

УДК 575/22

ИЗМЕНЕНИЯ КАРИОТИПА УСТОЙЧИВЫХ К АПОПТОЗУ КЛЕТОК КРЫСЫ ЛИНИИ HindIII^G ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2020 г. Н. М. Ярцева¹, *, Ж. В. Шитикова², Т. В. Быкова¹, С. Г. Зубова¹, Е. Ю. Кочеткова¹, В. А. Поспелов¹, Т. В. Поспелова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Женевский университет, Женева, 1205 Швейцария

*E-mail: ya.ya-natm27951@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.08.2020 г.

После доработки 12.09.2020 г.

Принята к публикации 14.09.2020 г.

Нестабильность генома, выражающаяся во множественных перестройках, способствует приобретению опухолевыми клетками новых свойств, в том числе, устойчивости к терапии. Структурные перестройки хромосом могут происходить при повреждении ДНК, например, ионизирующим облучением. В работе исследованы изменения кариотипа псевдодиплоидной линии HindIII^G-1, полученной в результате облучения устойчивых к апоптозу трансформированных клеток крысы HindIII^G. Линия HindIII^G-1 возникла в результате полиплоидизации, связанной с нарушением блока клеточного цикла на границе фаз G₂/M, и последующей деплоидизации. Исходная линия HindIII^G до облучения была представлена в основном псевдодиплоидной популяцией с нормальным числом хромосом 42 и тетраплоидной фракцией, составляющей 14%. Кариотип клеток включал две численные и одну специфическую структурную перестройку хромосомы (СПХ) – der(14). Облучение вызывает формирование полиплоидов и множественную фрагментацию хромосом. В процессе культивирования стала преобладать псевдодиплоидная популяция клеток с кариотипом, подобным кариотипу необлученных клеток, но с увеличенным числом клональных и неклональных СПХ. На поздних пассажах кариотип клеток HindIII^G-1 вновь становится идентичным кариотипу клеток до облучения и не содержит новых клональных СПХ. Обсуждается роль неклональных и клональных СПХ в процессе выживания облученных клеток и образования новых клеточных популяций.

Ключевые слова: хромосомные перестройки, фрагментация хромосом, полиплоидизация, деплоидизация

DOI: 10.31857/S004137712012007X

Хромосомная нестабильность является одной из ключевых характеристик опухолевых клеточных линий. Популяция опухолевых клеток гетерогенна по клональными и неклональными численным и структурным перестройкам хромосом (СПХ). Неклональные СПХ способствуют адаптации клеток к изменяющейся окружающей среде, в то время как клональные СПХ приводят к измененной экспрессии множества генов, включая онкогены и опухолевые супрессоры (Mitelman et al, 2007; Ohgaki, Kleihues, 2009).

На хромосомную нестабильность влияют повреждающие ДНК агенты, в том числе ионизирующее излучение, вызывая одно- и двухцепочечные разрывы ДНК (ДР-ДНК). Нарушение репликации ДНК или прохождение через митоз после коллапса вилки

репликации также могут приводить к ДР-ДНК, которые способствуют появлению СПХ (Jeggio and Löbrich, 2006; Kakarougkas et al., 2014).

В полиплоидных опухолевых клетках после облучения или в результате противоопухолевой терапии часто наблюдается фрагментация хромосом, которая приводит к изменению профиля экспрессии многих генов (Crasta et al., 2012; Zhang et al., 2015; Ly, Cleveland, 2017; Pellestor, 2019; Ye et al., 2019). В частности, мутации опухолевого супрессора p53 (TP53) приводят к изменениям или потере его функций, связанных с изменением жизнеспособности клеток (Mardin et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Ранее нами было показано, что устойчивые к апоптозу эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные районом HindIII^G аденовируса 5 типа человека, преодолевали процесс клеточной гибели за счет специфических механизмов (Chitikova et al., 2014). Облучение клеток HindIII^G привело к

Принятые сокращения: АРГ – амплификация рибосомных генов; ДР-ДНК – двухцепочечные разрывы ДНК; СПХ – структурные перестройки хромосом; ЧХ – число хромосом.

образованию гигантских клеток большой плоидности из-за репликации ДНК при сохранении блока G₂/M клеточного цикла. Выживание облученной популяции в конечном итоге обеспечивалось клетками HindIII^G-1 с размером и содержанием ДНК, близким к необработанным клеткам HindIII^G (Chitikova et al., 2014).

В настоящей работе проанализирована динамика хромосомных перестроек в клетках HindIII^G-1, возникающих после облучения и приводящих в процессе длительного культивирования к возвращению псевдодиплоидных пролиферирующих клеток, которые обеспечивают жизнеспособность клеточной популяции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии. Линия HindIII^G получена из эмбриональных фибробластов крысы с помощью ко-трансфекции раннего района HindIII^G аденовируса 5 типа человека (E1A+E1B 19 кДа) плазмидой pSV2neo, несущей ген устойчивости к генетицину. Клетки HindIII^G культивировали в среде Дальбекко в модификации Игла, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 0.1 мг/мл гентамицина при 37°C, в присутствии 5% CO₂.

Облучение. Клетки HindIII^G подвергали рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр на аппарате Axiom Iconos R200 (Siemens, Германия). В течение 27 сут после облучения клетки HindIII^G не пересеивали, а культивировали до появления монослоя. Выжившие после рентгеновского облучения клетки HindIII^G после начала пересева получили название HindIII^G-1. Клетки HindIII^G-2 были получены после вторичного облучения клеток HindIII^G-1 в той же дозе.

Кариотипический анализ. Для получения метафазных пластинок в культуральную среду вводили колхицин в конечной концентрации 0.06 мкг/мл на 1–1.5 ч. Далее проводили гипотоническую обработку 0.55%-ным раствором KCl (ICN Biomedical Inc., США) при 37°C в течение 12–15 мин, затем клетки фиксировали смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) по 15 мин с двукратной сменой фиксатора. Суспензию фиксированных клеток наносили на предметные стекла над водяной баней при 52–55°C до полного высыхания. Для идентификации хромосом препараты окрашивали с помощью метода окрашивания хромосом на G-диски (GTG-метод) (Ozkinay et al., 1979). Кариотип новой линии HindIII^G-1, полученной из выживших после облучения клеток, исследовали на пассажах 8, 17, 22 и 34.

Для выявления районов метафазных хромосом, несущих рибосомные гены, использовали окрашивание 50%-ным азотнокислым серебром (AgNO₃; Sigma, США) (Howell, Black, 1980). Далее препараты обрабатывали 2%-ным раствором желатина в течение 8–10 мин при 56°C, отмывали в воде и обезжировали этиловым спиртом. Окрашивание проводили

стандартным методом с помощью красителя Гимза. Идентифицировали хромосомы согласно идиограммам хромосом крысы *Rattus norvegicus* на 300 дисков (bands) (Satoh et al., 1989). Описывали кариотип в соответствии с Интернациональной номенклатурой цитогенетики человека (Shaffer et al., 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотип трансформированных клеток линии HindIII^G. Анализ кариотипа клеток линии HindIII^G до облучения показал, что это в основном псевдодиплоидная и гетерогенная по составу клеточная популяция. Доля митотических полиплоидных клеток в популяции HindIII^G до облучения составляла 14%, из которых 2% имели плоидность более 4*n*.

