

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОНОСЛОЙНОЙ И СУСПЕНЗИОННОЙ ЛИНИЙ КЛЕТОК ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА CHO^{dhfr-}

© В. Н. Стефанова,^{1,*} Н. М. Ярцева,¹ А. В. Петров²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,
² Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепараторов
Федерального медико-биологического агентства РФ, Санкт-Петербург, 197110;
* электронный адрес: vestefan@mail.ru

Кариотипы монослоиной и супензионной линий яичника китайского хомячка CHO^{dhfr-} исследованы с помощью GTG-метода дифференциального окрашивания. Модальные числа хромосом равнялись 20 и 18 соответственно. Для обеих проанализированных линий были характерны стабильность кариотипа и постоянство соотношения нормальных и структурно перестроенных хромосом. Моносомия отмечена для хромосом 1, 2, 4, 5 и 8 в обеих линиях CHO^{dhfr-} и для хромосомы 9 в супензионной линии CHO^{dhfr-}. Для кариотипов обеих исследованных линий характерны следующие хромосомные перестройки: преобразование del(5)(p1.2) в add(5)(p1.2), включение части делецииированной хромосомы 7 в der(6)t(1;6) и моносомия хромосомы 9. Сопоставление результатов нашего анализа с литературными данными о кариотипах различных линий CHO позволило выявить пять общих для всех линий хромосомных перестроек: del(2), inv(3), add(6), del(9) и mar 3. В нашем исследовании в кариотипах линий CHO^{dhfr-} и CHO^{dhfr-/susp} были обнаружены три уникальные структурные перестройки хромосом: del(1), der(6)t(1;6) и mar1.

Ключевые слова: клеточные линии CHO^{dhfr-}, кариотип, маркерные хромосомы, хромосомные перестройки.

Принятые сокращения: ДГФР — дигидрофолатредуктаза, НХ — нормальные хромосомы, СПХ — структурно перестроенные хромосомы, НГ — нормальный гомолог, CHO^{dhfr-} — линия клеток яичника китайского хомячка, дефицитная по дигидрофолатредуктазе, GTG-метод — G окрашивание хромосом с помощью трипсина и красителя Гимза.

Линия клеток CHO была получена из яичника китайского хомячка в 1958 г. (Tijio, Puck, 1958). Небольшое число разнообразных по форме и размерам хромосом в кариотипе китайского хомячка ($2n = 22$) и сравнительная простота культивирования клеток этой линии сделали ее одной из самых широко известных и наиболее часто используемых в генетических и биомедицинских исследованиях.

Первоначально линию клеток CHO применяли в основном в радиобиологических исследованиях и при анализе изменений, возникших в кариотипах клеток CHO, устойчивых к различным мутагенам (Ефимова и др., 1984; Липская и др., 1994).

В 1980 г. в Колумбийском университете из имевшегося в распоряжении исследователей субклона CHO-K1 была получена первая мутантная линия CHO, дефицитная по гену дигидрофолатредуктазы (ДГФР), которая имела делецию одной аллели данного гена и нонсенс-мутацию другой (Urlaub, Chasin, 1980). В дальнейшем эта линия получила обозначение CHO-DXB11. Через 3 года в той же лаборатории из культуры CHO более ранних пассажей была получена вторая подобная линия, имеющая делецию обеих аллелей гена *Dhfr*, которая известна под

названием CHO-DG44 (Urlaub et al., 1983). Обе линии оказались чрезвычайно удобными для получения стабильно трансформированных клонов путем простой селекции на среде, дефицитной по гипоксантину и тимидину.

В настоящее время разнообразные производные этих двух дефицитных по ДГФР линий CHO используются в биофармацевтической промышленности для получения десятков тонн рекомбинантных белков в год (Jayapal et al., 2007; Wurm, Hacker, 2011). Необходимо отметить, что в последние годы активно проводится секвенирование геномов различных линий CHO (Wurm, 2013).

Вместе с тем работы по цитогенетическому анализу линий CHO, используемых в биотехнологии, с целью установления стабильности их геномов немногочисленны и в основном выполнены на сильно конденсированных хромосомах, что не позволяет точно идентифицировать многочисленные хромосомные перестройки. Предложенные унифицированные номенклатуры хромосом китайского хомячка для уровня разрешения 325 (Ray, Mohandas, 1976) и 575 (Shibasaki, Rønne, 1988) хромосомных дисков используются далеко не во всех исследованиях. Поэтому сопоставление данных по маркерам и перестроенным хромосомам разных линий CHO, культивиру-

емых в разных условиях и в разных лабораториях, чрезвычайно затруднено.

Кариотип линии DUK X (общепринятое обозначение CHO-DXB11) был описан в работе Кауфмана с соавторами (Kaufman et al., 1983). Однако авторы не проводили идентификацию GTG-окрашенных хромосом и их перестроек, а просто расположили их по убыванию размеров.

Следует подчеркнуть, что наиболее распространенным способом промышленного культивирования клеток-продуцентов является суспензионное культивирование. На первых пассажах при переводе клеток СНО из монослоя в суспензию в бессывороточной среде наблюдаются гибель значительной части клеток и резкое замедление скорости роста. При дальнейшей адаптации клеток происходит постепенное восстановление скорости роста и жизнеспособности (Петров и др., 2012), в результате весьма вероятны изменения кариотипа исходной культуры.

Поэтому в задачи настоящей работы входили детальный цитогенетический анализ монослойной и первой полученной в России суспензионной линий CHO^{dhfr-}, являющихся производными линии CHO-DXB11, и сопоставление особенностей их кариотипов с имеющимися в литературе данными, полученными при исследовании других линий СНО.

Материал и методика

Материалом для исследования служили клетки монослойной линии СНО, дефицитные по дигидрофолатредуктазе CHO^{dhfr-}, а также первый полученный в России суспензионный вариант этой линии клеток CHO^{dhfr-/susp}. Клетки монослойной линии CHO^{dhfr-} (CHO-DXB11) были получены из Международной коллекции клеточных культур ATCC (кат. № CRL-9096). Суспензионная культура CHO^{dhfr-/susp} была получена Н. М. Пигаревой (НИИ особо чистых биопрепаратов) в 2012 г. путем последовательной адаптации к коммерческим бессывороточным средам, аналогично тому как это было сделано ранее для культуры CHO-K1 (Петров и др., 2012).

