

**НАРУШЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СТРУКТУРЫ КАРИОТИПА  
ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА ЛИНИИ CHL V-79 RJK  
В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ПРИ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ**

© Т. М. Гринчук,<sup>1</sup> М. А. Шилина, Л. Л. Алексеенко

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*  
<sup>1</sup> электронный адрес: grintat@bk.ru

В настоящей работе показано, что длительное культивирование фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK при повышенной температуре сопровождается отбором вариантов с генетическими изменениями на уровне кариотипа. С первых ступеней селекции на устойчивость к температуре 40 °С в анализируемой популяции выявляются варианты с разнотипными кариотипическими изменениями (возрастает частота встречаемости полиплоидов и появляются генетически дефектные клетки с перестройками — делециями, инверсиями, транслокациями, ДМ-хромосомами в некоторых клетках). В процессе культивирования отбирали варианты с прицентромерными полочками и наличием ДОО/ГОО на хромосомах в виде специфических маркеров. Неспецифическая дестабилизация кариотипа на первых этапах селекции была сопряжена с повышением экспрессии генов *hsc70* (конститутивной изоформы белка теплового шока семейства HSP70) и *pgp1*, продуктом которого является мембранный транспортер р-гликопротеин. После длительного культивирования клеток при повышенной температуре экспрессия исследуемых генов возвращалась к исходному уровню.

**Ключевые слова:** белки теплового шока, гипертермия, дестабилизация кариотипа, стресс, терморезистентность.

**Принятые сокращения:** ГОО — гомогенно окрашенная область, ДГМ — дополнительный генетический материал, ДМ — двойные мини-хромосомы, ДОО — дифференциально окрашенная область, МЛУ — множественная лекарственная устойчивость, ОТ — обратная транскрипция, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Нестабильность генома — одна из важнейших проблем клеточной биологии. Изменения, вызывающие повреждение ДНК, являются причиной появления аномалий в структуре сестринских хроматид, приводящих к изменениям в структуре хромосом (Morgan et al., 1996). Кариотипическая нестабильность может быть индуцирована разными стрессорными факторами, наиболее изученными из которых являются ионизирующее излучение и химические агенты (Limoli et al., 1997).

В молекулярной и клеточной биологии сейчас активно изучается влияние гипертермии на генетический аппарат клетки. Несмотря на то что диапазон оптимальной для жизнедеятельности температуры варьирует у разных организмов, защитный механизм, названный «ответом на тепловой шок» весьма консервативен.

Повышение температуры индуцирует денатурацию и агрегацию белковых структур, что может приводить к разнообразным клеточным дефектам — изменениям структуры цитоскелета (Toivola et al., 2010), фрагментации эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, уменьшению количества митохондрий и лизосом (Welch, Suhan, 1985), нарушению сплайсинга РНК (Vogel et al., 1995; Boulon et al., 2010). Массовые разрушения и реорганизация клеточных компонентов ведут к общему

снижению жизнеспособности и гибели клеток. Ответ организма на тепловой шок зависит от его интенсивности и длительности, а также от типа клеток. Умеренный прогрев вызывает апоптоз или индуцированное стрессом преждевременное старение клеток, жесткое тепловое воздействие приводит к их некротической гибели (Harmon et al., 1990; VanderWaal et al., 1997; Alekseenko et al., 2012).

Клеточный ответ на гипертермию сопровождается индукцией и накоплением чрезвычайно консервативных белков теплового шока (heat shock proteins, Hsp) (Welch et al., 1991; Richter et al., 2010). Hsp в соответствии с их молекулярной массой делят на два класса. К первому классу относят Hsp с мол. массой менее 40 кДа: Hsp32, Hsp27, Hsp20 и др. (Kregel, 2002). Второй класс Hsp включает в себя белки с высокой мол. массой (60—100 кДа): Hsp 60, Hsp70, Hsp90 и Hsp110 (Hildegand et al., 2002). Под действием тепла усиливается экспрессия генов не только Hsp, но и других (более 100), участвующих в фолдинге, деградации, транспорте белков и репарации ДНК и РНК (Gasch et al., 2000; Tabuchi et al., 2008; Richter et al., 2010).

Чувствительность клеток к гипертермии зависит от стадии клеточного цикла. Результаты различных исследова-

Последовательности нуклеотидов, использованные в качестве праймеров для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер продукта ПЦР	Температура отжига, °С	Число циклов
<i>hsc70</i>	5'atccccaagattcagaagct3'	5'ttgatgaggacagtcac3'	228	63	22
<i>hsp90</i>	5'aatcggaagaagcttcaga3'	5'gtgctgtgacaatacaga3'	446	55	23
<i>pgp1</i>	5'tctaaggttaggggttt3'	5'tatcaaacagctcacatcc3'	220	55	23
<i>β-актин</i>	5'gccgagcgggaatcgtgctg3'	5'cggtggacgatggagggccg3'	508	70	25

дований показали, что клетки в S-фазе и митозе более чувствительны к высокой температуре, чем в G<sub>1</sub>- или G<sub>2</sub>-фазе (Westra, Dewey, 1971; Palzer, Heidelberger, 1973; Bhuyan et al., 1977). В S-фазе клеточного цикла гипертермия приводит к нерепарируемым однонитевым разрывам ДНК. На границах фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>/M при тепловом воздействии могут возникать двухнитевые разрывы ДНК. Тепловой шок, как и ионизирующее облучение, вызывает арест в фазе G<sub>2</sub>/M, однако при гипертермии арест в фазе G<sub>2</sub>/M происходит раньше и сохраняется в течение меньшего времени, чем радиационный блок (Valenzuela et al., 1997).