Число хромосом (ЧХ) варьирует от 40 до 44, модальный класс с ЧХ равным 42, наблюдали только в 38% клеток. Во всех исследованных клетках линии HindIII^G выявлена одна СПХ, вероятно, дупликация района q21-q22.1 длинного плеча хромосомы 14 с делецией теломерного района q22-qter. Только две клетки имели кариотип 42,XX,der(14)dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20 с моносомией хромосомы 15, трисомией хромосомы 20 и перестройкой хромосомы 14 (рис. 1). В остальных клетках, кроме этих постоянных клональных перестроек хромосом, наблюдали другие клональные и неклональные СПХ, или изменение ЧХ. В клетках с ЧХ 43 обнаружены два гомолога хромосомы 15. В 10% клеток с ЧХ 41 наблюдали хромосому 3 с увеличенным локусом p12 короткого плеча и с амплификацией рибосомных генов (АРГ) (рис. 2а–в). Кроме того, эти клетки имели перестроенную хромосому 16 der(16)t(8;16)(q13;p12) и в них отсутствовал третий нормальный гомолог хромосомы 20.

Анализ кариотипа клеток HindIII^G после облучения проводили на 1-, 4- и 27-е сут (до первого пассажа стабильной линии). Через 1 сут после облучения митотические клетки с плоидностью больше 4*n* не выявлялись (табл. 1), а доля тетраплоидных клеток составляла 17.7%. На 4-е сут после облучения почти все клетки становились полиплоидными с плоидностью больше 4*n*.

Через 1 и 4 сут после облучения наблюдали фрагментацию ядер гигантских полиплоидных клеток и скопление вокруг них микроядер (рис. 3), а также метафазные пластинки с хромосомами, имеющими одно- и двуххроматидные разрывы (рис. 4). Кроме того, в 9.3% клеток через 4 сут после облучения обнаружены метафазы большой плоидности, в которых одновременно с целыми метафазными хромосомами содержались множественные хромосомные фрагменты (рис. 5). На поздних сроках культивирования число таких метафазных пластинок снижалось. Следует обратить внимание на уменьшение числа метафаз с фрагментацией хромосом, которое совпадает по времени с уменьшением числа метафаз с плоидностью больше 4*n*. На более поздних сроках после облучения наблюдали тетраплоидные и псевдодиплоидные мета-

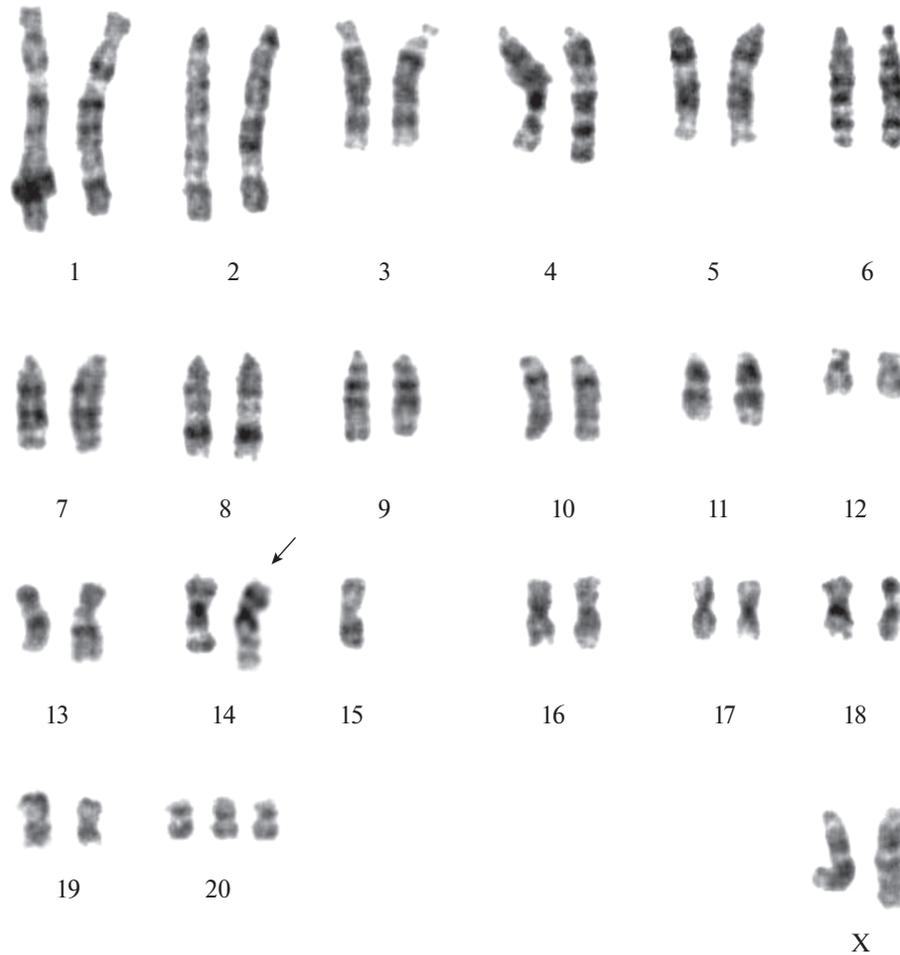


Рис. 1. Кариотип клетки линии HindIIIIG до облучения с модальным числом хромосом без дополнительных численных и структурных перестроек хромосом (СПХ). Окрашивание на G-диски; *стрелка* указывает на постоянную структурную перестройку хромосомы 14: 42,XX,der(14)?dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20.

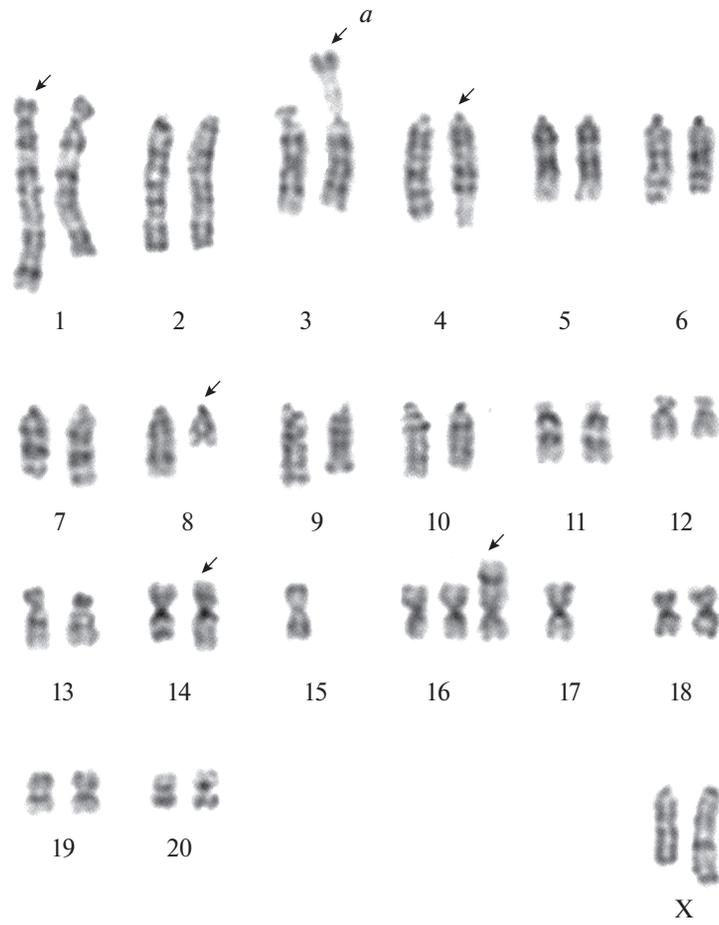
фазные пластинки с фрагментацией одной или нескольких хромосом одновременно (рис. 6).