Культивирование монослойной клеточной линии CHO^{dhfr-} проводили в среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров, 100 мКМ гипоксантина и 16 мКМ тимидина при 37 °C и 5 % CO₂ во флаконах T-25 или T-75. Клетки пассировали каждые 4 сут, снимая с пластика раствором трипсина—версена и пересевая в плотности 6 · 10³ кл./см².

Клетки CHO^{dhfr-/susp} культивировали в центрифужных пробирках типа Falcon объемом 50 мл в среде CDM4CHO с 4мМ глютамина, 5 % питательной добавки ExCell CD Hydrolysate Fusion, 100 мКМ гипоксантина и 16 мКМ тимидина при 37 °C и 5 % CO₂ в шейкер-инкубаторе LT-X с частотой вращения 180 об/мин. Пересев проводили каждые 3 сут, при этом клетки центрифугировали при 100 g и ресуспендировали в свежей среде в концентрации 5 · 10⁵ кл./мл.

Для цитогенетического анализа использовали клетки после 6-го пассажа. За 1—1.5 ч до получения препаратов хромосом в среду для культивирования вводили колцемид в концентрации 0.05 мКг/мл. После этого суспензию клеток обрабатывали гипотоническим 0.075 M раствором KCl в течение 10—15 мин, а затем клетки фиксировали в трех сменах стандартного фиксатора (метанол—ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1). Для определения

модального числа хромосом в наборе каждой линии анализировали по 100 метафазных пластинок, окрашенных рутинным способом с использованием красителя Гимза. Отбор клеток для подсчета числа хромосом проводили, используя критерии разработанные Мамаевой (Мамаева, 1997). Частоту встречаемости полиплоидных клеток определяли при подсчете 1000 метафазных пластинок. Для дифференциального окрашивания хромосом анализируемых линий использовали модифицированный метод G-окрашивания хромосом с помощью трипсина и красителя Гимза (GTG-метод) (Ozkinay, Mitelman, 1979). Хромосомы идентифицировали согласно номенклатуре хромосом китайского хомячка *Cricetulus griseus* (Ray, Mohandas, 1976). Анализ и описание перестроек хромосом в хромосомному наборе осуществляли в соответствии с Международной системой номенклатуры хромосом человека (Shaffer et al., 2009), поскольку для хромосом животных (китайского хомячка) такой системы не существует. Согласно этой номенклатуре, маркерные хромосомы — структурно перестроенные хромосомы, происхождение которых не установлено.

Препараты анализировали на аппаратно-программном комплексе, включающем в себя микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия), черно-белую CCD-камеру высокого разрешения ProgRes MF (Jenoptik, 1360 × 1024 пикселя) и компьютер с установленным программным обеспечением «ВидеоTecT-Карто 3.1.» (ООО ВидеоТечТ, Россия) (<http://www.videotest.ru/ru/products/9>). Поскольку классификатор для автоматического распознавания хромосом китайского хомяка до сих пор не разработан, кариотипирование метафазных пластинок анализируемых линий проводили в полуавтоматическом режиме, анализируя по 20 GTG-окрашенных метафазных пластинок каждой линии.

В работе использованы следующие реактивы: среды DMEM/F12 и CDM4CHO (HyClone, США); эмбриональная сыворотка коров (HyClone, США); глютамин и раствор трипсина—версена (Биолот, Россия); гипоксантин и тимидин (Sigma, США); питательная добавка ExCell(tm) CD Hydrolysate Fusion (SAFC Biosciences, США); колцемид (BioInd, Израиль).

Результаты

Клетки монослойной линии CHO^{dhfr-} имели четко выраженное гиподипloidное модальное число хромосом, равное 20 (табл. 1) с пределами варьирования от 18 до 21 хромосом. Доля полиплоидных клеток составляла 26.3 %. В кариотипе обнаружили всего 7 нормальных хромосом (НХ), причем хромосома 9 имела 2 нормальных гомолога (НГ) и одну дополнительную копию с делецией терминальных участков как короткого, так и длин-

Таблица 1
Вариабельность числа хромосом
в метафазных пластинках монослойной и
суспензионной линий CHO^{dhfr-}

Линия СНО	Частота клеток с данным числом хромосом, %				
	17	18	19	20	21
CHO ^{dhfr-}	0	2	9	82	7
CHO ^{dhfr-/susp}	6	86	4	3	1

