sample of cytoplasm nucleic acids treated with RNase A in a low ionic strength solution; 2 — the same sample but without treatment. Molecular weight marker — λ HindIII.

ДНК-маркеры клеточных культур. На рис. 3 показано сравнение HinfI ПДРФ митохондриальной ДНК из клеток пересеваемых культур и имаго насекомых тех видов, от которых получены эти культуры. Полное совпадение обнаружено для *D. virilis*. Геном этого вида вообще удивительно мономорфен на всем ареале (Андрианов и др., 2003). Из четырех изученных линий *D. melanogaster* на фоне многочисленных совпадений с мухами дикого типа отмечены два полиморфных сайта. Один из них связан с изменчивой длиной А-Т-богатой области повторов митохондриального генома, другой локализован в области гена цитохромоксидазы.

Обобщением ПДРФ на случай произвольного генетического локуса является метод ПЦР-ПДРФ. Данным методом проанализирована изменчивость гена цитохромоксидазы I в природных популяциях шинельной моли

Spodoptera frugiperda и клеточных культур, полученных из них. Показаны существование полиморфизма, выявляемого по рестрикции MspI, и полная сохранность структуры гена в клеточной линии (Levi et al., 2002). Методы ПЦР-ПДРФ идентификации линий обладают исключительной надежностью. Недостатком их является необходимость большой предварительной работы по поиску полиморфизма. Указанного недостатка лишены технологии ПЦР с использованием праймеров с изменчивой гомологией к анализируемому локусу. Двадцать линий, полученных из десяти видов чешуекрылых, были проанализированы с помощью метода DAF-PCR с использованием праймеров к гену альдолазы. Все линии характеризовались уникальным набором полос. Опасность примененного метода заключается в высокой вероятности получения ложно положительных результатов. Указанного недостатка в значительной степени лишена новая методика ПЦР, основанная на использовании праймеров к последовательностям микросателлитов с несколькими нуклеотидными последовательностями на 3'-конце. Дополнительные нуклеотиды позволяют проводить амплификацию ПЦР только в том случае, если праймер отжигается на 5'-конце с микросателлитом, а на 3'-конце — с фланкирующей геномной последовательностью. Данным методом было идентифицировано 16 иммортализованных клеточных линий Lepidoptera, Coleoptera и Diptera (Grasela, McIntosh, 2003). Указанный метод потенциально позволяет выявить чрезвычайно большое количество полиморфизмов без всякого предварительного знания структуры генома вида. Вопрос о степени стабильности найденных полиморфизмов пока не изучен.

Биохимические и изоферментные маркеры. Проведенный анализ показывает, что изоферментный статус клеток в пересеваемой культуре соответствует клеткам имагинальных дисков личинки. Байкенова и соавторы (1986) проанализировали спектры изоферментов эстеразы в ходе роста культуры 79f7Dv3g (*D. virilis*). Показано соответствие эстераз личиночной стадии с эстеразами клеток пересеваемой культуры. Спектр эстераз оказался нестабильным. При длительном выдерживании клеток культуры без пассирования в ней была обнаружена индукция β -формы эстеразы, типичной для имаго дрозофилы.

Дебек (Debec, 1974) сравнил линию Kc с различными органами и тканями *D. melanogaster* по 25 различным ферментным системам, участвующим в различных биохимических процессах. Обнаружилось, что ферментный «профиль» линии клеток Kc сильно отличается от экстрактов цельных эмбрионов, личинок, куколок и имаго. Согласно его выводам, ферментный «профиль» пересеваемых линий дрозофилы, по крайней мере линии клеток Kc, больше соответствует ферментному составу имагинальных дисков или нервной ткани личинки 3-й стадии. Данный результат не удивителен, так как именно эти клетки и являются активно делящимися в среде гемолимфы насекомого.