Анализ кариотипа клеток HindIIIIG на 27-е сут после облучения выявил только 2% тетраплоидных митотических клеток. Однако одновременно увеличивалась гетерогенность клеточной популяции по сравнению с линией HindIIIIG до облучения за счет увеличения доли клеток с ЧХ 4n и увеличения числа неклональных СПХ (табл. 1, 2), которые обнаружены в 12 клетках из 13 исследованных (92%). Число хромосом, вовлеченных в неклональные СПХ в кариотипе клеток, увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с необлученными клетками. Изменения

затрагивают разные хромосомы, но чаще хромосомы 6 и 17 (рис. 7). Перестроенная хромосома 14 выявлена во всех исследованных клетках линии HindIIIIG до и после облучения, моносомию хромосомы 15 наблюдали так же, как и до облучения в 9 из 13 исследованных клеток. Хромосома 3 с амплификацией в локусе p12 не обнаружена (табл. 2).

Кариотип клеток линии HindIIIIG-1. Кариотип новой линии HindIIIIG-1, полученной из выживших после облучения клеток, исследовали на пассажах 8, 17, 22 и 34. Доля тетраплоидных клеток в процессе пассирования уменьшалась по сравнению с необлученными клетками HindIIIIG, а на поздних пассажах

Рис. 2. Амплификация рибосомных генов в коротком плече хромосомы 3 в клетках линии HindIIIIG до и после облучения. *а* – Кариотип клетки линии HindIIIIG до облучения с АРГ в локусе p12 хромосомы 3, а также другими клональными и неклональными численными и структурными перестройками хромосом 41,XX,der(1)t(1;8)(q43;11.2)der(3)amp(3)(p12)t(3;?20)(p13;?q11),add(4)(q42),+der(8)t(8?;17)(q?11.2;p12),der(14)?dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,der(16)t(8;16)(q13;p12),+16-17; *стрелки* указывают на перестроенные хромосомы. *б* – Структурные изменения хромосомы 3 из трех разных клеток HindIIIIG-1 после облучения на 17-м пассаже; *левый гомолог* – нормальный гомолог хромосомы 3, *правый* – с АРГ в локусе p12. *в* – АРГ в локусе p12 хромосомы 3, *стрелки* указывают на хромосомы 11, 12 и 3 с функционально активными АРГ. *а, б* – окрашивание на G-диски, *в* – окрашивание AgNO₃.



б



в

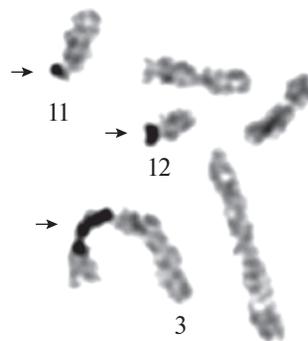


Таблица 1. Распределение хромосом по числу в клетках линий HindIII-G до и после облучения

Линия	Число хромосом									
	38	39	40	41	42	43	44	45	4n ($\geq 4n$), %	
HindIII-G до облучения	–	–	3	11	38	17	6	–	14 (2)	
HindIII-G, 1 сут ПО	–	Не исследовано								17.7 (0)
HindIII-G, 4 сут ПО	–	Нет диплоидных митозов								$\geq 4n$ (100)
HindIII-G, 13 сут ПО	–	Не исследовано								10.8 (4.4)
HindIII-G через 27 сут ПО	–	–	6	24	30	23	7	–	2 (0)	
HindIII-G-1 (пассаж 8)	4	2	5	52	25	1	3	1	Не исследовано	
HindIII-G-1 (пассаж 17)	–	2	3	35	44	8	2	1	6.7 (0.3)	
HindIII-G-1 (пассаж 22)	–	1	–	17	66	11	–	2	5.6 (0.6)	
HindIII-G-1 (пассаж 34)	–	3	2	17	47	15	4	1	9.7 (0.2)	
HindIII-G-2 (пассаж 12)	–	1	6	26	50	12	1	1	6.3 (0.5)	

Примечание. ПО – после облучения.

клетки с плоидностью больше $4n$ составляли менее 1% (табл. 1). Почти вся популяция клеток HindIII-G-1 стала псевдодиплоидной.

Анализ клеток линии HindIII-G-1 на 17-м пассаже показал дальнейшее увеличение гетерогенности клеточной популяции HindIII-G-1 по сравнению с популяцией клеток HindIII-G через 27 сут после облучения. Модальный класс клеток по числу хромосом не был выражен, преобладали два типа клеток с ЧХ 41 и 42 (табл. 1). В 18 клетках из 20 (90%) наблюдали перестройки хромосом: клональные или неклональные, численные или структурные. Моносомия хромосомы 15 была обнаружена уже во всех клетках. Число новых неклональных СПХ увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с кариотипом клеток HindIII-G на 27-е сут после облучения (табл. 2). Клеток с АРГ в коротком плече хромосомы 3 было в 3 раза

больше, чем до облучения в клетках HindIII-G. Кроме того, в кариотипе HindIII-G-1 в 17.5% клеток популяции обнаружена новая СПХ, дериват хромосомы 5 – $der(5)t(1;5;8)(q22;q34;q36;q22)$, в состав которого входят хромосомы 1 и 8. В этих клетках кроме $der(5)$ выявлены еще несколько других хромосом с измененной структурой (рис. 8a).

На 22-м пассаже культивирования клетки HindIII-G-1 имели самый стабильный кариотип с четко выраженным модальным классом, составляющим 66% популяции, представленный клетками с числом хромосом равным 42. Кариотип $42,XX,der(14)dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20$ без неклональных СПХ наблюдали в 13 клетках из 17 исследованных (76.5% клеток), и только в 4-х клетках, кроме $der(14)$, обнаружены новые неклональные СПХ. Клональные перестройки хромосом 3 и 5 выявлены только в 1%

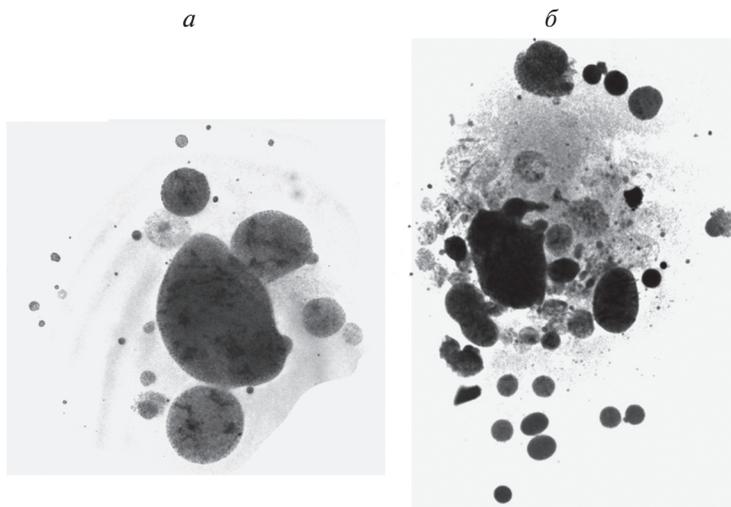


Рис. 3. Фрагментация гигантского полиплоидного ядра с образованием многочисленных микроядер (а, б) на 4 сут после облучения в клетках HindIII-G.

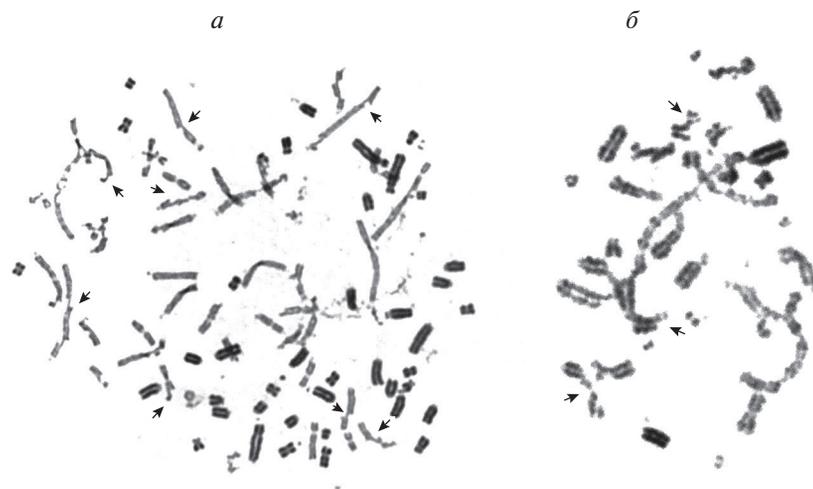


Рис. 4. Метафазная пластинка клеток HindIIIГ с множественными однохроматидными (а) и двуххроматидными (б) разрывами хромосом (стрелки) с неполной конденсацией хроматина через 4 сут после облучения.