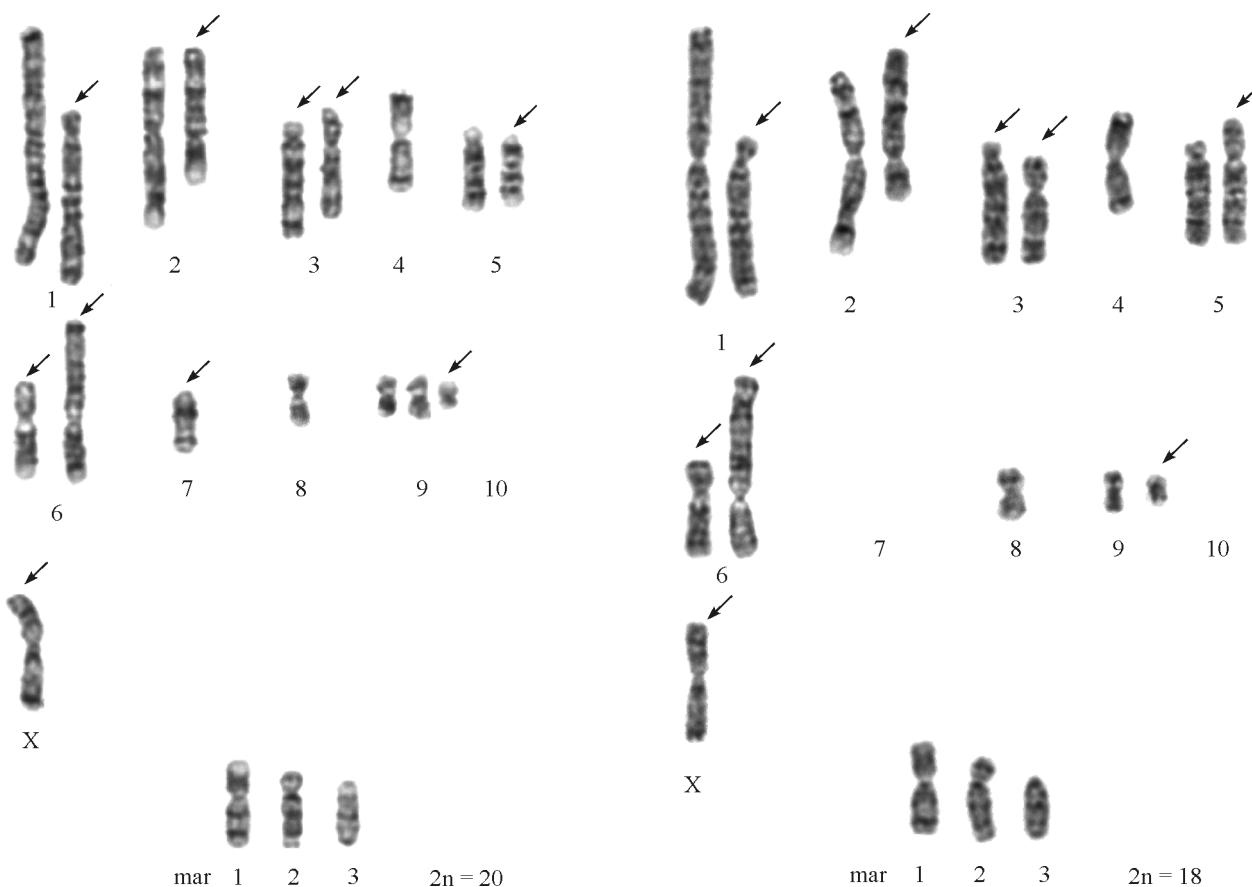


Рис. 1. Модальный гиподиплоидный кариотип клетки линии $\text{CHO}^{\text{dhfr}-}$ с монослоиным типом роста.

$20,-X,\text{der}(X)t(X;4)(p1.6;p2.1),\text{del}(1)(p1.5q4.4),\text{del}(2)(q1.1q1.7)\text{ins}(2)(p?25?q2.2q1.7),\text{inv}(3)(p2.7q1.3),\text{del}(3)(p2.1)\text{add}(3)(p2.1)\text{add}(3)(q3.1),-4,\text{del}(5)(p1.2),\text{add}(6)(p1.4),\text{der}(6)(1;6)(p1.5;p1.3),-7,\text{del}(7)(p1.1),-8,+9,\text{del}(9)(p1.5q2.1),-10,-10,+3\text{mar}.$ mar — маркерные хромосомы; стрелки указывают на структурно перестроенные хромосомы. GTG-метод окрашивания. Об. 100 \times .

Рис. 2. Модальный гиподиплоидный кариотип клетки линии $\text{CHO}^{\text{dhfr}-}/\text{susp}$ с супензионным типом роста.

$18,-X,\text{der}(X)t(X;4)(p1.6;p2.1),\text{del}(1)(p1.5q4.4),\text{del}(2)(q1.1q1.7)\text{ins}(2p?q2.2q1.7)\text{add}(2)(q3.7),\text{inv}(3)(p2.7q1.3),\text{del}(3)(p2.1)\text{add}(3)(p2.1)\text{add}(3)(q3.1),-4,\text{add}(5)(p1.2),\text{add}(6)(p1.4),\text{der}(6)(1;6)(p1.5;p1.3)\text{ins}(1p2.10;7q1.3),-7,\text{del}(7)(p11),-8,\text{del}(9)(p1.5q2.1),-10,-10,+3\text{mar}.$ mar — маркерные хромосомы; стрелки указывают на структурно перестроенные хромосомы. GTG-метод окрашивания. Об. 100 \times .

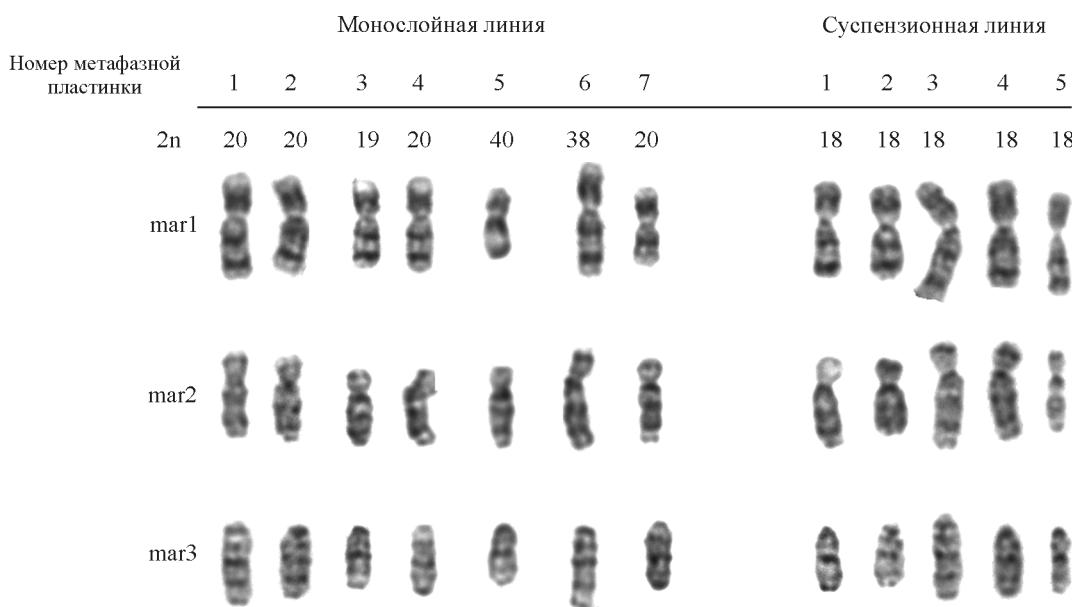


Рис. 3. Ряды стабильных маркерных хромосом линий $\text{CHO}^{\text{dhfr}-}$ с монослоиным и супензионным типами роста. mar — маркерные хромосомы. GTG-метод окрашивания. Об. 100 \times .

