

КУШНІРУК В. О.¹, АКОПЯН Г. Р.², МИКИТЕНКО Д. О.³, ГУЛЕЮК Н. Л.², ЗУКІН В. Д.³, ЛУКАШ Л. Л.¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

² ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79000, м. Львів, МСП 169, вул. Лисенка, 31а, e-mail: akopyan.h@ihp.lviv.ua

³ Клініка репродуктивної медицини «Надія»,

Україна, 03037, м. Київ, вул. М. Кривоноса, 19А

ДИНАМІКА УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ АБЕРАЦІЙ КАРІОТИПУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ЛІНІЇ 4BL, ВИЯВЛЕНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ARRAY CGH

Сучасна біотехнологія активно використовує клітинні лінії різного походження: це виробництво антибіотиків, ферментів, ліків з використанням звичайних та трансгенних мікроорганізмів [1], синтез калусними культурами рослин цінних алкалоїдів [2], використання тваринних та людських клітинних ліній для розробки та тестування вакцин, хіміопрепаратів; застосування стовбурових клітин (СК) в терапії захворювань різноманітної етіології [3, 4]. Існує величезна проблема пошуку донорського матеріалу, оскільки аутологічний матеріал не завжди придатний до використання, а клітинні банки не можуть забезпечити потреби всіх хворих у клітинному матеріалі. У 2006 році лабораторією Яманакі показано можливість перепрограмування геному диференційованих фібробластів шкіри у стовбурові клітини за допомогою ведення векторних конструкцій, що містили гени Oct3/4, Sox2, c-Myc і Klf4 [5], нині існують й інші підходи [6].

Нами було отримано нову стовбурову клітинну лінію 4BL, одержану із периферійної крові дорослого здорового донора. Початково вона вирощувалася на фідері мітотично інактивованих фібробластів з додаванням рекомбінатних цитокінів LIF, SCF, IL-3 (SIGMA) та 30% сироватки, кондиціонованого ембріональними гермінативними клітинами [7]. Клітинна лінія 4BL підтримується понад 220 пасажів (більше 7 років) без ознак кризи росту та старіння, що дає підстави вважати її потенційно іморталізованою. Доведена здатність даної лінії диференціюватися в адипогенному напрямі, а також у м'язову тканину, що підтверджує її стовбуровий потенціал. Морфологію та ростові властивості клітинної лінії 4BL описано в роботі [8]. За допомогою рутинного та диференційного забарвлення досліджено каріотип клітинної лінії 4BL в динамі-

ці. Незважаючи на величезний термін культивування, вона зберігає біядиплоїдний модальний клас з найбільш вірогідним каріотипом 43 хромосоми. Визначено основні структурні аберації хромосом: t (1,11) — 63 %, der 2—46 %, t (5,15) — 23 %, t (12,15) — 10 %, t (16, 21) — 5 % метафазних пластинок та шість маркерних хромосом, для уточнення природи яких застосували FISH-аналіз [9, 10]. Разом із накопиченням клітинами хромосомних аберацій відбувається зміна дози генів, у тому числі онкогенів та онкосупресорів, генів репарації, регуляції клітинного циклу та правильного проходження мітозу, генів апоптозу, величезна кількість транскрипційних факторів тощо. Виявити ці ультраструктурні зміни можливо за допомогою сучасного методу агау CGH (матрична порівняльна геномна гібридизація), що дозволяє провести одночасний скринінг всього геному та має значно більшу роздільну здатність, ніж G-banding та FISH. Метою цієї роботи є порівняльний аналіз ультраструктурних патологій каріотипу лінії 4BL, виявлених за допомогою агау CGH в динаміці на 120-му, 160-му та 205-му пасажах культивування.

Матеріали і методи

Клітинна лінія 4BL культивується як моношарова культура в середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти та 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину.