Таким образом, тепловой стресс, как и другие стресс-факторы, вызывающие однонитевые (Warters et al., 1985) и двухнитевые (Tomita, 2010) разрывы ДНК, может быть индуктором хромосомной нестабильности. Ответ на вопрос о том, какие именно кариотипические изменения претерпевают клетки в условиях длительного культивирования при повышенной температуре, требует углубленного цитогенетического анализа.

Существуют данные о том, что селекция клеток на устойчивость к повышенной температуре сопровождается возникновением множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (Константинова и др., 1994). Феномен МЛУ сопряжен с усилением экспрессии мембранных гликопротеинов (Pgps), ответственных за выведение цитостатиков из трансформированных клеток.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение изменений в структуре кариотипа и экспрессии генов белков теплового шока (*hsp70* и *hsp90*) и р-гликопротеина (*pgp1*) в клетках китайского хомячка линии CHL V-79 RJK при длительной селекции на устойчивость к повышенной температуре (40 °С вместо 37 °С в норме).

## Материал и методика

Клетки. Фибробласты легкого китайского хомячка линии CHL V-79 RJK были получены и любезно предоставлены д-ром Ф. Раддлом (Йельский университет, США). Клетки культивировали во флаконах 25 см<sup>2</sup> (Nunc, Дания) в среде ДМЕМ (Flow Lab., США), содержащей 10 % сыворотки плодов крупного рогатого скота (Биолот, Россия) и гентамицин (100 мкг/мл; Sigma, США), в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Получение терморезистентных клеточных вариантов осуществляли путем селективного отбора клеток исходной линии, сохранивших способность к пролиферации при повышении температуры до 40 °С. Схема опыта была следующей. Через 10—12 сут культивирования в условиях повышенной температуры жизнеспособными оставались единичные клетки. Их переносили в свежую культуральную среду, помещали в термостат

при 37 °С и культивировали до достижения клетками логарифмической фазы роста. Размножившиеся клетки рассевали (1 : 3) и продолжали культивировать при 40 °С в течение 60—80 сут. При пересевах использовали стандартный 0.25%-ный раствор трипсина (Биолот, Россия). Интервал между пересевами составлял 48—72 ч. На пассажах 10, 22, 34, 55 и 75 анализировали кариотип терморезистентных клеток.

Получение препаратов метафазных хромосом. Для накопления митотирующих клеток в культуру, находящуюся в логарифмической фазе роста, добавляли раствор колхицина в конечной концентрации 3.6 мкг/мл на 1 ч, после чего клетки ферментативно отделяли от пластика с помощью 0.25%-ного раствора трипсина (Биолот, Россия). Нейтрализацию действия трипсина осуществляли ранее отобранной культуральной средой. Для разрушения плазматической мембраны в суспензию клеток добавляли 0.56%-ный раствор KCl (Реахим, Россия) (время подбирали экспериментально). Клетки фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1) (Реахим, Россия). Общее время фиксации, при 3-кратной смене охлажденного фиксатора с интервалами в 0.5 ч составляло 1.5 ч. Фиксированные клетки помещали на холодные влажные предметные стекла. Перед окраской препараты высушивали при комнатной температуре.

Хромосомы окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (BDH, Англия) в фосфатном буфере, рН 6.8. Для дифференциального окрашивания (G-бандирование) использовали тот же раствор Гимза, но предварительно препараты обрабатывали 0.25%-ным раствором трипсина (Биолот, Россия).

Анализ кариотипа осуществляли под световым микроскопом Ampleval (Германия) при увеличениях 20× и 100× и по микрофотографиям метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом. Для определения частоты встречаемости в популяции полиплоидных клеток в каждом отдельном случае анализировали не менее 500 метафазных пластинок. Хромосомы идентифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой, принятой для китайского хомячка (Ray, Mohandas, 1975). Частоту встречаемости хромосомных перестроек в каждом конкретном случае определяли, анализируя не менее 20 метафазных пластинок.

Определение экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа генной экспрессии тотальную РНК выделяли по описанной методике (Chomczynski, Sacchi, 1987). Синтез кДНК проводили с использованием 1 мкг тотальной РНК при помощи системы RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Специфичные гены были амплифицированы с использованием полиме-