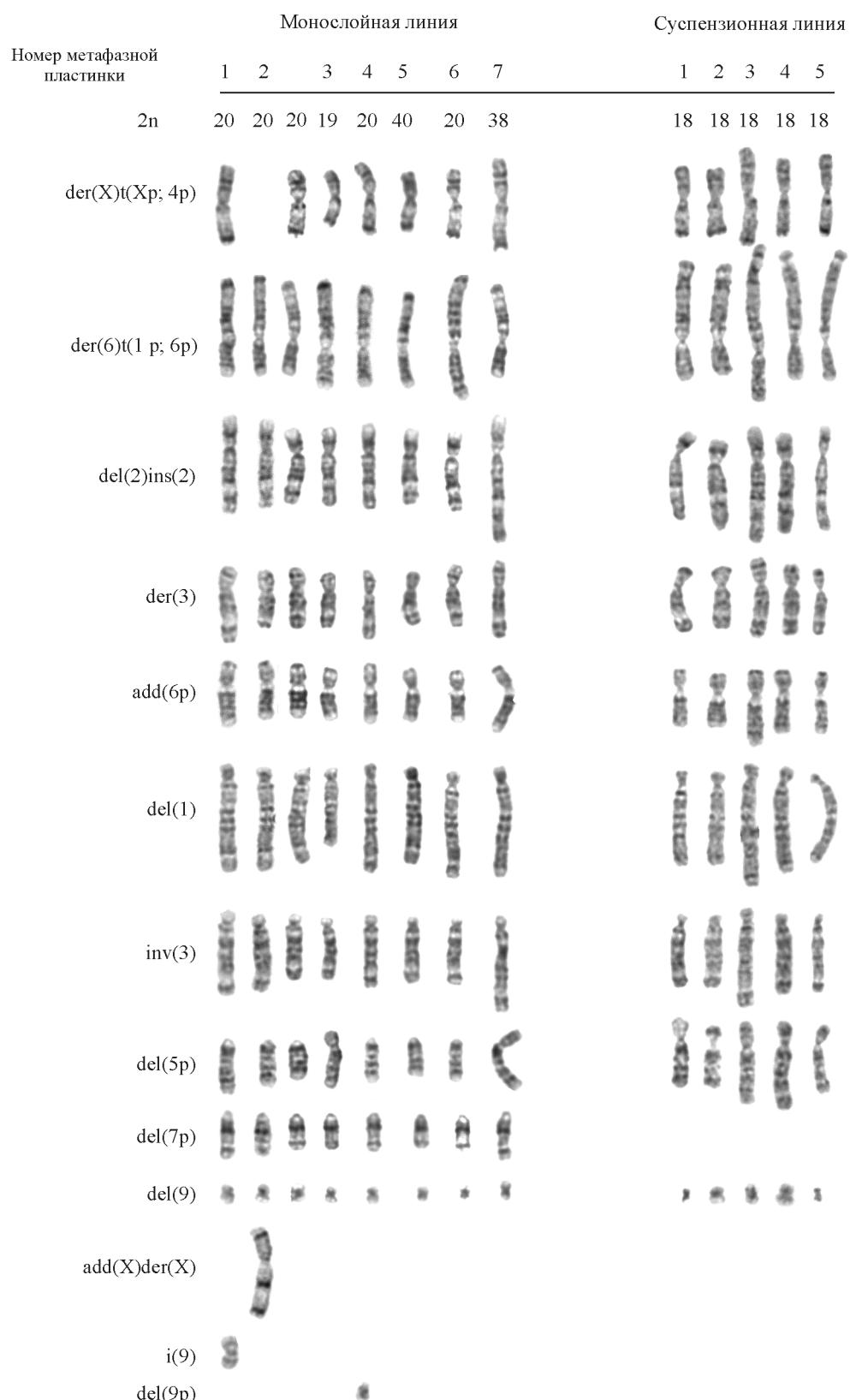


Рис. 4. Ряды стабильных и нестабильных структурно перестроенных хромосом линий CHOD^{dhfr} с монослоиня и суспензионным типами роста.

Идентификация структурно перестроенных хромосом проведена согласно ISCN, 2009, 2n — число хромосом в метафазе, add — добавочный хромосомный материал, del — делеция, der — дериват, ins — инсерция, inv — инверсия, t — транслокация GTG-метод окрашивания. Об. 100×.

ного плеча. Отмечена моносомия хромосом 1, 2, 4, 5 и 8, а НГ хромосом 3, 6, 7, 10 и X не обнаружено. Среди 13 структурно перестроенных хромосом (СПХ) выявляли хромосомы, образовавшиеся за счет межхромосомных перестроек или сочетания различного типа перестроек внутри одной хромосомы (хромосомы 2 и 3). Так, перестроенная хромосома 3 образована в результате делеции большей части короткого плеча и присоединения к терминальным концам обоих плеч неидентифицированного хромосомного материала (рис. 1). Перестроенная хромосома 2, вероятно, образована инверсией значительной части длинного плеча в короткое и затем частичной делецией инвертированного материала. Среди СПХ не выявлено материала хромосомы 10 и длинного плеча хромосомы X. Происхождение трех хромосом установить не удалось, они обозначены как маркерные хромосомы в соответствии с Интернациональной системой номенклатуры хромосом человека.