Персистенция вирусов. На рис. 4 представлена картина цитоплазматической РНК вирусов, персистирующих в некоторых культурах клеток. Ранее эти вирусы в клетках линии 67j25D были идентифицированы как реовирусы (Алаторцев, 1980). Затем было проведено электронно-микроскопическое исследование реовирусов в клеточных линиях *D. melanogaster* и *D. virilis* (Золотова и др., 1996). Вирусоподобные частицы оказались морфо-

логически идентичными в обеих линиях. Полученные нами данные не позволяют согласиться с мнением Алаторцева о происхождении реовирусов из эмбриональной сыворотки млекопитающих, регулярно используемой для комплементации культуральной среды (Алаторцев, 1980), на основании четкого различия в спектре полос, сохраняющихся неизменными на протяжении нескольких месяцев культивирования, и на том основании, что в линиях S2 и S3 клетки остаются неинфицированными в стандартных условиях культивирования, несмотря на использование сред идентичного состава. Обоснованным представляется предположение о наследовании вирусов от мух, послуживших источником получения этих линий клеток. Использование для обогащения среды экстрактов различных насекомых на разных стадиях развития (яйца, куколки, личинки и т. д.) также может быть причиной инфицирования культивируемых клеток.

Экспансия ретротранспозонов в пересеваемых клеточных культурах дрозофилы. Иммуортализация любой клеточной линии обязательно сопряжена с индукцией синтеза хромосомных теломер. У дрозофилы теломеры образованы tandemными повторами двух семейств ретротранспозонов: *HetA* и *TART*, экспансия которых необходима для предотвращения потерь концов хромосом у делящихся клеток (Pardue, De Baryshe, 2003). Интересно, что перемещения и экспрессия ряда других семейств ретротранспозонов, не участвующих в синтезе теломер, также активируются в культуре клеток. Причины такой индукции неизвестны, тем не менее изменение количества копий ретротранспозонов и их локализация в геноме могут быть использованы в идентификации клеточных линий.

Ретротранспозон *gypsy* амплифицируется в культуре 67j25D (Bayev et al., 1984). Из двух форм ретротранспозона, выявляемых по наличию или отсутствию сайта HindIII, амплифицируется преимущественно только форма, содержащая сайт HindIII. В этой же линии клеток обнаружена амплификация полноразмерной формы *mdg3*, тогда как в линии Kc амплифицируется укороченный вариант *mdg3*, содержащий делецию длиной 1.3 тыс. пар нуклеотидов (Ilyin et al., 1984). Для возникновения межлинейных различий по копияности и локализации ретротранспозонов не требуется гетерогенности исходных клеток. Клеточная линия *D. melanogaster*, полученная от высокоинбридной линии мух, оказалась резко отличной от этой линии по локализации ретротранспозонов *copia*, *1731*, *412*, *297* и *gypsy* (Di Franko et al., 1992).

Подробный анализ ретротранспозиций шести семейств ретротранспозонов проведен в линии Kc (Junakovic et al., 1988). Амплификация и перемещения ретротранспозонов оказались четко ограничены во времени периодом трансформации первичной культуры в пересеваемую. В установившейся линии клеток, непрерывно пассировавшейся на протяжении 8 лет, обнаружены лишь незначительные различия в локализации и копияности ретротранспозонов, выявляемых методом Southern-гибридизации. В то же время четыре параллельно полученные линии клеток единого происхождения имели множественные различия между собой и с исходной линией мух и по копияности, и по локализации ретротранспозонов *297*, *412*, *B104*, *mdg1*, *copia* и *1731*. Возникающий в процессе трансформации клеток полиморфизм оказывался впоследствии «замороженным» в стабильной пересеваемой культуре. Новое зафиксированное распо-

ложение ретротранспозонов в геноме оказывается специфичным для линии. Вместе с тем устойчивость такого «паспорта» линии в условиях возможных стрессов и сигналов, индуцирующих экспрессию ретротранспозонов, остается малоизученной.

Авторы выражают благодарность Н. Г. Шуппе за конструктивное обсуждение результатов работы.