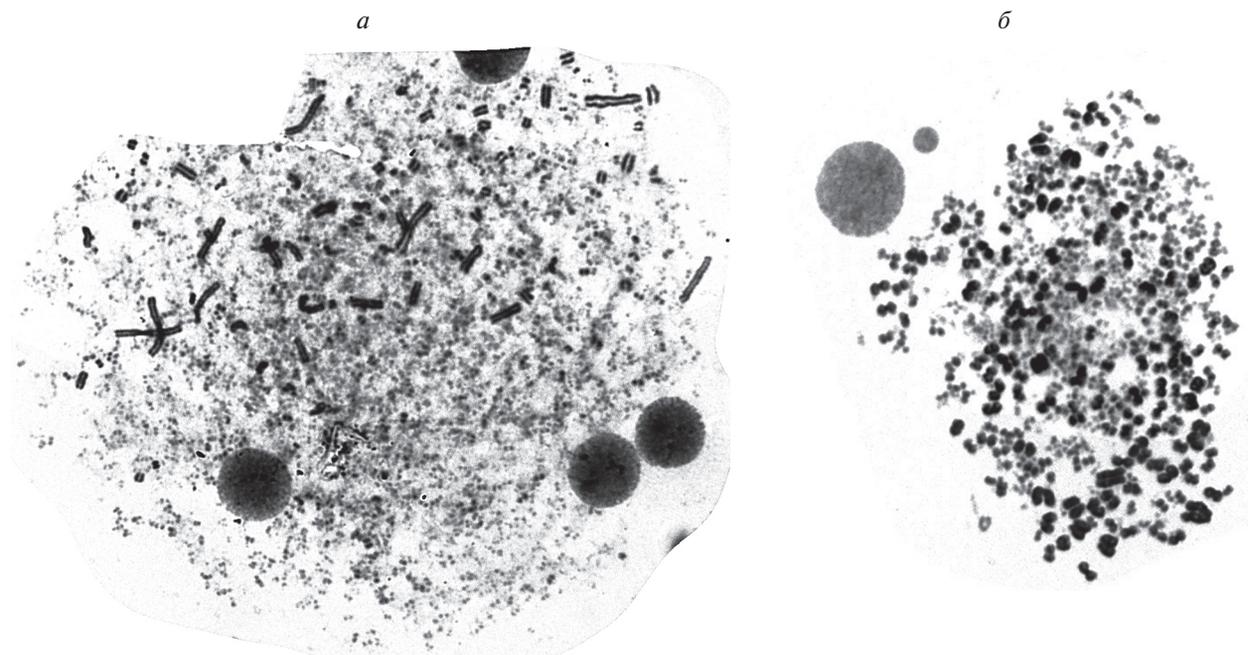


Рис. 5. Полиплоидные метафазы в клетках HindIIIГ с выраженной фрагментацией хромосом и наблюдаемыми одновременно целыми метафазными хромосомами на 4-м пассаже после облучения. а – Сильно выраженная фрагментация; б – фрагментация, выраженная в меньшей степени, с лежащим рядом микроядром.

клеток (табл. 2). Каритипический анализ клеток HindIIIГ-1 на 34 пассаже показал некоторое увеличение нестабильности каритипа: доля тетраплоидных клеток стала больше, как и число клеток с неклональными СПХ, новых клональных СПХ также не наблюдали. Тем не менее, модальный класс клеток с ЧХ 42 был выражен четко (табл. 1 и 2).

Перестройку хромосомы 14 в клетках HindIIIГ-1 выявляли на всех сроках наблюдения после облучения (как и в исходных клетках HindIIIГ), которая

представляет собой постоянную специфическую структурную перестройку в этих линиях. Постоянными для клеток линии HindIIIГ-1 также являлись моносомия хромосомы 15, обнаруженная во всех клетках после облучения, в отличие от необлученных клеток HindIIIГ, и трисомия хромосомы 20.

Все хромосомы каритипа подвергались структурным клональным или неклональным изменениям. Чаше других это были хромосомы X, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 (6 и больше точек разрывов на хромосому), а

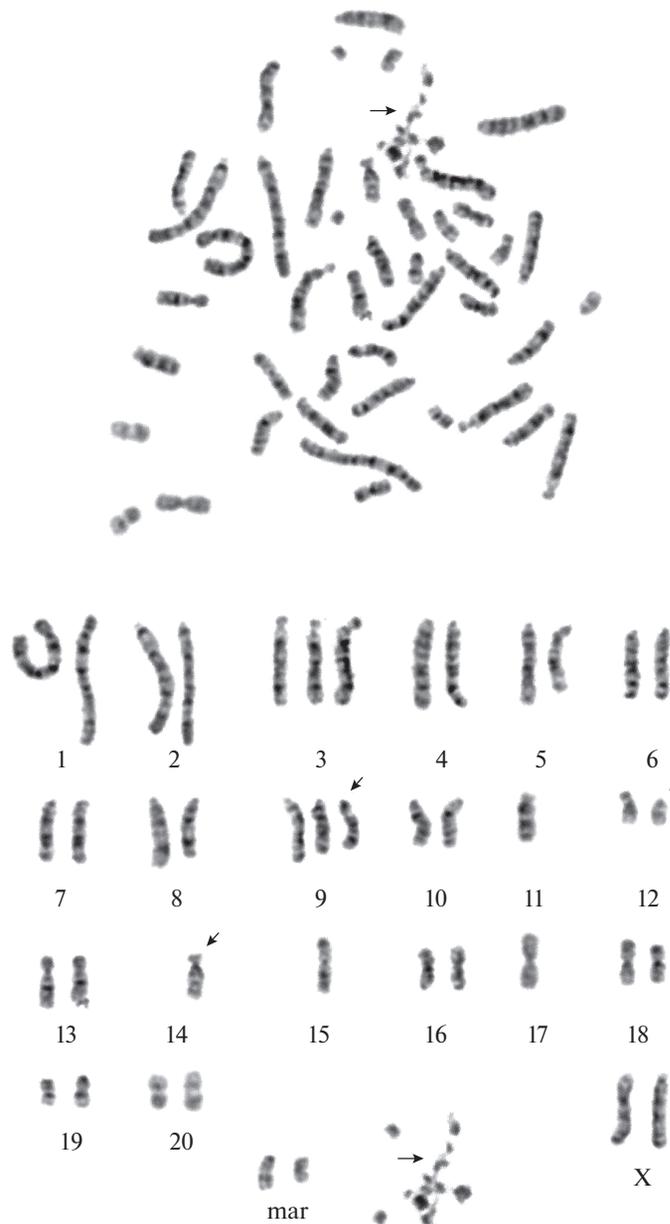


Рис. 6. Метафазная пластинка и кариотип клетки линии HindIII-G-1 с фрагментацией нескольких хромосом. Пассажи 22; mar – маркерная хромосома; стрелки указывают на перестроенные хромосомы и фрагментацию хромосом.

разрывы хромосом происходили чаще в локусах 1q32, 1q34, 4q42, 5q36, 11q22 и 20p12 (5 и больше разрывов на локус) (рис. 7).