Число хромосом в линии CHO^{dhfr-}/susp варьировало от 18 до 20, гиподиплоидное модальное число равно 18 (86 % клеток), а доля полиплоидных клеток составляла 28.2 %. Уменьшение модального числа хромосом по сравнению с монослоиной линией обусловлено отсутствием одного НГ хромосомы 9 и перестроенного гомолога хромосомы 7, образованного делецией короткого плеча (рис. 2). Так же как и в монослоиной линии, наблюдалась моносомия хромосом 1, 2, 4, 5, 8 и 9. Материал хромосом 3, 6, 7 и X частично или полностью содержится в маркерных хромосомах или в неидентифицированных участках СПХ, которые выявлены во всех проанализированных метафазах обеих линий (рис. 3, 4). Хромосому 10 обнаружить не удалось.

При этом в кариотипе линии CHO^{dhfr-}/susp идентифицировали 12 СПХ. В деривате хромосомы 6 — der(6)t(1;6)ins(1p2.10;7q1.3) — выявлен дополнительный хромосомный материал в виде большого гетерохроматинового блока в ее длинном плече. Вероятно, это район 7q1.3 перестроенной хромосомы del(7), а другая ее часть утрачивается, поскольку del(7) отсутствует в кариотипе этой линии. Кроме того, в супензионной линии почти во всех клетках хромосома del(5)(p1.2) была преобразована в add(5)(p1.2).

В клоне этой линии с числом хромосом 19 в отличие от модального клона наблюдали делецированную хромосому 7, а в длинном плече деривата хромосомы 6 — der(6)t(1;6)(p1.5;p1.3) — отсутствовал дополнительный гетерохроматиновый блок (рис. 5).

Несмотря на большое число СПХ, клетки обеих линий имеют стабильный кариотип: четко выраженный модальный класс по числу хромосом, а также по числу и составу СПХ (рис. 4, 5). Только в некоторых клетках линии CHO^{dhfr-} наблюдали дополнительные структурные изменения хромосом. Такой нестабильной была хромосома 9: в результате разрыва в прицентромерном районе в двух клетках она была обнаружена в виде короткого или длинного плеча (рис. 5, метафазная пластинка 5), а в двух других клетках — в виде изохромосомы (рис. 5, метафазная пластинка 1). В двух клетках наблюдали изменение деривата хромосомы X — der(X)t(Xp;4p). В метафазных пластинках 4 и 8 был выявлен дополнительный хромосомный материал на коротком плече делецированной хромосомы 5 (рис. 5).

Таким образом, сравнительный цитогенетический анализ клеток CHO^{dhfr-} показал, что изменение способа культивирования клеток с монослоиного на супензион-

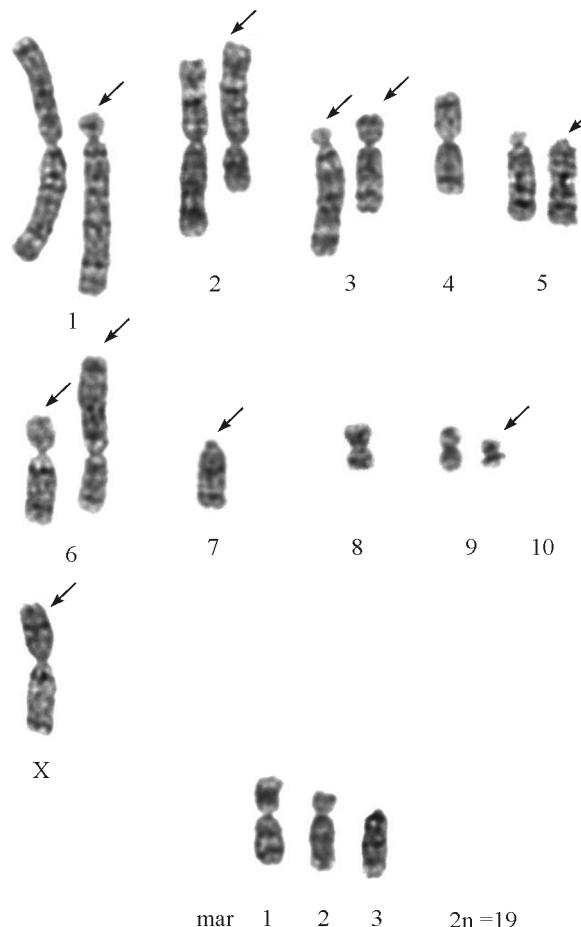


Рис. 5. Гиподиплоидный кариотип клетки линии CHO^{dhfr-}/susp с супензионным типом роста.

19,-X,der(X)t(X;4)(p1.6;p2.1),del(1)(p1.5q4.4), del(2)(q1.1q1.7)ins(2p?q2.2 q1.7)add(2)(q3.7),inv(3)(p2.7q1.3), del(3)(p2.1)add(3)(p2.1)add(3)(q3.1), -4,del(5)(p1.2),add(6)(p1.4), der(6)t(1;6)(p1.5;p1.3), -7,del(7)(p1.1),-8,del(9)(p1.5q2.1),-10,-10,+3mar. mar — маркерные хромосомы; стрелки указывают на структурно перестроенные хромосомы. GTG-метод окрашивания. Об. 100×.

ный не привело к множественным изменениям кариотипа. В клетках супензионной линии отмечены исчезновение одного НГ хромосомы 9, делеция хромосомы 7 и превращение del(5)(p1.2) в add(5)(p1.2), а также, по нашему мнению, включение в дериват 6 части хромосомы 7.

Обсуждение

Сопоставление результатов цитогенетического анализа изученных нами монослоиной и супензионной линий CHO^{dhfr-} с данными других авторов приведено в табл. 2. В исследованных линиях СНО модальное число хромосом в кариотипе варьировало от 21 (Deaven, Petersen 1973; Worton et al., 1977) до 18 в клетках линии CHO^{dhfr-}/susp. Количество НХ в разных линиях СНО также варьирует от 10 (Worton, et al., 1977) до 6 в клетках линии CHO^{dhfr-}/susp.