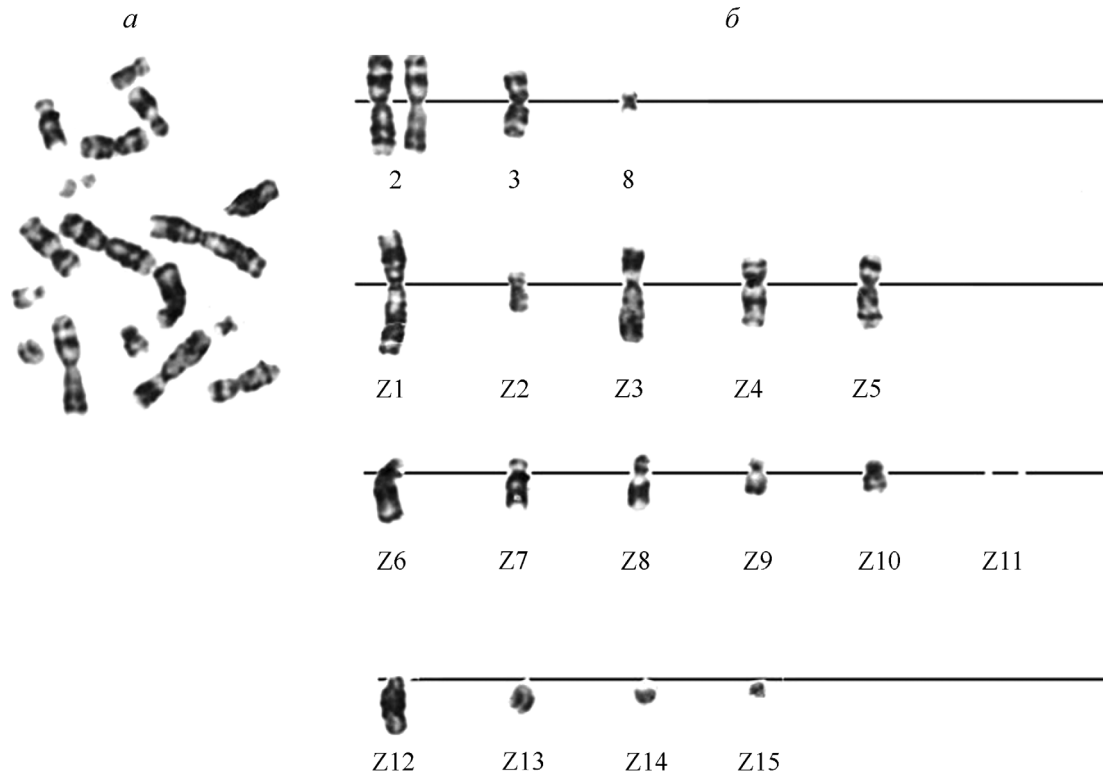


Рис. 1. Стандартный кариотипический набор фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK. G-бандирование. а — метафазная пластинка. б — кариограмма, число хромосом ( $n$ ) 18; хромосомы 2, 3 и 8 — неперестроенные; Z1—Z15 — маркеры линии.

разы Taq DNA polymerase (Fermentas, Литва) на амплификаторе Cyclo Temp (СТМ, Россия) по следующей программе: горячий старт-денатурация, 93 °С в течение 3 мин, отжиг праймеров при 56—70 °С в течение 2 мин, удлинение цепи при 72 °С в течение 1 мин 30 с; затем 22—25 циклов: денатурация при 93 °С в течение 45 с, отжиг праймеров при 53—70 °С в течение 1 мин, удлинение цепи при 72 °С в течение 1 мин 30 с, завершающее удлинение цепи — 72 °С в течение 10 мин. Условия проведения ПЦР и последовательности специфических праймеров представлены в табл. 1. В качестве количественного контроля РНК и исключения контаминации ДНК в реакции обратной транскрипции использовали ген  $\beta$ -актин. Электрофорез амплифицированного продукта проводили в 2%-ном агарозном геле (Sigma, США) с бромистым этидием (Sigma, США). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК 1 Kb маркер (Fermentas, Литва). Детекцию ДНК проводили в ультрафиолетовом свете (302 нм) с помощью прибора Transilluminator (UVP, США). Гели фотографировали. Денситометрию проводили с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2.

## Результаты и обсуждение

Цитогенетический анализ клеток исходной линии CHL V-79 RJK, проводившийся неоднократно в течение продолжительного (нескольких лет) культивирования, периодически сопровождавшийся их заморозкой и разморозкой, показал относительную стабильность кариотипа. Преимущество в популяции имели анеуплоидные клетки с числом хромосом 18—19. Полиплоидные околотри- и околотетраплоидные клеточные варианты встречались

редко (1—2 %). Типичный хромосомный набор был представлен 3 неперестроенными хромосомами (хромосомы 2, 3 и 8), характерными для клеток китайского хомячка в норме, и 15 перестроенными хромосомами (Z1—Z15) — маркерами линии (рис. 1). Отклонения от нормы были относительно редки и связаны с присутствием в кариотипическом наборе либо атипичных хромосом, случайным образом перестроенных, либо дополнительных хромосомных копий самых маленьких хромосом Z14 и Z15 (табл. 2).

Анализ терморезистентных клеток CHL V-79 RJK показал, что уже непродолжительное культивирование при повышенной до 40 °С температуры (10—22 пассажа) сопряжено с дестабилизацией кариотипа. На 10-м пассаже (30 сут культивирования) частота встречаемости околотри- или околотетраплоидных клеточных вариантов возросла до 14 % вместо 1—2 % в норме. Единичные полиплоидные клетки имели околотетраплоидное число хромосом ( $n$  в пределах 100), чего никогда не наблюдали в этих клетках при культивировании в стандартных условиях. Детальный анализ структуры кариотипа CHL V-79 RJK выявил хромосомные поломки (рис. 2). Оказалось, что повышенной ломкостью обладают 6 хромосом набора, а именно хромосомы 2, 3, Z1, Z3, Z4 и Z5 (рис. 2). Наиболее уязвимой к термическому воздействию оказалась хромосома 2, причем часто поломка была прицентромерной, с сохранением плеч  $p$  и  $q$  в виде самостоятельных хромосом. В некоторых клетках присутствовала дополнительная третья копия  $2p$  или  $2q$  (табл. 2). Точки разрывов в трех других хромосомах на данном этапе селекции закономерной локализации не имели. В некоторых клетках выявлялись не встречающиеся в норме ДМ-хромосомы (рис. 3).