Таким образом, анализ кариотипа псевдодиплоидной линии клеток HindIII-G-1 (полученной при длительном культивировании клеток HindIII-G после облучения) показал, что клетки на поздних пассажах имеют четко выраженный модальный кариотип с ЧХ равным 42, а доля полиплоидных клеток уменьшилась больше чем в 2 раза по сравнению с необлученными клетками HindIII-G. Несмотря на множественные СПХ, наблюдавшиеся после облучения на 17-м пассаже, новые клональные численные и

СПХ в кариотипе клеток линии HindIII-G-1 на последующих пассажах не обнаружены. Число неклональных СПХ на 22-м пассаже после облучения стало равным их числу до облучения в линии Hind III-G.

На 22 и 34-м пассажах обнаружены клетки, в которых наряду с нормально конденсированными метафазными хромосомами наблюдали профазные недоконденсированные хромосомы (рис. 9). Это происходит, вероятно, в двуядерных клетках, ядра которых не синхронно входят в митоз, и в запаздывающем ядре происходит преждевременная конденсация хроматина.

Таблица 2. Структурные перестройки хромосом в клетках линий HindIIIГ до и после облучения

Линия	Число клеток без новых СПХ	Число клеток с амплификацией хромосомы 3, %	Число клеток с der(5)	Число клональных перестроек хромосом $\leq 10\%$	Число неклональных СПХ	Суммарное число точек разрывов хромосом
HindIIIГ до облучения	2 из 15	10	Нет	1	6	14
HindIIIГ 27-й день ПО	1 из 12	Нет	Нет	3	14	24
HindIIIГ-1 (пассаж 8)	2 из 27	60	Нет	2	14	25
HindIIIГ-1 (пассаж 17)	2 из 20	32.6	17.5	6	34	74
HindIIIГ-1 (пассаж 22)	13 из 17	1	1	Нет	6	18
HindIIIГ-1 (пассаж 34)	5 из 20	Нет	1	Нет	14	25
HindIIIГ-2 (пассаж 12)	4 из 20	32	15.4	3	18	35

Повторное облучение клеток HindIIIГ-1 (клетки HindIIIГ-2). Для понимания закономерностей становления диплоидности в устойчивых к апоптозу клетках HindIIIГ и выявления особенностей изменений кариотипа после облучения было проведено повторное облучение клеток линии HindIIIГ-1 на 8-м пассаже. Линию, полученную из выживших клеток HindIIIГ-1 после повторного облучения, назвали HindIIIГ-2. В этих клетках тоже обнаружены метафазные пластинки (0.6%) с увеличенной плоидностью и наличием фрагментированных хромосом одновременно с целыми метафазными хромосомами. Анализ кариотипа клеток HindIIIГ-1 на 8-м пассаже до облучения показал четкий модальный класс с ЧХ 41 (52% клеток), тогда как клетки с ЧХ 42 составляли всего 25%. После повторного облучения анализ кариотипа клеток HindIIIГ-2 был проведен на 12-м пассаже. Выявлен четкий модальный класс с ЧХ 42 и две субпопуляции клеток с ЧХ 41 и 43 (табл. 1). Кариотип 42,XX,der(14)dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20 без новых СПХ в клетках HindIIIГ-2 обнаружен только в 4-х клетках, а на 8-м пассаже в клетках HindIIIГ-1 – в 2-х. Другие исследованные клетки HindIIIГ-2, наряду с der(14), имели новые клональные и неклональные СПХ. Два клона, составляющие больше 10% популяции, имели те же самые СПХ, что и клетки HindIIIГ-1 на пассаже 17. Первый клон имел АРГ в локусе p12 хромосомы 3 и транслокацию t(8;16)(8q13;16p12) (рис. 2а). Кариотип клеток второго клона содержал der(5)t(1;5;8)(q22q?34;q36;q22), der(7) и der(8) (рис. 8б). Количество клеток с этими перестройками по сравнению с однократно облученными клетками HindIIIГ-1 на 17-м пассаже от-

личалось незначительно (табл. 2). Общее число неклональных СПХ и точек разрывов хромосом в клетках линии HindIIIГ-2 меньше, чем в клетках HindIIIГ-1 на пассаже 17 после первого облучения.

Таким образом, показано, что рентгеновское облучение клеток HindIIIГ в дозе 6 Гр приводит к полиплоидизации популяции и перестройке всего генома: фрагментации гигантских полиплоидных ядер, образованию множества микроядер, фрагментации хромосом в полиплоидных клетках. Становление новой популяции псевдодиплоидных клеток сопровождается появлением большого числа неклональных СПХ и появлением заново СПХ der(5) и der(7), а также увеличением количества клеток с СПХ amp(3) и der(8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами показано, что в клетках HindIIIГ нарушена сверхочная точка на границе фаз G₂/М клеточного цикла, в результате чего происходит непрекращающаяся репликация ДНК, и в отсутствие цитотомии количество ДНК в клетках достигает 110 С и более (Chitikova et al., 2014). Через 4 сут после облучения клеток HindIIIГ обнаружены метафазные пластинки очень большой плоидности с множественными хромосомными фрагментами и одновременно наблюдались неповрежденные метафазные хромосомы. Фрагментация хромосом приводит к геномному хаосу в клетках и кариотипической гетерогенности. Из всех вариантов клеток селективно от-