ДНК-діагностику мікроструктурних хромосомних аномалій було здійснено методом порівняльної геномної гібридизації (arrCGH) з використанням CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technology, Product code 020024) на базі клініки репродуктивної медицини «Надія». Для порівняння були взяті клітини на різних термінах культивування: 120-й, 160-й та 205-й пасажі.

З клітин було виділено ДНК за допомогою набору QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, кат № 51106) та очищено QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, кат № 28104). Отриманий біологічний матеріал у кількості 1 мкг проаналізовано відповідно до рекомендацій Oxford Gene Technology на приладі Innopsys Innoscan 710, обладнаного програмним забезпеченням OGT CytoSure Interpret Software 3.3.2.

Результати та обговорення

Відомо, що в процесі каріотипічної еволюції клітини проходять два етапи: стадію становлення, що характеризується значними хромосомними змінами і генетичною нестабільністю, та стадію стабілізації. В цій роботі проведено порівняльний аналіз 205-го пасажу, на якому клітинна лінія 4BL вже знаходиться на стадії стабілізації, та більш ранніх 120-го і 160-го пасажів. Відзначена при каріотипуванні анеуплоїдія хромосом 4, 10, 13, 17 була підтверджена методом

arrCGH на рівні ідентифікації часткових моносомій (рис. 1).

Порівнюючи структуру хромосомних аберацій на пізньому 205-му та більш ранніх 120-му і 160-му пасажах, можна зауважити, що більшість виявлених перебудов з'явилися вже на 120-му пасажі (рис. 2).

При порівнянні 120-го та 160-го пасажів спостерігається однакова картина аберацій за 4, 10, 12, 13, 16 і 19 хромосомами (рис. 2, 3). При цьому на 160-му пасажі виявлено нові дуплікації 1, 3, 6 і 8 хромосом (1p32.3, 3p22.3і 3p21.33-p21.31, 6q13-q14.1, 6q25.2-q25.3, 8p11.21-p11.1) та делецію Xp22.32-p22.31, але всі вони не виявлені на момент досягнення культурою 205-го пасажу. Таким чином, можна спостерігати унікальне явище каріотипічної еволюції в динаміці, коли зберігаються основні значні перебудови, а деякі нові, що виникають при культивуванні, в подальшому елімінуються. Звертає на себе увагу той факт, що більшість новоутворених перебудов є дупліка-