**Кариотипическая изменчивость клеток китайского хомячка линии CHL V-79 RJK в процессе продолжительного культивирования при повышенной температуре (40 °С)**

Варианты нарушений в структуре кариотипа	Число клеток с перестройками						
	общее число проанализированных клеток при						
	37 °С		40 °С				
	50 (10)	50 (75)	26 (10)	34 (22)	28 (34)	26 (55)	23 (75)
<b>Хромосома Z1</b>							
ПЦМП с сохранением ХМ ( <i>p, q</i> )	—	—	2	—	—	2	—
$Z1^h + Z1q$	—	—	1	—	1	—	—
$Z1^h + Z1p$	—	—	—	—	—	—	1
$Z1^h + Z1del p ter$	—	—	—	—	—	—	1
Поломка $Z1 q ter$ с сохранением ХМ	—	—	1	—	—	—	—
$del p ter$	—	—	—	4	—	—	—
inv перичентрическая	—	—	—	3	—	—	—
inv парацентрическая	—	—	—	1	—	—	—
<b>Хромосома 2 (2 копии)</b>							
$1K^h; 1K (p, q)$	—	—	4	—	1	18	22
$1K^h + 1K$ с перичентрической inv	—	—	1	—	—	—	—
2К с ПЦМП (сохранение ХМ $2p 2q$ )	—	1	—	—	1	2	—
$2K^h + p$	—	—	1	—	—	2	—
$1K^h + p$	—	—	1	—	1	1	—
$1K^h + q$	—	—	2	—	—	2	—
$1K^h + 2 p + q$	—	—	—	—	—	1	—
$1K^h + 1K del p ter$ , сохранение ХМ	—	—	1	—	—	—	—
$2^h + q$	—	—	2	—	1	—	—
$1K^h + 1K$ с ГОО в $2p210-31$	—	—	—	—	—	—	22
<b>Хромосома Z3</b>							
ПЦМП с сохранением ХМ ( <i>p, q</i> )	—	1	—	3	—	1	23
$Z3p$	—	—	1	—	—	1	—
Поломка $qter$ , сохранение ХМ	—	—	1	—	—	—	—
$Z3^h + Z3p$	—	—	3	1	—	—	—
$Z3^h + Z3q$	—	—	—	—	—	1	—
ДГМ (дупликация одного диска) в прицентромерном районе $qZ3$	—	—	—	—	—	—	23
<b>Хромосома Z4</b>							
$del qter$	—	—	1	—	—	—	—
$Z4^h + Z4 p$	—	—	3	—	—	—	—
<b>Хромосома 3</b>							
ПЦМП с сохранением ХМ ( <i>p, q</i> )	—	—	1	—	1	1	—
<b>Хромосома Z5</b>							
$Z5^h + Z5 p$	—	—	—	—	—	1	—
$Z5^h + Z5$ с ДГМ в $pter$	—	—	—	—	1	—	—

Примечание. В скобках указан номер пассажа; ГОО — гомогенно окрашенная область, ДГМ — дополнительный хромосомный материал, К — копия, ПЦМП — перичентромерная поломка, ХМ — хромосомный материал, *p* и *q* — короткое и длинное плечи соответственно, <sup>h</sup> — нормальная хромосома, *ter* — терминально, *del* — делеция, *inv* — инверсия.

Анализ клеток на 22-м пассаже культивирования при повышенной температуре показал, что частота встречаемости полиплоидных клеток в анализируемой популяции снизилась до нормы (2%). Частота встречаемости клеточных вариантов с изменениями в структуре хромосом уменьшилась по сравнению с 10-м пассажем, а спектр структурных перестроек увеличился. Наряду с элемента-

ми кариотипической нестабильности, обнаруженными на 10-м пассаже, на этом пассаже в некоторых клетках были выявлены перестройки нового типа, а именно пара- и перичентрические инверсии (табл. 2; рис. 2). Локализованы данные перестройки были именно в тех хромосомах (2 и Z1), которые на 10-м пассаже характеризовались повышенной ломкостью. Частота встречаемости клеток с

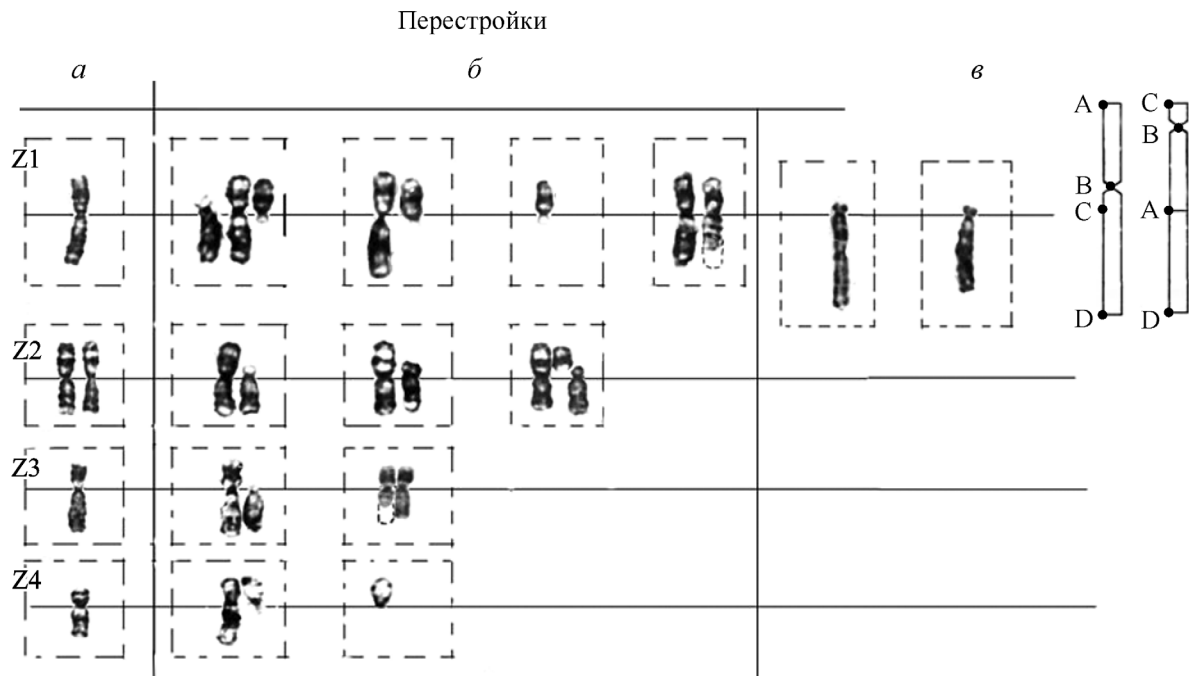


Рис. 2. Случайные перестройки в клетках CHL V-79 RJK, устойчивых к температуре 40 °С на 10-м и 22-м пассажах. *а* — хромосомы стандартной структуры; *б* — варианты хромосом с поломками, пассажи 10 и 22; *в* — варианты инверсий, пассаж 22.