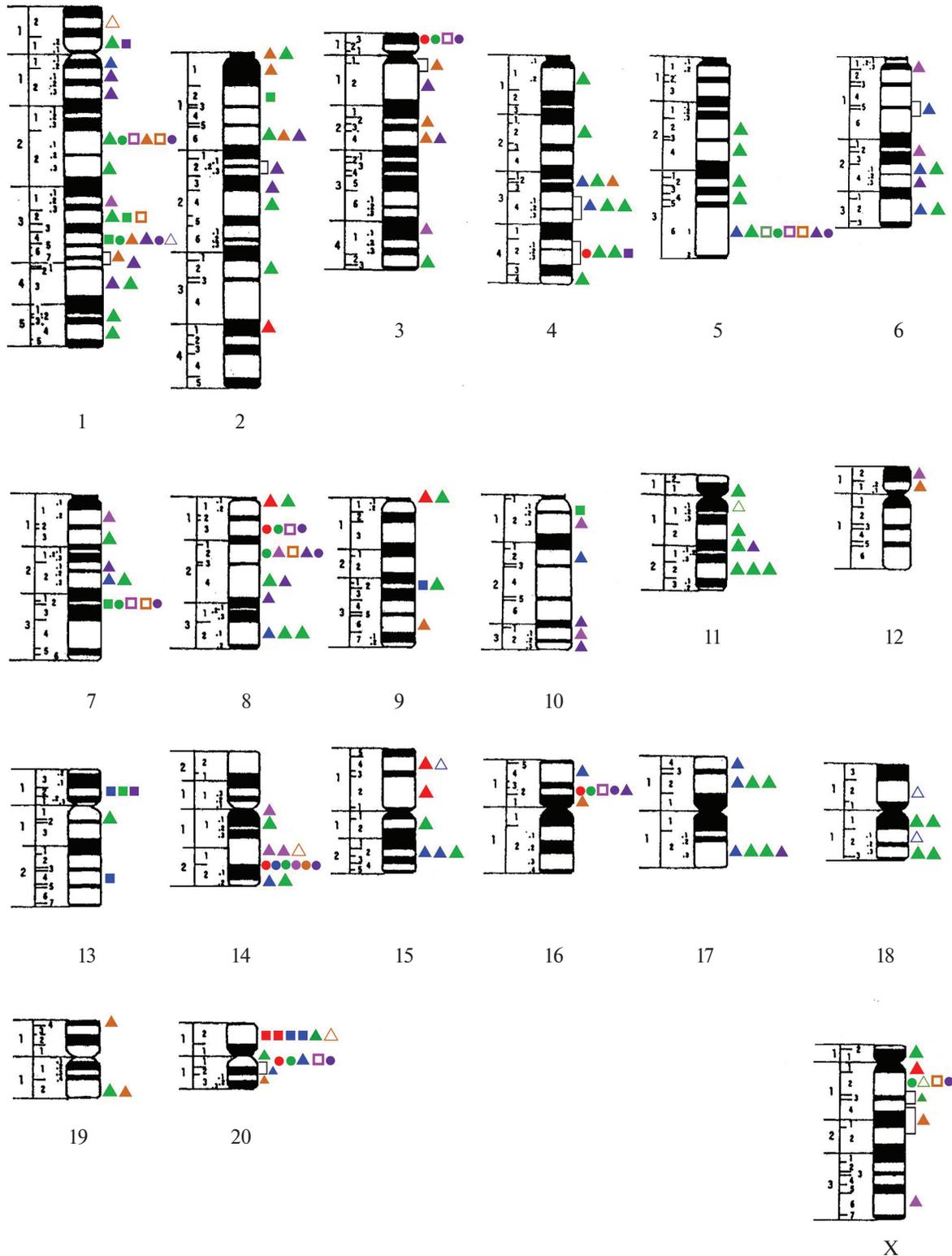


Рис. 7. Схема, демонстрирующая точки разрывов структурно перестроенных хромосом в клетках линии HindIII-G до и после облучения и новых линий – HindIII-G-1 на разных сроках после облучения и HindIII-G-2. Цветом показаны точки разрывов хромосом: *красный* – в необлученных клетках HindIII-G; *синий* – через 27 сут после облучения клеток HindIII-G; *зеленый, сиреневый и коричневый* – после облучения HindIII-G-1 на пассаже 17, 22 и 34 соответственно; *темно-фиолетовый* – клетки после повторного облучения HindIII-G-1 (клетки HindIII-G-2), пассаж 12. *Точки: кружки* – разрывы хромосом в клональных СПХ; *цветные квадраты* – разрывы в клональных СПХ, составляющие меньше 10%; *цветные треугольники* – разрывы хромосом в неклональных СПХ; *белые квадраты* – точки разрывов в СПХ, ставших неклональными на последующих сроках культивирования; *белые треугольники* – разрывы, в которых наличие структурных перестроек вызывает сомнения; *квадратная скобка* – районы разрыва хромосом, которые не могут быть точно идентифицированы.

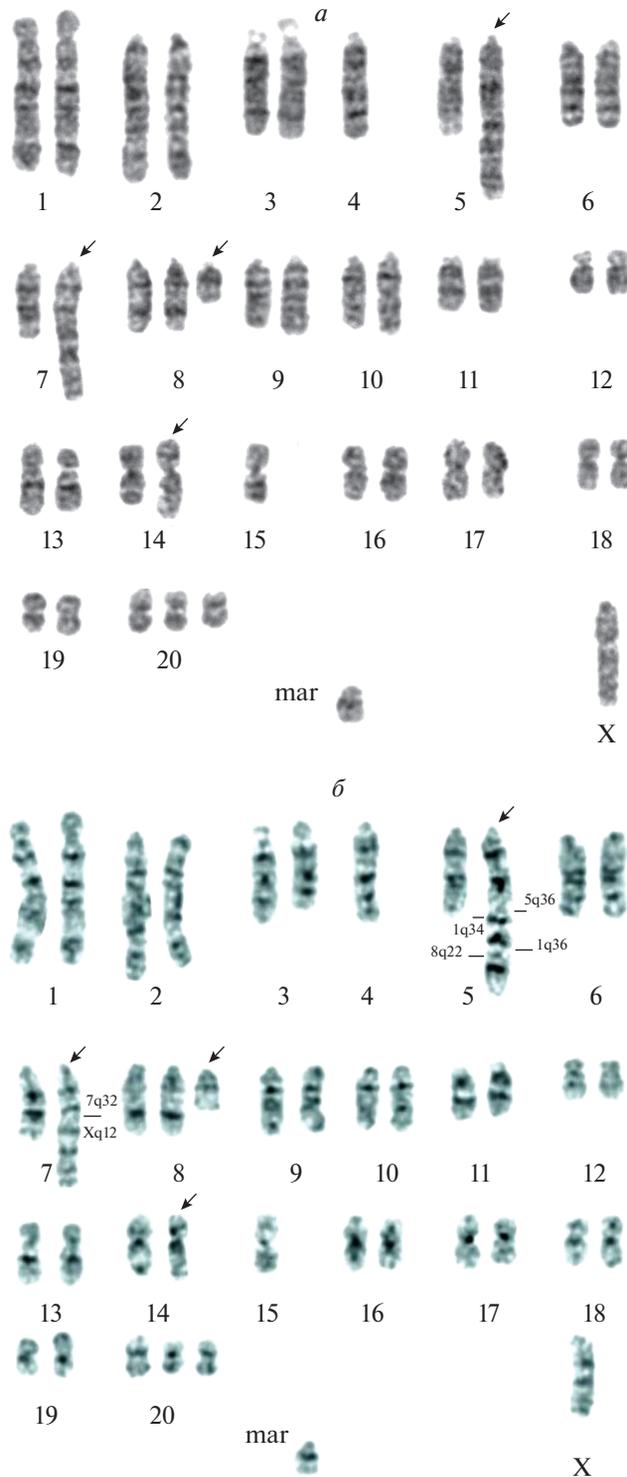


Рис. 8. Кариотипы клеток новых псевдодиплоидных линий HindIIIГ-1 и HindIIIГ-2. *а* – Кариотип клетки HindIIIГ-1 на 17-м пассаже после облучения с новыми численными и структурными перестройками хромосом: 41,X,-X,-4;der(5)t(1;5;8)(q22;?q34q36;q22),der(7)t(X;7)(q12;q32),+8,der(8)(q22)add(q22;?),der(14)?dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20,+mar(?;7)(?cen;q32); mar – маркерная хромосома. *б* – Кариотип клетки HindIIIГ-2 (после второго облучения клеток HindIIIГ-1) на 12-м пассаже: 41,X,-X,-4;der(5)t(1;5;8)(q22;?q34q36;q22),der(7)t(X;7)(q12;q32),+8,der(8)-(q22)add(q22;?),der(14)?dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter),-15,+20,+mar(?;7)(?cen;q32), *цифры* у der(5) указывают локусы разрыва хромосомы, *стрелки* указывают на перестроенные хромосомы.

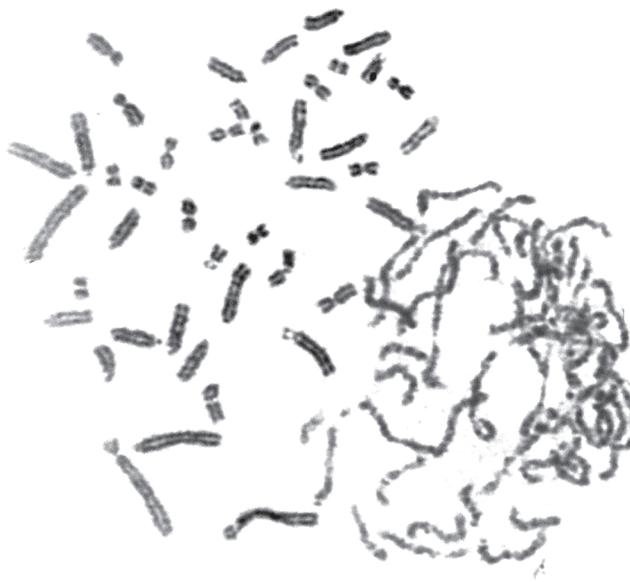


Рис. 9. Тетраплоидная метафазная пластинка в линии HindIIIГ-1, имеющая метафазные и одновременно профазные недоконденсированные хромосомы. Пассажа 34.