Большая часть хромосом кариотипа оказалась вовлечена в структурные перестройки. Например, НГ хромосом 3 и 6 отсутствуют во всех линиях и клонах СНО, эти хромосомы являются самыми нестабильными хромо-

Таблица 2

Анеуплоидия хромосом в клетках различных линий СНО

Исследованный вариант линии СНО	Авторы исследования	Модальное число хромосом	Число нормальных хромосом	Число гомологов нормальных хромосом									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CHO	Deaven, Petersen, 1973	21	8	1	1	—	—	1	—	1	1	1	1
	Worton et al., 1977	21	10	2	1	—	—	1	—	1	2	1	1
DXB11 (DUKX)	Kaufman et al., 1983	?20	7	1	1	—	1	?1	—	?—	1	2	—
	Филатов, Мамаева, 1985	20	9	2	1	—	1	2	—	1	1	1	—
CHO-K1	Липская и др., 1994	19	8	2	1	—	—	2	—	—	1	1	1
	DG 44	Derouazi et al., 2006	20	7	2	1	—	1	1	—	—	1	1
CHO ^{dhfr-}	Авторы настоящей работы	20	7	1	1	—	1	1	—	—	1	2	—
CHO ^{dhfr-/susp}	То же	18	6	1	1	—	1	1	—	—	1	1	—

Таблица 3

Сопоставление идентичных маркеров и хромосомных перестроек в линиях СНО по литературным данным

Deaven et al., 1973 (CHO)	Worton et al., 1977 (CHO)	Kaufman et al., 1983, DXB11 (DUK-X)	Филатов, Мамаева, 1985 (CHO-K1)	Липская и др., 1994 (CHO-K1)	Derouazi et al., 2006 (DG 44)	Настоящая работа (CHO ^{dhfr-})	Настоящая работа (CHO ^{dhfr-/susp})
—	—	?der(X)	Z2	M1	der(X)	der(X)	der(X)
—	—	?del(1)	—	—	—	del(1)	del(1)
Z2	Z2	?der(2)ins(2p)	Z3	Z2	Z2	del(2) Перестроенная Z2	del(2)add(2p)
Z4	Z4	?inv(3)	Z9	Z4	Z4	inv(3)	inv(3)
—	—	?der(3)	Z4	?M2	?mar1	der(3)	der(3)
Z6	—	?del(5)	—	—	—	del(5)	add(5)
Z8, Z9	Z8, Z9	add(6)	Z5-t(6q;9p), Z11-t(6q;9q)	Z8, Z9	Z8	add(6)	add(6)
—	—	?der(6)t(1p;6p)	—	—	—	der(6)t(1p;6p)	der(6)t(1p;6p)ins(1p;7q)
Z10	Z10	?del(7)	—	—	—	del(7)	—
Z13	Z13	?del?(9)	Z12	Z13	?Z13	del?(9)	del?(9)
Z7	Z7	?Z1	Z6	Z7	der(4)	mar1	mar1
—	—	?Z2	?Z10	?M3	mar2	mar2	mar2
—	—	?	—	—	—	mar3	mar3

Примечание. Z — структурно перестроенные хромосомы, M и mar — маркерные хромосомы в разных линиях СНО.

сомами кариотипа китайского хомячка. Оба НГ хромосом X и 10 также отсутствуют почти во всех вариантах, за исключением двух вариантов линий CHO (Deaven, Petersen 1973; Worton et al., 1977) и линии CHO-K1 (Липская и др., 1994). У хромосомы 2 во всех вариантах линии СНО стабильно наблюдался один НГ, количество НГ других хромосом отличалось в клетках разных линий.

Согласно имеющимся литературным данным, изученные нами клетки относятся к линии СНО-DXB 11 и исторически были получены из клеток CHO-K1 с помощью гамма-облучения (Wurm, 2013).

Вместе с тем кариотип клеток линии CHO-K1 (Филатов, Мамаева, 1985) отличается от кариотипа клеток изученных нами линий. Модальное число хромосом клеток линии CHO-K1 было равно 20, но НХ — 9, так же как и в клетках нашей суспензионной линии отсутствовал один НГ хромосомы 9, но только один гомолог хромосом 7 вовлекался в структурные перестройки, а гомологи хромосом 1 и 5 в перестройках не участвовали. Среди 11 структурно перестроенных хромосом 7 измененных хромосом были общими для клеток CHO-K1 и DXB11 (табл. 3). Выявленные кариотипические различия между указанными

линиями возникли, скорее всего, в результате длительного культивирования в разных условиях.

Клетки линии DUK X (DXB11) и ее клонов, устойчивых к некоторым дозам метотрексата, были исследованы Кауфманом с сотрудниками (Kaufman et al., 1983). Авторами были получены GTG-окрашенные хромосомы, которые были ранжированы по размерам, однако кариотипирования и идентификации перестроенных хромосом проведено не было. Тем не менее сравнение изображений хромосом клеток DXB11 с хромосомами наших клеток CHO^{dfr}- показало, что кариотипы этих линий почти идентичны. Клетки DXB11 также имеют две хромосомные перестройки, характерные только для этих двух линий: del(1) и der(6)t(1;6).

Клетки линии DG44, геном которой имеет делецию гена *Dhfr* по двум аллелям, исходно были получены из клеток родительской линии СНО (Wurm et al., 2013). Кариотип этих клеток был исследован и проведена детальная, насколько позволяет метод G-окрашивание, идентификация СПХ (Derouazi et al., 2006; Martinet et al., 2007) (табл. 2, 3). В кариотипе присутствовало всего 7 НХ, остальные хромосомы имели структурные перестройки, из них 8 СПХ идентичны перестроенным хромосомам в клетках изученных нами линий, но der(6)t(1p;6q)ins(1p;7q), обнаруженный нами в кариотипе линии CHO^{dfr}/susp, отсутствует.