Список литературы

- Алаторцев В. Е., Ананьев Е. В., Гуцина Е. А. 1980. Вирус рео-типа в пересеваемых культурах клеток *Drosophila melanogaster*. ДАН СССР. 252 : 1486—1489.
- Андреанов Б. В., Какпаков В. Т., Шуппе Н. Г. 1991. Количественные изменения генома пересеваемых линий эмбриональных клеток дрозофилы. Первая Всесоюз. конф. по генетике насекомых: Тез. докл. М.: Наука. 8.
- Андреанов Б. В., Сорокина С. Ю., Горелова Т. В., Митрофанов В. Г. 2003. Полиморфизм митохондриальной ДНК природных популяций дрозофил группы *virilis*. Генетика. 39 (6) : 762—768.
- Байкенова А. А., Брауде-Золотарева Т. Я., Какпаков В. Т., Иващенко Н. И., Корочкин Л. И., Шуппе Н. Г. 1986. Изменение спектра изоферментов эстеразы в ходе роста культур эмбриональных клеток *Drosophila virilis*. Онтогенез. 17 (5) : 535—537.
- Гвоздев В. А., Какпаков В. Т. 1968. Культура эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster* in vitro. Генетика. 2 : 129—142.
- Золотова Л. И., Андреанов Б. В., Горелова Т. В., Клиунова Н. В., Резник Н. Л., Шуппе Н. Г. 1996. Полиморфизм вирусоподобных частиц ретротранспозонов в клетках дрозофилы и дрожжей. Генетика. 32 (11) : 1528—1535.
- Какпаков В. Т., Гвоздев В. А., Платова Т. П., Полукарова Л. Г. 1969. Линии эмбриональных клеток *Drosophila melanogaster*, пересеваемых in vitro. Генетика. 5 (12) : 67—75.
- Какпаков В. Т., Гвоздев В. А., Полукарова Л. Г., Бириштейн В. Д., Платова Т. П. 1969. Культура эмбриональных клеток дрозофилы. Характер роста, кариотип и функционирование сцепленных с полом генов. В кн.: Структура и генетические функции биополимеров. М. 1 : 61—77.
- Какпаков В. Т., Мухоматова Л. М., Шуппе Н. Г. 1986. Особенности хромосомной изменчивости в различных линиях и клонах длительно пересеваемых линий эмбриональных клеток дрозофилы. В кн.: Матер. III Всесоюз. конф. по генетике соматических клеток в культуре. М.: Наука. 112.
- Какпаков В. Т., Полукарова Л. Г. 1975. Полиплоидизация и слияние клеток насекомых под влиянием конкаваллина А. ДАН СССР. 223 (1) : 209—212.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
- Полукарова Л. Г., Какпаков В. Т., Гвоздев В. А. 1975. Хромосомная изменчивость в пересеваемых культурах эмбриональных клеток дрозофилы. Генетика. 2 (5) : 46—50.
- Bayev A. A., Lyubomirskaya N. V., Dzhumagaliev E. V., Ananiev E. V., Animatova I. G., Ilyin Y. V. 1984. Structural organization of transposable element *mdg4* from *Drosophila melanogaster* and a nucleotide sequence of its long terminal repeats. Nucl. Acids Res. 12 : 3707—3723.
- Becker J. L. 1972. Fusions in vitro de cellules somatiques en culture de *Drosophila melanogaster* induites par la Con A. C. R. Acad. Sci. 275 : 2969—2972.
- Bello F. J., Rodrigues J., Escovar J., Olano V. A., Morales A., Gonsales M., Rey G. 2001. A new continuous cell line from mosquito *Psorohora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infections with some arboviruses. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96 : 1—9.
- Braude-Zolotarjova T. Ya., Какпаков В. Т., Шуппе Н. Г. 1986. Male diploid embryonic cell line of *Drosophila virilis*. In Vitro Cell. Develop. Biol. 22 : 481—484.