ДМ-хромосомами была такой же, как на 10-м пассаже. В некоторых клетках было выявлено незначительное увеличение длины локуса  $p10-31$  в одном из гомологов хромосомы 2 (рис. 4, *б*).

На 34-м пассаже грубые перестройки (инверсии, делеции), обнаруженные на более ранних этапах культивирования при повышенной температуре (пассажи 10 и 22), равно как и ДМ-хромосомы, отсутствовали. Частота встречаемости клеток с отклонениями от нормы носила случайный характер. Тем не менее дестабилизация кариотипа была связана с повышенной ломкостью в прицентромерных районах определенных хромосом, а именно хромосом 2, 3, Z1 и Z5 (табл. 2). Клетки с различиями в длине локуса  $p210-31$  между гомологами хромосомы 2 на этом этапе культивирования в сравнении с предыдущим пассажем получили преимущество.

В течение 55 пассажей клеточная популяция существенно трансформировалась. В подавляющем большинстве метафазных пластинок (96 %) выявлялась прицентромерная поломка в одном из гомологов хромосомы 2. При этом  $2p$  и  $2q$  присутствовали в кариотипическом наборе в виде самостоятельных хромосом, являясь маркерами (M1 и M2) данного этапа селекции. Величина ДГМ в одном из гомологов хромосомы 2 ( $p210-31$ ) сохранялась без изменений (рис. 4).

На 75-м пассаже все проанализированные метафазные пластинки характеризовались наличием новых признаков дестабилизации (рис. 4, *в*; 5). Хромосома 2 была представлена лишь одной нативной копией. От второй копии сохранилось только  $p$ -плечо в виде самостоятельной маркерной хромосомы M1. При этом его длина на треть превышала длину  $2p$  в норме, что было связано с увеличением длины локуса  $2p210-31$ , имеющего вид хорошо выраженной, варьирующей по длине гомогенно окрашенной области (ГОО). Другая особенность данного этапа культивирования — наличие в подавляющем большинстве клеток еще двух новых маркеров (M3 и M4),

возникших в результате прицентромерной поломки хромосомы Z3 с сохранением  $p$ - и  $q$ -плеч в виде самостоятельных хромосом.

В рисунке G-дисков Z3q наблюдали некоторые модификационные изменения, связанные с утолщением (дуплицированием) одного из них (рис. 5). Выявленные кариотипические изменения были типичны для всех проанализированных клеток.

Сравнительный анализ генной экспрессии с использованием метода ОТ-ПЦР показал, что в терморезистентной клеточной линии CHL V-79 RJK на ранних пассажах происходило незначительное увеличение экспрессии Hsc70 — конститутивной изоформы белка теплового шока Hsp70. К 38-му пассажу экспрессия этого белка снижалась, а через 78 пассажей заметной разницы между термоустойчивыми и растущими при нормальной температуре клетками не было (рис. 6). Экспрессия индуцибельной формы  $hsp90$  на 78-м пассаже также не отличалась от контроля (рис. 6, *б*). Экспрессия гена  $pgp1$  в тер-

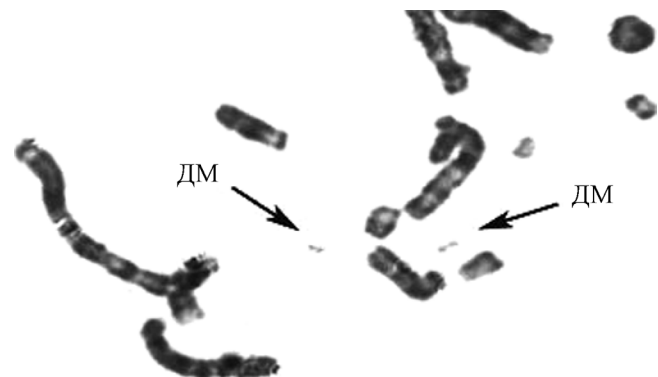


Рис. 3. Фрагмент метафазной пластинки термоустойчивых клеток CHL V-79 RJK с наличием двойных мини-хромосом (ДМ).

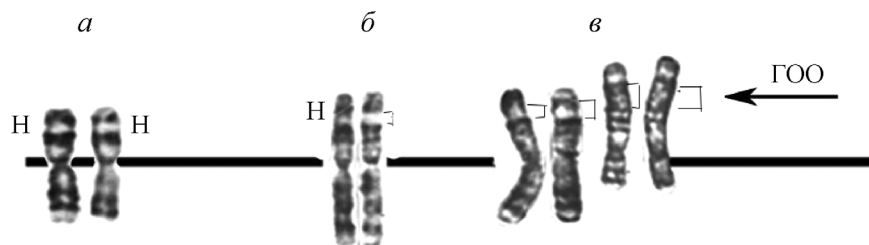


Рис. 4. Варианты изменений в структуре хромосомы 2 в процессе длительного культивирования клеток CHL V-79 RJK при повышенной температуре.

*a* — 2 копии хромосомы 2 в клетке при культивировании в стандартных условиях, структура гомологов идентичная. *б* — изменения в морфологии локуса 2p210—31 в одной из клеток CHL V-79 RJK, устойчивых к температуре 40 °С, пассаж 34. *в* — варианты изменений морфологии этого локуса в тетраплоидной клетке на пассаже 75; участок измененной морфологии с образованием ГОО указан скобкой; Н — стандартная морфология хромосомы.