бираются клетки с обновленным геномом, наиболее адаптированные к новым условиям (Liu et al., 2014; Ye et al., 2019). В нашей работе клетки HindIIIГ не погибли после облучения в дозе 6 Гр и, более того, стали псевдодиплоидными и пролиферирующими клетками. В части клеток была обнаружена экспрессия маркеров стволовых клеток Nanog и Oct3/4 (Chitikova et al., 2014).

Кариотип клеток линии HindIIIГ-1, сформировавшийся после облучения, на всех пассажах сохраняет клональные СПХ, типичные для исходной линии HindIIIГ: перестроенную хромосому 14 — *der(14)dup(14)(q21q22.1)del(14)(q22qter)*), предположительно, с частичной дупликацией района q21-q22.1, моносомию хромосомы 15, а также трисомию хромосомы 20. В результате моносомии хромосомы 15 в этих клетках присутствует всего одна копия гена *Rb1*, который локализован в локусе q12 ее длинного плеча. Белок RB1 участвует в прохождении контрольной точки G₁/S клеточного цикла, предотвращая вступление клеток в цикл с аномальными хромосомами. В результате трисомии хромосомы 20, которая содержит гены *Itgb2*, *Notch4*, *Cdk1*, *Cdkn1b*, *Srpk1*, *Vegfa*, *Rab11b*, *Tnf*, *Hsp70-1*, *Ras3*, *Rps18* (согласно базе данных генома крысы (RGD): [http://rgd/mcv/edu](http://rgd.mcvc.edu)), в геноме клеток HindIIIГ и Hind IIIГ-1 эти гены находятся в трех копиях.

На 17-м пассаже линии HindIIIГ-1 выявлен клон клеток с перестроенной хромосомой 5 — *der(5)t(1;5;8)(q22;q34;q36;q22)*, состоящей из фрагментов 3-х хромосом (согласно разрешающей способности GTG-метода). Хромосома 5 рвется в локу-

се q36, который чаще подвержен перестройкам в клетках линии HindIIIГ-1 и его вовлечение в перестройки неслучайно. В этом локусе, согласно базе данных генома крысы RGD, выявлены гены, связанные с развитием рака и поддержанием опухолевого фенотипа: *Casp9*, *Kif1b*, *Pax7*, *Pik3r3*, *Prkaα2*, *Rragc*, *Runx3*, *Wnt4*.

Кроме того, в линии HindIIIГ-1 на пассаже 17 обнаружено увеличение до 30% доли клеток с АРГ в локусе p12 хромосомы 3, как и в клетках HindIIIГ-2 (32%), по сравнению с клетками HindIIIГ до облучения. Шитиковой с сотрудниками (Chitikova et al., 2014) было показано возобновление пролиферации клеток этих линий, что, по-видимому, сопряжено с увеличением числа клеток с АРГ. Количество копий и активность рибосомных генов важны для процессов пролиферации, дифференцировки, старения и апоптоза, а также поддержания гомеостаза клетки (Grummt, 2013; Orsolich et al., 2015). При опухолевой трансформации клеток и опухолевой прогрессии происходит изменение как количества копий рибосомных генов, так и их перемещение внутри хромосомы или на другие хромосомы (Мамаева, 1996, 2000).

Появление клеток с *der(5)* и увеличение числа клеток с АРГ в хромосоме 3 в популяциях клеток HindIIIГ-1 и Hind IIIГ-2 на 17-м и 12-м пассажах соответственно, вероятно, способствует выживанию после облучения всей клеточной популяции этих линий.

На 17 пассаже линии HindIIIГ-1 почти во всех клетках (в 25 из 30 клеток) кариотип содержал боль-

шое число клональных и неклональных СПХ — до 6 перестроек в сумме в одной клетке, в которые вовлекались разные хромосомы. Чаще других хромосом подвергались изменениям хромосомы: 1, 2, 4, 5, 8 и 11. Всего обнаружено 75 точек разрывов хромосом, при этом локус 11q22 хромосомы 11 чаще других подвергался разрывам. Наличие такого количества клеток с СПХ и сохранение их длительное время после облучения может происходить в результате замедленной во времени репарации ДР-ДНК, что было показано Шитиковой с сотрудниками (Chitikova et al., 2014). Отсутствие или нарушение репарации ДР-ДНК приводит к возникновению перестроек хромосом.

Мы наблюдали перестроенные хромосомы в метафазных пластинках уже с первого по четвертый день после облучения. Такие клетки должны стареть или подвергаться апоптозу, но клетки HindIII-G при наличии ДР-ДНК выживают в результате инактивации программы апоптоза, блокированного высоким уровнем экспрессии антиапоптотического гена B1V19кД (Han et al., 1995).

На 22-м пассаже клетках HindIII-G-1 не приобрели новые клональные СПХ и не сохранили неклональные СПХ, выявленные на 17-м пассаже. Отсутствие клеток HindIII-G-1 с неклональными СПХ на более поздних пассажах, которые встречались на 17-м пассаже, возможно, связано с неспособностью аномальных хромосом правильно сегрегировать в дочерние клетки в результате неактивной или дефектной центромеры и которые затем могут подвергаться фрагментации и аутофагии. На пассаже 22 мы наблюдали метафазные пластинки с отдельными мелкими хромосомными фрагментами, вероятно, фрагментами одной или нескольких перестроенных хромосом (рис. 6). Клетки могут приобретать второй гомолог хромосомы взамен утраченного вследствие механизма униродительской диссомии (uniparental disomy), в результате чего появляются два гомолога хромосомы от одного предка (Tuna et al., 2009). Возможно, эти хромосомы могут быть с генетическими нарушениями, определяющими новые свойства клеток HindIII-G-1.

В настоящее время уделяется большое внимание неклональным СПХ, которые создают эволюционный потенциал популяции, и количество которых отражает степень нестабильности генома. Неклональные СПХ увеличивают гетерогенность и пластичность клеточной популяции. Это позволяет клеткам адаптироваться к изменениям условий существования и выживать при генотоксическом стрессе (Liu et al., 2014; Heng et al., 2016, 2018; Ye et al., 2018; Frias et al., 2019). Так, например, при переводе клеток трансформированной линии крысы LRec-1 в среду без сыворотки в кариотипе появились 4 новые клональные СПХ, которые способствовали клеткам адапти-

роваться к измененным условиям среды (Ярцева с сотр., 2007). В то же время, клеточные популяции, по-видимому, обладают стабильной кариотипической структурой и определенной вероятностью возвращения к исходному стабильному состоянию, как было показано для популяций клонов и субклонов клеток линии СНО-К1 китайского хомячка (Полянская с сотр., 1981). Увеличение неклональных и клональных СПХ в популяции клеток HindIII-G-1 и HindIII-G-2 необходимо только для выживания клеток в период стресса после облучения. На более поздних пассажах после облучения кариотипическая гетерогенность уменьшается. Клетки HindIII-G имеют необходимый и достаточный и в тоже время пластичный геном, позволяющий клеткам выжить после повреждающего действия облучения и создать новую популяцию псевдодиплоидных клеток, напоминающих стволовые (Chitikova, 2014).

Возникновение новой популяции быстро пролиферирующих клеток определяется не новыми клональными СПХ, а, по-видимому, эпигеномными изменениями, создающими измененный фенотип клеток после облучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования по плановой теме Института цитологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мамаева С.Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. Т. 38. № 8. С.787. (Mamaeva S.E. 1996. Regularities of cell karyotypic evolution in culture. Tsitologiya. V. 38. P. 787).
- Мамаева С.Е. 2002. Хромосомы постоянных клеточных линий человека. В кн: Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. С. 36. (Mamaeva S.E. 2002. Chromosomes of human permanent cell lines. In: Atlas of chromosomes of human and animal cell lines. M.: Scientific world. P. 36).
- Полянская Г.Г., Абрамян Д.С., Глебов О.К. 1981. Кариотипическая структура клоновых популяций клеток китайского хомячка при длительном культивировании. Цитология. Т. 23. № 7. С. 818. (Polyanskaya G.G., Abramyan D.S., Glebov O.K. 1981. The karyotypic structure of clonal population of Chinese hamster cells during a prolonged cultivation. Tsitologiya. V. 23. P. 818).

- Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф., Арцыбашева И.В. 2007. Перестройки хромосом и их роль в спонтанной иммортализации и трансформации эмбриональных клеток крысы *in vitro*. Цитология. Т. 49. № 4. С. 311. (Yartseva N.M., Fedortseva R.F., Artsybasheva I.V. 2007. Chromosomal rearrangements and their effects in spontaneous immortalization and transformation of rat embryo cells *in vivo*. Tsitologiya. V. 49. P. 311).
- Chitikova Z.V., Gordeev S.A., Bykova T.V., Zubova S.G., Pospelov V.A., Pospelova T.V. 2014. Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. Cell Cycle. V. 13. C. 1424.
<https://doi.org/10.4161/cc.28402>
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., Chowdhury D., Pellma B. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. Nature. V. 482. P. 53.
<https://doi.org/10.1038/nature10802>
- Frias S., Ramos S., Salas C., Molina B., Rivera-Luna S.S.R. 2019. Nonclonal chromosome aberrations and genome haps in somatic and germ cells from patients and survivors of Hodgkin lymphoma. Genes. V. 10. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/genes10010037>
- Grummt I. 2013. The nucleolus – guardian of cellular homeostasis and genome integrity. Chromosoma. V. 122. P. 487.
- Han J., Sabbatini P., Perez D., Rao L., Modha D., White E. 1996. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Genes Dev. V. 10. P. 461.
<https://doi.org/10.1101/gad.10.4.461>
- Heng H.H.Q., Regan S.M., Liu G., Ye C.J. 2016. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? Mol. Cytogen. V. 9. P. 15.
<https://doi.org/10.1186/s13039-016-0223-2>
- Heng H.H., Horne S.D., Chaudhry S., Regan S.M., Liu G., Abdallah B.Y., Ye C.J. 2018. A postgenomic perspective on molecular cytogenetics. Curr. Genomics. V. 19. P. 227.
- Howell W., Black D.A. 1980. Controller silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method. Experientia. V. 36. P. 1014.
- Jeggo P.A., Löbrich M. 2006. Radiation-induced DNA damage responses. Radiat. Prot. Dosimetry. V. 122. P. 124.
- Kakarougkas A., Ismail A., Chambers A.L., Riballo E., Herbert A.D., Künzel J., Löbrich M., Jeggo P.A., Downs J.A. 2014. Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. Mol. Cell. V. 55. P. 723.
- Liu G., Stevens J.B., Horne S.D., Abdallah B.Y., Ye K.J., Bremer S.W., Ye C.J., Chen D.J., Heng H.H. 2014. Genome chaos. Survival strategy during crisis. Cell Cycle. V. 13. P. 528.
<https://doi.org/10.4161/cc.27378>
- Ly P., Cleveland D.W. 2017. Rebuilding chromosomes after catastrophe: emerging mechanisms of chromothripsis. Trends Cell Biol. V. 27. P. 917.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.005>
- Mardin B.R., Drinas A.P., Waszak S.M., Weischenfeldt J., Isokane M., Stütz A.M., Raeder B., Efthymiopoulos T., Bucitelli C., Segura-Wang M., Northcott P., Pfister S.M., Lichter P., Ellenberg J., Korbel J.O. 2015. A cell-based model system links chromothripsis with hyperploidy. Mol. Syst. Biol. V. 11. P. 828.
<https://doi.org/10.15252/msb.20156505>
- Mitelman F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutat. Res. V. 462. P. 247.
- Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. Nature Rev. Cancer. V. 7. P. 233.
- Ohgaki H., Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. Cancer Sci. V. 100. P. 2235.
- Orsolio I., Jurada D., Pullen N., Oren M., Eliopoulos A.G., Volarevic S. 2015. The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. Semin Cancer Biol. pii: S1044-579X(15)30004-3.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer>
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. Hereditas. V. 90. P. 1.
- Pellestor F.C. 2019. Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. Mol. Cytogenet. V. 12. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/s13039-019-0415-7>
- Satoh H., Yoshida M.S., Sasaki M. 1989. Resolution chromosome banding in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. Cytogenet. Cell Genet. V. 50. P. 151.
- Shaffer, M.L. Slovak, L.G. Cambell (eds); S. Karger, Basel, 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.
- Tuna M., Knuutila S., Mills G. B. 2009. Uniparental disomy in cancer. Trends in Molecular Medicine. V. 15. P. 120 .
- Yartseva N.M., Bykova T.V., Zubova S.G., Pospelov V.A., Pospelova T.V. 2019. Chromosomal instability and evolution of transformed phenotype in cell lines selected from senescent rat embryonic fibroblasts with rapamycin. Cell Tissue Biol., V. 13. P. 18.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X19010103>
- Ye C.J., Regan S., Liu G., Alemara S., H. Heng H. 2018. Understanding aneuploidy in cancer through the lens of system inheritance, fuzzy inheritance and emergence of new genome systems. Mol. Cytogen. V. 11. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/s13039-018-0376-2>
- Ye C.J., Sharpe Z., Alemara S., Mackenzie S., Liu G., Abdallah B., Horne S., Regan S., Heng H.H., 2019. Micronuclei and genome chaos: changing the system inheritance. Genes. V. 10. P. 366.
<https://doi.org/10.3390/genes10050366>
- Zhang C.Z., Spektor A., Cornils H., Francis J.M., Jackson E K., Liu S., Meyerson M., Pellman D. 2015. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. Nature. V. 522. P. 179.
<https://doi.org/10.1038/nature14493>

ALTERATIONS OF KARYOTYPE IN IRRADIATED APOPTOSIS-RESISTANT HINDIIIIG CELLS AFTER PROLONGED CULTIVATION**N. M. Yartseva^{a, *}, G. V. Chitikova^b, T. V. Bykova^a, S. G. Zubova^a, E. U. Kochetkova^a,
V. A. Pospelov^a, and T. V. Pospelova^a**^a*Institute of Cytology RAS, St. Peterburg, 194064 Russia*^b*University of Geneva, Geneva, 1205 Switzerland***e-mail: ya.ya-natm27951@yandex.ru*

Genome instability, which is manifested in numerous chromosomal reorganizations, promotes acquiring of new properties and therapy resistance of tumor cells. Structural rearrangements of chromosomes usually follow DNA damage. The aim of the present work was to analyze karyotypic alterations in apoptosis-resistant HindIIIIG rat cell line after irradiation. New pseudodiploid HindIIIIG-1 line originated from irradiated HindIIIIG cells that undergo polyploidization, caused G2/M cell cycle arrest, followed by depolyploidization. While initial HindIIIIG cell line was characterized with number of chromosome 42 and 14% of tetraploid cells, and two numerical and one structural chromosomal rearrangements – der(14), at 4th day after irradiation almost all cells were polyploid, with multiple chromosomal fragments. Polyploid cells retain till passage 17, and after cell population is predominantly pseudodiploid with karyotype similar to non-irradiated cells, but with increased number of chromosome rearrangements. At later passages karyotype is restored, and chromosomal rearrangements are no longer seen. This study highlights the role of clonal and non-clonal chromosome rearrangements of irradiated cells survival and formation of new cell populations.

Keywords: chromosomal rearrangements, chromosomal fragmentation, polyploidization, de-polyploidization