Сравнение результатов анализа СПХ в клетках разных вариантов линий СНО показало, что кариотипы всех линий имеют только 5 одинаковых структурно перестроенных хромосом — del(2), inv(3), add(6), del(9) и mar1 (табл. 3). Эти перестроенные хромосомы являются специфическими для всех линий СНО, что подтверждает происхождение линий от одного общего предка. Возможно, некоторые из этих хромосомных перестроек были первичными СПХ в родительских клетках СНО.

Кариотипы клеток исследованных нами линий CHO^{dfr}- имеют 3 одинаковые СПХ, специфические только для клеток DXB11: del(1), der(6)t(1;6) и маркерную акроцентрическую хромосому mar3. Длинное плечо этого маркера может быть образовано частью длинного плеча хромосомы 4. В суспензионной линии дериват хромосомы 6 перестроился, включив гетерохроматиновый блок, предположительно район хромосомы del(7). Эта новая хромосома является единственной новой структурной перестройкой в кариотипе клеток суспензионного варианта линии DXB11. Вероятно, вставка в ее длинное плечо части хромосомы del(7) может иметь отношение к переходу клеток к аутокринной регуляции пролиферации.

Проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что в пределах разрешающей способности метода дифференциального G-окрашивания, несмотря на нуллизомию и моносомию по многим хромосомам, большая часть материала аутосом в кариотипе клеток линии CHO^{dfr}- не утрачена. Нуллизомия или моносомия X-хромосомы, у которой длинное плечо является полностью гетерохроматиновым, по-видимому, является характерной особенностью клеток линий СНО.

С появлением метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и набора прайнинговых проб китайского хомячка стала возможной полная реконструкция кариотипов линий СНО. FISH-анализ с хромосомоспецифичными пробами китайского хомячка выявил множество транслокаций хромосом в линиях CHO-9, CHO-K1 и V-79 (Balajee et al., 1995; Xiao et al., 1996; Xiao, Natarajan, 1998). К сожалению, в этих работах не проводилось иден-

тификации хромосом с помощью GTG-метода, поэтому детально установить происхождение СПХ невозможно.

Линии DG44 и СНО-K1 были проанализированы с помощью метода BAC-FISH (FISH с хромосомоспецифичными BAC-клонами) (Omasa et al., 2009; Cao et al., 2011, 2012). В этих весьма трудоемких исследованиях для гибридизации использовали 303 BAC-кллона, результаты гибридизации представлены в виде схем. При этом анализ СПХ с использованием GTG-метода отсутствует, что затрудняет сопоставление данных, представленных для этих линий с нашими данными. Насколько можно судить по представленным схемам для линии СНО-K1, наша интерпретация хромосомных перестроек, общих для клеток СНО, была сделана достаточно точно. Перестройки der(2) и inv(3), как мы и предполагали, содержат только материал этих хромосом. В других СПХ обнаруживаются неидентифицированные области: в дериват X — der(X)t(Xp;4p) — в прицентромерной области встроен материал хромосомы 3, а в деривате хромосомы 3 добавлена часть хромосомы 8. Самая маленькая хромосома, обнаруженная в клетках всех линий СНО и обозначенная Z13, в клетках СНО-K1 содержит материал хромосом 9 и X, в то же время в кариотипе клеток DG44 подобная хромосома состоит из материала хромосом 9 и 7. Таким образом, эта хромосома может изменяться и в других линиях СНО. Моносомия хромосомы 7 и нуллизомия хромосом 10 и X не являются истинными, часть их материала обнаружена в других перестроенных хромосомах, более того, материал хромосомы 10 копируется.

Для детальной реконструкции кариотипов клеток линий СНО необходимо проводить параллельно как GTG-анализ, так и флуоресцентную гибридизацию *in situ* с прайнинговыми пробами хромосом китайского хомячка. Сочетание этих методов в будущем позволит нам уточнить, содержит ли der(6)t(1;6) в кариотипе клеточной линии CHO^{dfr}-/susp материал хромосомы 7, а также выяснить точное происхождение описанных маркеров. Планируемое нами заполнение классификатора для автоматического распознавания хромосом китайского хомяка с помощью используемой нами программы ВидеоТесТ-Картио 3.1, значительно ускорит и упростит трудоемкую процедуру цитогенетического анализа многочисленных линий СНО.

Авторы выражают благодарность Н. В. Пигаревой (НИИ особо чистых биопрепаратов), предоставившей суспензионную культуру CHO^{dfr}-/susp для цитогенетического анализа.

Список литературы

- Ефимова Е. В., Игнатова Т. Н., Гринчук Т. М., Зенин В. В., Розанов Ю. М., Третьяков А. Н. 1984. Получение и генетическая характеристика клеток китайского хомячка, устойчивых к колхицину, актиномицину D и бромистому этидию. ДАН СССР. 274 (2) : 431—434. (Efimova E. V., Ignatova T. N., Grinchuk T. M., Zenin V. V., Rozanov Yu. M., Tretyakov A. N. 1984. Isolation and genetic characteristics of Chinese hamster cells resistant to colchicine, actinomycin and ethidium bromide. Dokl. Akad. Nauk SSSR. 274 (2) : 431—434.)

Липская Л. А., Гринчук Т. М., Ефимова Е. В., Арыбацева И. В., Сорокина Е. А., Васюхин В. И. . Игнатова Т. Н. 1994. Амплификация и сверхэкспрессия генов семейства MDR в устойчивых к бромистому этидию клетках китайского хомячка СНО-K1 и в гибридах чувствительных и устойчивых клеток. Цитология. 36 (12) : 1236—1244. (Lipskaia L. A., Grinchuk T. M.,