морезистентных клетках на 12-м пассаже была также выше, чем в контрольных. При дальнейшем культивировании уровень экспрессии *pgp* продолжал меняться: на 38-м пассаже он увеличивался, а на 78-м возвращался к базальному уровню.

Таким образом, проведенный анализ клеток CHL V-79 RJK, отобраных на устойчивость к повышенной температуре (40 °С) показал, что при длительном культивировании в условиях гипертермии их кариотип претерпевает ряд последовательных изменений.

Первый этап изменений — возрастание частоты встречаемости полиплоидных клеточных вариантов, появление случайным образом перестроенных морфологически дефектных хромосом (с делециями или инверсиями) и появление в кариотипе клеток дополнительного генетического материала в виде ДМ-хромосом. Второй этап характеризовался, с одной стороны, стабилизацией кариотипического набора, вызванной элиминацией из популяции полиплоидных клеток, с другой — прогрессией дестабилизации, связанной с появлением новых типов

хромосомных перестроек (инверсий), расширяющих фонд кариотипической изменчивости.

Третий этап связан с селективным отбором клеток с определенными типами изменений и образованием специфических маркеров в результате прицентромерных поломок в хромосоме 2 и ГОО в 2p210—31. Четвертый этап — прогрессия кариотипической нестабильности клеточной культуры, устойчивой к повышенной температуре и активно пролиферирующей.

Усиление анеуплоидии (до 14 % вместо 1—2 % в норме) и выявление случайным образом перестроенных хромосом в клетках CHL V-79 RJK на достаточно раннем, 10-м, пассаже культивирования при повышенной температуре можно объяснить действием теплового шока, который привел к сбою в программе клеточного деления. Известно, что нарушение механизма цитокинеза может стать причиной нарушений структуры кариотипа, связанных как с образованием полиплоидных клеточных вариантов, так и с появлением морфологически дефектных хромосом.

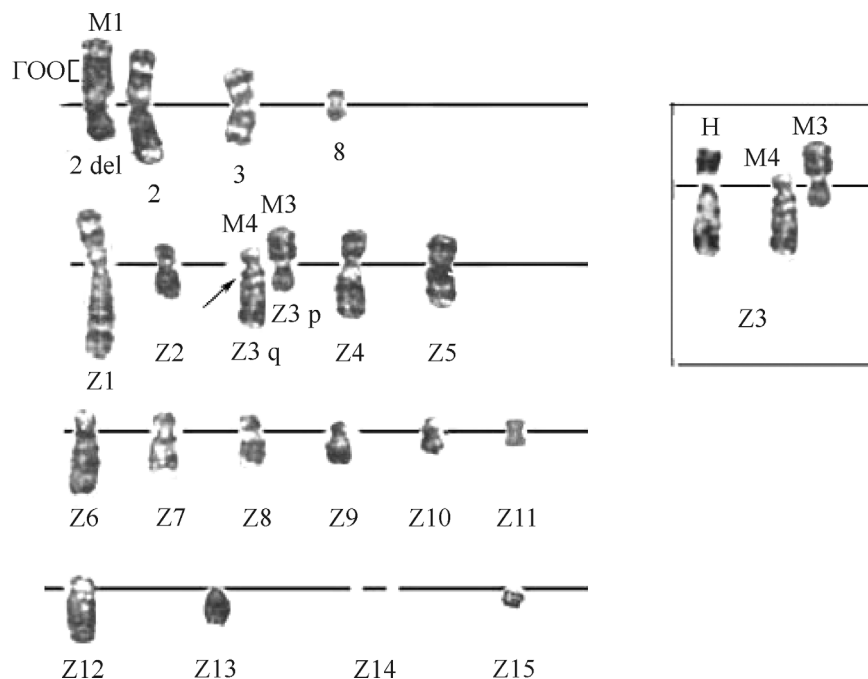


Рис. 5. Метафазная пластинка термоустойчивых клеток CHL V-79 RJK, типичная для 75-го пассажа.

M1, M3, M4 — маркерные хромосомы, возникшие в результате прицентромерных поломок хромосом 2 и Z3. Стрелкой указан дублированный локус. На врезке — образование маркеров M3 и M4.

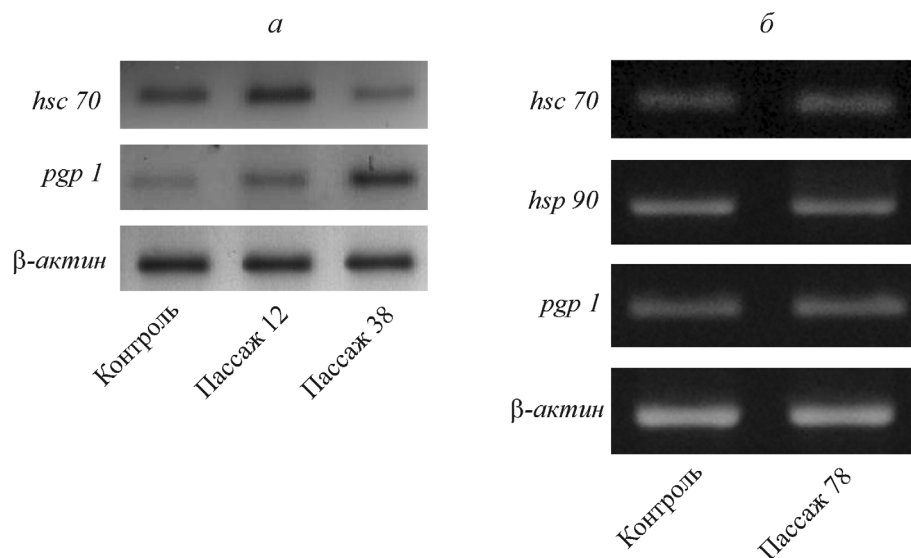


Рис. 6. Уровень экспрессии генов *hsc70* (а, б), *hsp90* (б) и *pgp1* (а, б) на разных пассажах культивирования клеток CHL V-79 RJK при повышенной температуре. Метод ОТ-ПЦР.