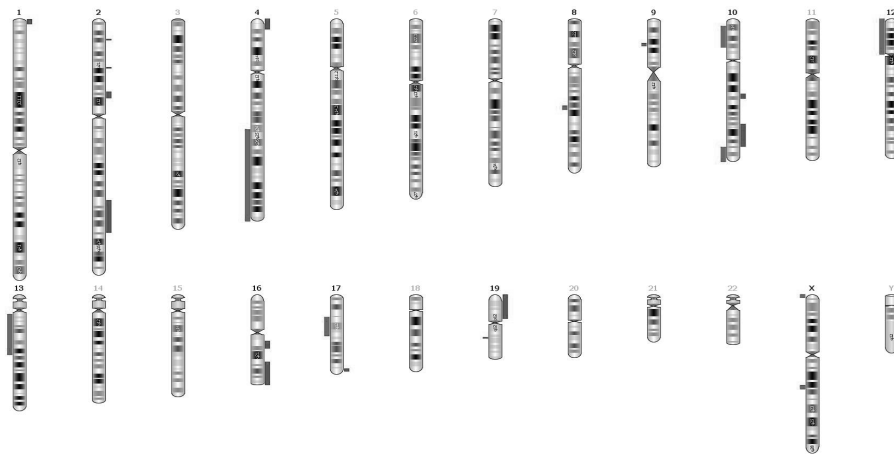


Рис. 1. Ідіограма профайлу аrray CGH клітин лінії 4BL на 205-му пасажі

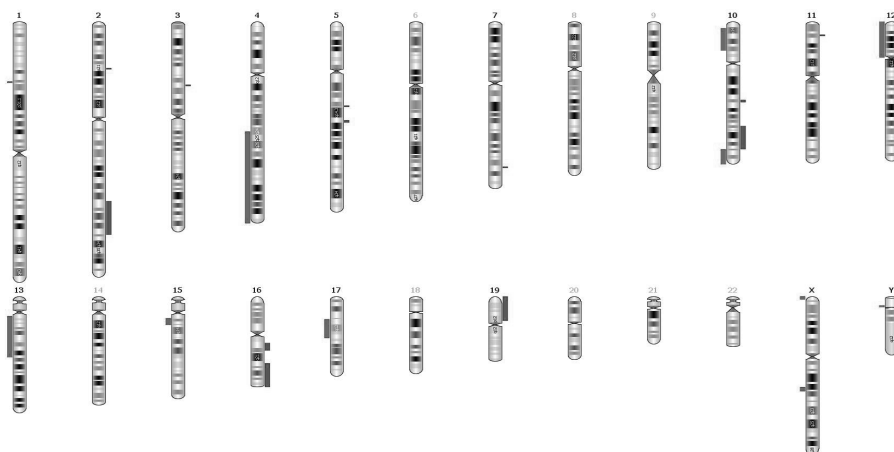


Рис. 2. Ідіограма профайлу аrray CGH клітин лінії 4BL на 120-му пасажі

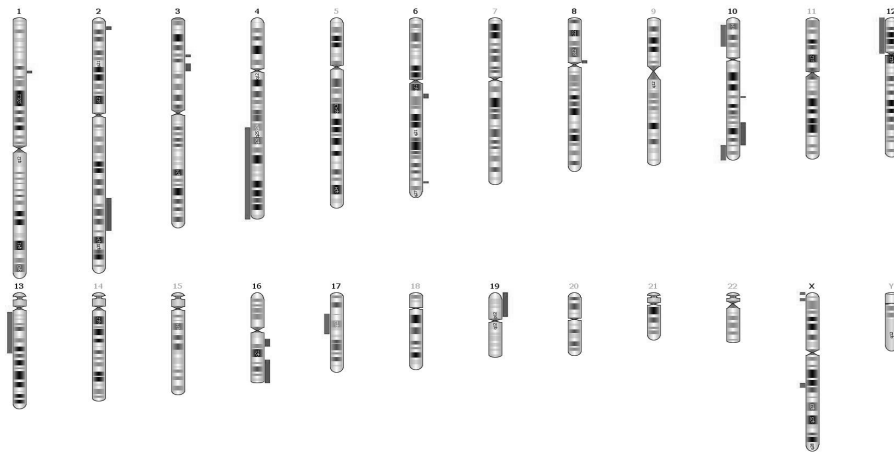


Рис. 3. Ідіограма профайлу array CGH клітин лінії 4BL на 160-му пасажі

ціями, з точки зору генетичної стабільності «гра» з подвоєнням генетичного матеріалу є більш безпечною, ніж його делеції.

Варто відзначити, що більшість виявлених хромосомних аномалій на всіх досліджуваних пасажах є мозаїчними, що свідчить про існування в популяції лінії 4BL гетерогенних клонів клітин. Оскільки ДНК-аналіз передбачає дослідження сумарної фракції ДНК, отриманої з культивованих клітин, а не генетичного матеріалу окремих клітин, то явище культурального мозаїцизму має бути враховане при інтерпретації даних. Однак можливості порівняльної геномної гібридизації не дозволяють провести абсолютну оцінку величини цього явища. Підтверджено, що аберації, які виявляються на 160-му пасажі *de novo*, зникають в подальшому. Ймовірно, це мутантні клони клітин, які не дають переваг при культивуванні і тому елімінуються до 205-го пасажу.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що основні перебудови генетичного матеріалу відбулися до 120-го пасажу, що свідчить про те, що клітинна лінія 4BL пройшла етап становлення до цього часу та досягнула стабілізованого генетичного стану. Проте це не значить, що еволюція каріотипу зупинилася: зміни відбуваються і далі, але вони не настільки значні. Так, на 205-му пасажі з'являються нові аберації, не притаманні для попередніх етапів трансформації клітинної лінії 4BL, а саме: дуплікації окремих ділянок 1, 4, 17 хромосом та делеції по 8, 9 та 19 хромосомах (розмір найбільшої трохи перевищує 4 Mb). Спостерігали цікаву ситуацію по 2 хромосоми: в усіх трьох проаналізованих пасажах виявили найбільшу з дуплікацій — 2q31.1-q33.1; а на 120-му та 205-му пасажах де-