- Efimova E. V., Artsybasheva I. V., Sorokina E. A., Vasukhin V. I., Ignatova T. N. 1994. The amplification and overexpression of mdr-family genes in ethidium bromide-resistant Chinese hamster CHO-K1 cells and in the hybrids of sensitive and resistant cells. *Tsitologiya*. 36 (12) : 1236—1244.)
- Петров А. В., Пигарева Н. В., Мурашев Б. В., Карапеев М. М., Симбирцев А. С. 2012. Адаптация клеток линии CHO-K1 к супензционному культивированию в коммерческих бессывороточных средах. *Биотехнология*. 2 : 50—58. (Petrov A. V., Pigareva N. V., Murashev B. V., Karasev M. M., Simbirtsev A. S. 2012. Adaptation of CHO cell line to cultivation in suspension in commercial mediums without serum. *Biotechnology*. 2 : 50—58.)
- Филатов Л. В., Мамаева С. Е. 1985. Стабильность кариотипа двух постоянных линий клеток китайского хомячка — CHO-K1 и V-79. *Цитология*. 27 (9) : 1031—1038. (Filatov L. V., Mamaeva S. E. 1985. Karyotype stability of 2 continuous Chinese hamster cell lines — CHO-K1 and V-79. *Tsitologiya*. 27 (9) : 1031—1038.)
- Balajee A. S., Dominguez I., Natarajan A. T. 1995. Construction of Chinese hamster chromosome specific DNA libraries and their use in the analysis of spontaneous chromosome rearrangements in different cell lines. *Cytogenet. Cell Genet.* 70 : 95—101.
- Cao Y., Kimura S., Itoi T., Honda K., Ohtake H., Omasa T. 2012. Construction of BAC-based physical map and analysis of chromosome rearrangement in Chinese hamster ovary cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* 109 : 1357—1367.
- Cao Y., Kimura S., Park J., Yamatani M., Honda K., Ohtake H., Omasa T. 2011. Chromosomes identification and its application in Chinese hamster ovary cells. *BMC Proceedings*. 5 (Suppl. 8) : 04.
- Deaven L. L., Petersen D. F. 1973. The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. *Chromosoma*. 41 : 129—144.
- Derouazi M., Martinet D., Besuchet N., Flactron R., Wicht M., Bertschinger M., Hackera D. L., Beckmann J. S., Wurm F. M. 2006. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 : 1069—1077.
- Jayapal K. P., Wlaschin K. F., Hu W.-S., Yap M. G. S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells — 20 years and counting. *Chem. Eng. Progr.* 103 : 40—47.
- Kaufman R. J., Sharp P. A., Latt S. A. 1983. Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 699—711.
- Mamaeva S. E. 1997. Karyotypic evolution of cells in culture: a new conception. *Int. Rev. Cytol.* 178 : 1—40.
- Martinet D., Derouazi D., Besuchet N., Wicht M., Beckmann J., Wurm F. M. 2007. Karyotype of CHO DG44 cells. In: *Cell technology for cell products*. Springer. 363—366.
- Omasa T., Cao Y., Park J. Y., Takagi Y., Kimura S., Yano H., Honda K., Asakawa S., Shimizu N., Otake H. 2009. Bacterial artificial chromosome library for genome-wide analysis of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol. Bioeng.* 104 : 986—994.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas*. 90 : 1—4.
- Ray M., Mohandas T. 1976. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). *Cytogenet. Cell Genet.* 16 : 83—91.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (eds). 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Karger, Basel. 138 p.
- Shibasaki Y., Ronne M. 1988. Banding studies in *Cricetulus griseus* Milne-Edwards, 1867. I. High-resolution banded karyotypes from primary cultures. *Cytogenet. Cell Genet.* 49 : 282—284.
- Tijio J. H., Puck T. T. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 108 : 259—268.
- Urlaub G., Chasin L. A. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants lacking dihydrofolate reductase activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 77 : 4216—4220.
- Urlaub G., Kas E., Carothers A. M., Chasin L. A. 1983. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell*. 33 : 405—412.
- Xiao Y., Natarajan A. T. 1998. Development of arm-specific and subtelomeric region-specific painting probes for Chinese hamster chromosomes and their utility in chromosome identification of Chinese hamster cell lines. *Cytogenet. Cell Genet.* 83 : 208—213.
- Xiao Y., Slijepcevic P., Arkesteijn G., Darroudi F., Natarajan A. T. 1996. Development of DNA libraries for Chinese hamster chromosomes 3, 4, 9, 10, X, and Y by DOP-PCR. *Cytogenet. Cell Genet.* 75 : 57—62.
- Worton R. G., Ho C. C., Duff C. 1977. Chromosome stability in CHO cells. *Somatic Cell Genet.* 3 : 27—45.
- Wurm F. M. 2013. CHO quasispecies — implications for manufacturing processes. *Processes*. 1 : 296—311.
- Wurm F. M., Hacker D. 2011. First CHO genome. *Nature Biotechnol.* 29 : 718—720.

Поступила 15 V 2015

COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS OF MONOLAYER AND SUSPENSION CHINESE HAMSTER OVARY CELL LINES CHO^{dhfr-}

V. N. Stefanova,¹ * N. M. Yartseva,¹ A. V. Petrov²

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,
and ² Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, 197110;
* e-mail: vestefan@mail.ru

The karyotypes of CHO^{dhfr-} and CHO^{dhfr-}/susp Chinese hamster ovary cell lines were investigated with the use of GTG-staining. Modal chromosome set consists of 20 and 18 chromosomes respectively. The karyotypes of both cell lines were stable with constant ratio of normal chromosomes and chromosomes with structural rearrangements. Monosomy for chromosomes 1, 2, 4, 5, 8 was observed in both cell lines and for chromosome 9 in CHO^{dhfr-}/susp cell line. The differences between CHO^{dhfr-} cell lines studied by us consists of inclusion of part of chromosome 7 in der(6)t(1;6), rearrangement of del(5) and monosomy of chromosome 9. It was shown that in karyotypes of all CHO cell lines studied up today there are 5 common structurally chromosome rearrangements: del(2), inv(3), add(6), del(9) and mar1. In both CHO^{dhfr-} cell lines investigated by us three unique chromosome rearrangements: del(1), der(6)t(1;6) and mar3 were revealed. Necessity of simultaneous GTG and FISH analysis of chromosomes rearrangements in the CHO cell lines under study is discussed.

Ключевые слова: CHO cell lines, karyotype, marker chromosomes, chromosome rearrangements.