Существуют данные о том, что одни хромосомы кариотипического набора более консервативны по своей структуре, другие имеют сайты повышенной ломкости, так называемые фрагильные сайты (Dekaban, 1965). Наши данные указывают на то, что в кариотипе CHL V-79 RJK тоже существуют сайты повышенной ломкости. Их носителями являются наиболее крупные хромосомы набора, а одним из наиболее активных мест локализации — прицентромерные районы. Возникновение поломок хромосомного материала может определить дальнейшую судьбу клеточной популяции. С одной стороны, они могут способствовать элиминации бесцентромерного генетического материала в митозе, с другой — стать причиной образования других типов aberrаций — инверсий и транслокаций. Инверсии, равно как и транслокации, в свою очередь влекут за собой нарушение последовательности генов, что может привести к изменению их функционального состояния — подавлению или усилению экспрессии. Это способствует изменению генетического статуса исходного биологического материала.

Не так давно высказано предположение о том, что генетическая нестабильность определенных хромосом набора в условиях стресса может указывать на локализацию в них гена(ов), ответственного за адаптацию (трансформацию) клеток (Baker et al., 2007). В отселектированных на устойчивость к повышенной температуре клетках CHL V-79 RJK хромосомная нестабильность (ломкость) оказалась свойственна шести хромосомам набора — 2, 3, Z1, Z3, Z4 и Z5. Поломки в данных хромосомах были зафиксированы уже на ранних этапах культивирования (10—22-й пассажи), но носили случайный характер. При более длительном культивировании в условиях гипертермии варианты с дефектами хромосомы 2, а затем и хромосомы Z3 получают преимущество, причем порядок структурных изменений этих хромосом от пассажа к пассажию меняется. К 75-му пассажию структура кариотипа подавляющего большинства клеток претерпевает изменения, и материал хромосом 2 и Z3 представлен в виде новых маркеров. Можно предположить, что при дальнейшем культивировании (более 75 пассажей) нестабильность хромосом 3, Z1, Z4 и Z5 может также стать источ-

ником новых хромосомных маркеров и их число будет возрастать во времени. Возникновение в процессе длительного культивирования клеток CHL V-79 RJK-40 при повышенной температуре хромосомных маркеров позволяет рассматривать селективно отобранные терморезистентные клеточные варианты как клетки новой линии.

Как уже говорилось, тепловой шок сопровождается изменением экспрессии Hsp. Проведенный в настоящей работе сравнительный анализ экспрессии генов семейства HSP70 в терморезистентных клетках CHL V-79 RJK на разных этапах культивирования при повышенной температуре выявил флуктуацию экспрессии его конститутивной изоформы (*hsc70*). Методом ОТ-ПЦР мы показали, что в зависимости от продолжительности культивирования в условиях повышенной температуры на раннем (10-м) пассаже экспрессия гена *hsc70* возрастает, к 38-му пассажию немного снижается, а к 78-му возвращается к исходному уровню (рис. 6). Показано, что воздействие повышенной температуры на фибробласты, лишенные индуцибельных изоформ Hsp70 (Hsp70.1 и Hsp70.3), сопряжено с увеличением числа хромосомных aberrаций (Hunt et al., 2004). Мы в свою очередь выявили нарушение кариотипической стабильности терморезистентных клеток CHL V-79 RJK на фоне повышенной экспрессии *hsc70*. Анализ собственных данных в совокупности с данными из литературы позволил предположить, что изменение экспрессии белков семейства HSP70 в клетках и нарушение их кариотипической стабильности — процессы взаимосвязанные.

Известно, что основной тип МЛУ связан с функционированием АТФ-зависимых мембранных транспортеров, одним из которых является белок Pgp1. В промоторе гена *pgp1* имеется сильная регуляторная последовательность — элемент теплового шока (HSE), с которой при действии факторов стресса может связываться фактор теплового шока HSF1. Это приводит к увеличению экспрессии гена *pgp1*. Морфологическими проявлениями амплификации этого гена в кариотипе являются ГОО/ДОО на хромосомах. Цитогенетический анализ клеток CHL V-79 RJK на разных этапах селекции на устойчивость к бромистому этидию, вызывающему МЛУ (Гринчук и др.,

1988, 1996), показал, что в процессе продолжительного культивирования бромидоустойчивые клетки претерпели ряд последовательных кариотипических изменений. Сравнительный анализ показал, что по своим характеристикам (наличие ГОО/ДОО на хромосомах и поломок в определенных хромосомных локусах) изменения в бромидоустойчивых клетках сходны с кариотипическими изменениями термоустойчивых CHL V-79 RJK при их длительном культивировании в условиях повышенной температуры. Более того, и в случае приобретения CHL V-79 RJK фенотипа МЛУ, и в случае возникновения в них терморезистентности в процесс дестабилизации кариотипа оказались вовлечены одни и те же хромосомы — 2, 3, Z1, Z3, Z4 и Z5. Полученные данные позволяют предположить, что механизм дестабилизации клеточного генома в результате приобретения клетками устойчивости к повышенной температуре и к агентам, вызывающим МЛУ, достаточно универсален.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01820).