текували *dup2p21*, яка не визначалася на 160-му пасажі. Ми припускаємо, що у такий спосіб відбирається оптимальна комбінація генів, локалізованих у даній хромосомі: залишається значна дуплікація та відбувається селекція більш малих. Також це може бути свідченням складних еволюційних процесів, що відбулися в другій хромосомі, внаслідок чого частина набутого генетичного матеріалу опинилася у складі деривату, а решта, вірогідно, увійшла до складу інших маркерних хромосом. Ознаками стадії стабільності клітинної лінії 4BL безумовно можна вважати перебудови, які спостерігалися від 120-го і до 205-го пасажу, а саме: дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції 4, 10, 12, 13, 17 і X.

У ділянці дуплікації 2q31.1-q33.1 міститься багато генів, пов'язаних із структурно-функціональною організацією хроматину та перебігом мітозу, а це дозволяє оптимізувати клітинний поділ. У цій ділянці розташовані ключові гени апоптозу (CASP8, CASP10) для елімінації мутантних клонів та ген білка SDPR, що допомагає клітинам вижити при зниженій концентрації сироватки в середовищі. У ділянці делеції 4q24-q35.2 містяться гени апоптозу CASP3 і CASP6, ген цикліну A2 та CENPU50, які створюють платформу для асоціації кінетохорів під час мітозу. Інший ген, локалізований в даній ділянці, — MAD2L1 — запобігає початку анафази до моменту фіксації на веретені всіх хромосом набору. Подібну функцію виконує ген BUB3 (міститься в ділянці *del 10q26.11qter*), а оскільки обидва гени локалізовані в ділянках делецій, це може бути причиною абераційного перебігу мітозу у клітинах 4BL.

Аналізуючи зміни 10 хромосоми, можна очікувати зниження експресії супресора RSU1

та генів репарації DCLRE1C і MGMT. При цьому у подвійних копіях присутні гени апоптозу AIFM2 і CASP7, ген цикліну M1, онкоген WNT8B та онкосупресор MXI1, який негативно регулює експресію MYC. У зв'язку з делецією 12p13.33-p11.1 в одиничній копії присутні численні онкогени та онкосупресори, фактори плюрипотентності DPPA3 і NANOG із типовою експресією в ембріональних СК і пухлинах, а також ген цикліну D2. Хромосома X не втратила разом із делеціями життєво важливі гени. X моносомія виявилася типовою ознакою клітинної лінії 4BL на 205-му пасажі і, за даними arrayCGH, мала місце у понад 80% досліджених клітин (mos 45, X [$>80\%$] / 46, XX [$<20\%$]). Не виключено, що з втратою X хромосоми клітинна лінія позбавляється «зайвого» генетичного матеріалу [11].