- Debec A. 1974. Isozymic patterns and functional states of *in vitro* cultured cell lines of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux's Arch. 174 : 1—19.
- Di Franco C., Pisano C., Fourcade-Perronet F., Echaliier G., Junakovic N. 1992. Evidence for De Novo rearrangements of *Drosophila* transposable elements induced by passage to the cell culture. Genetica. 87 : 65—73.
- Dolfini S., Gottardi A. 1966. Changes of chromosome number in cells of *Drosophila melanogaster* cultured *in vitro*. Experientia. 3 : 144—146.
- Echaliier G. 1997. *Drosophila* cells in culture. New York: Acad. Press. 702 p.
- Echaliier G., Ohanessian A. 1970. *In vitro* culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. In Vitro. 6 : 162—172.
- Goodman C. L., El Sayed G., McIntosh A. H., Grasela J. J., Stiles B. 2001. Establishment and characterization of insect cell lines from 10 lepidopteran species. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 37 : 367—373.
- Grace T. D. C. 1962. Establishment of four strain of cells from insect tissues grown *in vitro*. Nature. 195 : 788—789.
- Grace T. D. C. 1967. Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombix mori*. Nature. 216 : 613.
- Grasela J. J., McIntosh A. H. 2003. Application of inter-simple sequence repeats to insect cell lines: identification at the clonal and tissue-specific level. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 39 : 353—363.
- Halfer C. 1978. Karyotypic evolution in an originally XY cell line of *Drosophila melanogaster*. A case of heterochromatin increase *in vitro*. Chromosoma. 68 : 149—163.
- Hink W. F. 1970. Establishment insect cell line from cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Nature. 226 : 466—467.
- Illmensee K. 1978. Genetic mosaic and cell differentiation. Berlin; New York: Springer-Verlag.
- Ilyin Y. V., Schuppe N. G., Lyubomirskaya N. V., Gorelova T. V., Arkhipopova I. R. 1984. Circular copies of mobile dispersed genetic elements in cultured *Drosophila melanogaster* cells. Nucl. Acids Res. 12 : 7517—7531.
- Junakovic N., Di Franco C., Best-Belpomme M., Echaliier G. 1988. On the transposition of copia-like nomadic elements in cultured *Drosophila* cells. Chromosoma. 97 : 212—218.
- Kurtti T. J. 1974. The development of insect tissue culture systems for studying intracellular symdiotes. Ph. D. Dissertation. Department of Entomology, Fisheries and Wildlife, University of Minnesota, Minneapolis.
- Laird C. D. 1971. Chromatid structure: relationship sequence diversity. Chromosoma. 32 : 378—406.
- Levi H. C., Garcia-Maruniak A., Maruniak J. F. 2002. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. Florida Entomologist. 85 : 186—190.
- Lynn D. E. 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 37 : 319—321.
- Mitsuhashi J. 2001. Development of highly nutritive culture media. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 37 : 330—337.
- Mitsuhashi J., Hayasaka S., Imanishi S. 2003. Continuous cell lines from the common white *Pieris rapae crucivora* boisduval. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 39 : 114—116.
- Mitsuhashi J., Inoue H. 1988. Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae). Appl. Entomol. Zool. 23 : 488—490.
- Pardue M., DeBaryshe P. G. 2003. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. Annu. Rev. Genet. 37 : 485—511.
- Sanchez L., Andrade J. L., Cisneros R., Zuniga G. 2004. Maintenance of midgut epithelial cells from *Dendroctonus valens* (Coleoptera: Scolitidae) *in vitro*. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Animal. 40 : 8—13.
- Schneider I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morphol. 27 : 353—365.
- Singh K. R. P. 1967. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). Curr. Sci. 36 : 506—508.
- Tapay L. M., Lee G., Brock J. A., Nadala E. C. B., Loh P. C. 1995. Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with Simian Virus-40 (T) antigen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 209 : 734—778.
- Tarantul V. Z., Kakpakov V. T., Gvozdev V. A. 1971. Protein, RNA and DNA synthesis in the established line of diploid cells of *Drosophila melanogaster in vitro*. Drosophila Inf. Serv. 47—76.
- Vi K., Veda R., Miyake T. 1987. Cell lines from imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. In Vitro. 23 : 707—711.
- Yasunaga-Aoki C., Imanishi S., Iiyama K., Kawarabata T. 2004. Establishment of fagocytic cells lines from larval hemocytes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. In Vitro. Cell. Develop. Biol.-Animal. 40 : 183—186.

Поступила 18 X 2005

VARIABILITY OF CONTINUOUS INSECT CELL LINES AND THEIR IDENTIFICATION

D. Y. Panteleev,¹ V. T. Kakpakov, T. V. Gorelova, B. V. Andrianov

¹ N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow;
e-mail: mycobiota@yandex.ru

Continuous insect cell lines make a special object of research in biology. Insect cells in the established lines differ in the number of attributes from both normal differentiated, and embryonic cells. The period of genome destabilization necessarily precedes cell line immortalization. Genome destabilization is manifested by changes in genome size, cell karyotype, amplification of some retrotransposone families, and induction of their expression. The existence of significant genetic variability in one line puts a problem of searching for invariant attributes providing culture identification and defining the limits of normal polymorphism of cells in the culture. Using the vast collection of insect continuous cell lines stored at the N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, nine lines were identified by RFLP method of mitochondrial DNA. Variability of DNA-polymorphisms, cellular karyology, morphology, immunological and biochemical attribute in the culture is discussed.

Key words: continuous insect cell lines, RFLP, retrotransposones, virus persistence.