У ділянці делеції 13 q12.11-q 21.2 містяться три онкогени та десять генів-онкосупресорів, з них: LATS2 для формування веретена поділу; RGC, що індукується p53 у відповідь на пошкодження ДНК, та відомі онкосупресори BRCA2 і RB1. Отже, без сумніву, саме делеція по 13-й хромосомі є ключовою в порушенні генетичної стабільності. Дуплікації 16 хромосоми в ділянках q12.1q12.2 і q22.1-q24.3 є, навпаки, корисними для підтримки генетичної стабільності. Тут містяться гени, експресія яких змінюється у відповідь на гіпоксію (SIAN1) та оксидативний стрес (OSGIN1) та які є індукторами апоптозу. Підвищена копійність гена ACD, що захищає теломери, NKD1 – негативного регулятора Wnt і β -катенінового сигнального шляху та IL17C, що стимулює вивільнення фактора некрозу пухлин α і IL1 β . Делецію за 17 хромосомою можна назвати умовно нейтральною, оскільки делетовано приблизно рівну кількість онкогенів та онкосупресорів. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12, незважаючи на малий розмір хромосоми, розташована величезна кількість генів: відомий онкоген JUND та онкосупресори APC2 і GADD45B, ген апоптозу CASP14. Тут локалізовано велику кількість генів, що відповідають за правильну організацію й функціонування веретена поділу: MISP, SYCE2, HAUS8, MAU2, MAST1; мітоген-активуючі кінрази MAP2K2 і 7 та активатор цитокінезу DOCK6. У ділянці дуплікації 19 p13.3-p12 міститься ген встановлення і регуляції тканиноспецифічного метилування цитозинових залишків DNMT1. Збільшено дозу генів, пов'язаних з внутрішньоклітинним метаболізмом: гени регуляції екзо-

ендоцитозних шляхів, гени білків родини цитохромів P450 та дихального ланцюга, ген найбільшої субодиниці РНК-полімерази II POLR2E, ген ініціації трансляції EIF3G та ген PIN1, що відповідає за правильне згортання білків. Очевидним є те, що дуплікація по 19 хромосомі є «робочим коником»: вона забезпечує клітинний метаболізм на високому рівні, тут міститься значна кількість генів організації структури хроматину, процесів транскрипції, активації проліферації, що надає селективну перевагу клітинам, які її містять. До речі, саме по dup19 p13.3-p12 спостерігається тетрасомія, більшість інших виявлених дуплікацій є частковими, неповними.

Клітинна лінія 4BL адаптувалася до виживання в умовах *in vitro* тривалий час з притаманними їй перебудовами, і дія стабілізуючого добору в стандартних умовах культивування спрямована на їх підтримання. При зміні умов середовища на клітини діятиме рушійний добір і виживатимуть ті клони клітин, що виявляються найбільш адаптованими до нових умов існування. Таке явище було виразно продемонстровано нами у роботі [12], де на етапі стабілізації під впливом стрес-чинника (культивування протягом доби в середовищі з високою йонною силою) повторно індукується перехід клітинної популяції в стан структурної нестабільності, характерний для етапу становлення.

Висновки

Основні перебудови генетичного матеріалу клітинної лінії 4BL відбулися до 120-го пасажу, що засвідчує її перебування на стадії стабілізації на момент 120-го, 160-го і 205-го пасажів. Більшість виявлених аберацій є мозаїчними, що підтверджує існування гетерогенних клонів у популяції клітинної лінії 4BL. Ознаками стабільності клітинної лінії 4 BL можна вважати значні перебудови, що зберігаються у клітинах від 120-го до 205-го пасажу (дуплікації хромосом 2, 10, 16 і 19 та делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17 і X), тоді як незначні за розміром нові аберації елімінуються на наступному дослідженому пасажі. Селективна перевага збережених хромосомних перебудов асоціюється з підвищенням дози генів мітотичних сигнальних каскадів (dup19p13.3-p12) на фоні зниження копійності супресорів пухлинного росту (del 13q12.11-q21.2). Результативна здатність клітин до підвищення проліферативного потенціалу супроводжується збільшенням

дози генів-індукторів апоптозу (dup2q31.1-q33.1, dup16q12.1q12.2, dup16q22.1-q24.3). Все це відображає еволюцію каріотипу клітинної лінії 4 BL

протягом тривалого культивування та засвідчує ефект регулярних хромосомних перебудов при досягненні етапу стабілізації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Stryjewska A., Kiepara K., Librowski T., Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins // *Pharmacol. Rep.*— 2013.— 65, N 5.— P. 1075–1085.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.— К.: Логос, 2005.— 730 с.
3. Nam H., Lee K. H., Nam D. H., Joo K. M. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect // *World. J. Stem Cells.*— 2015.— 7, N 1.— P. 126–136.
4. Jackman C. P., Shadrin I. Y., Carlson A. L., Bursac N. Human Cardiac Tissue Engineering: From Pluripotent Stem Cells to Heart Repair // *Curr. Opin. Chem. Eng.*— 2015.— 7.— P. 57–64.
5. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.*— 2006.— 126, N 4.— P. 663–676.
6. Hayes M., Zavazava N. Strategies to generate induced pluripotent stem cells // *Methods Mol. Biol.*— 2013.— 1029.— P. 77–92.
7. Лукаш Л. Л., Яцишина А. П., Кушнірук В. О., Підпала О. В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.]*.— К.: Логос, 2011.— 11.— С. 493–498.
8. Кушнірук В. О., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л. Морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4BL // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.]*.— К.: Логос, 2013.— 13.— С. 315–319.
9. Кушнірук В. О., Кочубей Т. П., Мачевич Л. Л., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL при тривалому культивуванні *in vitro* // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.]*.— К.: Логос, 2012.— 3.— С. 313–318.
10. Акопян Г. Р., Гулеюк Н. Л., Кушнірук В. О., Микитенко Д. М., Яцишина А. П., Лукаш Л. Л. Порівняльний аналіз каріотипу нової лінії клітин людини 4BL в умовах тривалого культивування. I. Плоідність хромосомного набору // *Цитологія і генетика.*— 2013.— 47, № 5.— С. 55–69.
11. Mamaeva S. E. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept // *Int. Rev. Cytol.*— 1998.— 178.— P. 1–40.
12. Macewicz L. L., Kushniruk V. O., Iatsyshyna A. P., Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Akopyan G. R., Huleuk N. L., Mykytenko D. M., Lukash L. L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O6-methyluanin DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell lines in vitro // *Biopolymers and cell.*— 2013.— 29, N 6.— P. 485–492.

KUSHNIRUK V.O.¹, AKOPYAN H.R.², MYKYTENKO D.O.³, HULEYUK N.L.², ZUKIN V.D.³, LUKASH L.L.¹

¹ *Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net*

² *Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenka str., 31a, e-mail: akopyan.h@ihp.lviv.ua*

³ *Clinic of reproductive medicine «Nadiya», Ukraine, 03037, Kyiv, M. Krivonosy str., 19A*

THE DYNAMIC OF KARYOTYPE ULTRASTRUCTURAL ABERRATIONS OF NEW HUMAN STEM CELL LINE 4BL REVEALED BY ARRAY CGH

The **aim** of this research was to conduct the comparative analysis of the karyotype of new human stem cell line 4BL at different stages of cultivation *in vitro*. **Methods.** The array CGH Oxford Gene Technology was used. **Results.** At the 120, 160 and 205 passages such the same aberrations were revealed: duplications of 2q31.1-q33.1, 10 q22.1-q22.2 and q24.2-q26.11, 16 q12.1-q12.2 and q22.1-q24.3, 19 p13.3-p12 and deletions of 4 q24-q35.2, 10 p14-p12.1 and q26.11-q26.3, 12 p13.33-p11.1, 13 q12.11-q21.2, 17 q11.1-q21.31, X p22.33 and q21.31-q21.32. Also at each passage some minor aberrations appears, which further were removed at the next stage, and so on. **Conclusions.** Obviously main genome rearrangements occurred until 120th passage, so stem cell line 4BL passed the establishment stage until this time and now is at the stabilization stage.

Keywords: stem cell line, array CGH, karyotypic evolution, deletion/duplication.