#### Список литературы

- Гринчук Т. М., Игнатова Т. Н., Сорокина Е. А., Арцыбашева И. В., Паньшина Ю. Т. 1988. Хромосомный полиморфизм клеток млекопитающих с множественной лекарственной устойчивостью. I. Анализ кариотипа клеток китайского хомячка, устойчивых к бромистому этидию, на ранних пассажах первых ступеней селекции. Цитология. 30 (3) : 312—320. (Grinchuk T. M., Ignatova T. N., Sorokina E. A., Artsybasheva I. V., Yu. T. Panshina 1988. Chromosome polymorphism in mammalian cells with multidrug resistance. I. Karyotypical analysis of chinese hamster resistant to ethidium bromide at the early passages of initial selection steps. Tsitologiya. 30 (3) 312—320.)
- Гринчук Т. М., Липская Л. А., Арцыбашева И. В., Сорокина Е. А., Паньшина Ю. Т., Игнатова Т. Н. 1996. Изменчивость кариотипа клеток китайского хомячка CHL V-79 RJK, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, обусловленная амплификацией генов семейства *mdr*. Цитология. 38 (2) : 161—172. (Grinchuk T. M., Lipskaya L. A., Artsybasheva I. V., Sorokina E. A., Panshina Yu. T., Ignatova T. N. 1996. Karyotype variability in the Chinese hamster lung V-79 RJK cells with multidrug resulting from MDR genes amplification. Tsitologiya. 38 (2) : 161—172.)
- Константинова М. Ф., Нисман Б. Х., Игнатова Т. Н. 1994. Получение и фенотипические особенности терморезистентных клеток китайского хомячка линии CHO-K1. Цитология. 36 (2) : 182—188. (Konstantinova M. V., Nisman B. Kh., Ignatova T. N. 1994. Selection and phenotypic features of heat resistant cells of line CHO-K1. Tsitologiya. 36 (2) : 182—188.)
- Alekseenko L. L., Zemelko V. I., Zenin V. V., Pugovkina N. A., Kozhukharova I. V., Kovaleva Z. V., Grinchuk T. M., Fridlyanskaya I. I., Nikolsky N. N. 2012. Heat shock induces apoptosis in human embryonic stem cells but a premature senescence phenotype in their differentiated progeny. Cell Cycle. 11 : 3260—3269.
- Baker D. E., Harrison N. J., Maltby E., Smith K., Moore H. D., Shaw P. J., Heath P. R., Holden H., Andrews P. W. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. Nat. Biotechnol. 25 : 207—215.
- Bhuyan B. K., Day K. J., Edgerton C. E., Ogunbase O. 1977. Sensitivity of different cell lines and of different phases in the cell cycle to hyperthermia. Cancer Res. 37 : 3780—3784.
- Boulon S., Westman B. J., Hutten S., Boisvert F. M., Lamond A. I. 2010. The nucleolus under stress. Mol. Cell. 40 : 216—227.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 (1) : 156—159.
- Dekaban A. 1965. Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. J. Nucl. Med. 760 : 740—745.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P. O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell. 11 : 4241—4257.
- Harmon B. V., Corder A. M., Collins R. J., Gobe G. C., Allen J., Allan D. J., Kerr J. F. 1990. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42—47 degrees C heating *in vitro*: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int. J. Radiat. Biol. 58 : 845—858.
- Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., Felix R., Riess H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 43 : 33—56.
- Kregel K. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J. Appl. Physiol. 92 : 2177—2186.
- Limoli C. L., Kaplan M. I., Phillips J. W., Adair G. M., Morgan W. F. 1997. Differential induction of chromosomal instability by DNA strand-breaking agents. Cancer Res. 57 : 4048—4056.
- Morgan W. F., Day J. P., Kaplan M. I., Mc Ghee E. M., Limoli C. L. 1996. Genomic instability induced by ionizing radiation. Radiat. Res. 146 : 247—258.
- Palzer R. J., Heidelberger C. 1973. Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of HeLa cells. Cancer Res. 33 : 415—421.
- Ray M., Mohandas T. 1975. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus gruseus*). Cytogenet. Cell Genet. 16 : 83—91.
- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. Mol. Cell. 40 : 253—266.
- Tabuchi Y., Takasaki I., Wada S., Zhao Q. L., Hori T., Nomura T., Ohtsuka K., Kondo T. 2008. Genes and genetic networks responsive to mild hyperthermia in human lymphoma U937 cells. Int. J. Hyperth. 24 : 613—622.
- Toivola D. M., Strnad P., Habtezion A., Omary M. B. 2010. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. Trends Cell Biol. 20 : 79—91.
- Tomita M. 2010. Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. Radiat. Res. 51 : 493—501.
- VanderWaal R., Malyapa R. S., Higashikubo R., Roti J. L. 1997. A comparison of the modes and kinetics of heat-induced cell killing in HeLa and L5178Y cells. Radiat. Res. 148 : 455—462.
- Vogel J. L., Parsell D. A., Lindquist S. 1995. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. Curr. Biol. 5 : 306—317.
- Warters R. L., Brizgys L. M., Axtell-Bartlett J. 1985. DNA damage production in CHO cells at elevated temperatures. J. Cell Physiol. 124 : 481—486.
- Welch W. J., Kang H. S., Beckmann R. P., Mizzen L. A. 1991. Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167 : 31—55.
- Welch W. J., Suhan J. P. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. J. Cell Biol. 101 : 1198—1211.
- Westra A., Dewey W. C. 1971. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells *in vitro*. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 19 : 467—477.
- Wong R. S., Thompson L. L., Dewey W. C. 1988. Recovery from effects of heat on DNA synthesis in Chinese hamster ovary cells. Radiat. Res. 114 : 125—137.



LONG-TERM CULTIVATION OF CHINESE HAMSTER FIBROBLASTS OF LINE V-79 RJK  
UNDER ELEVATED TEMPERATURE LEADS TO KARYOTYPE STRUCTURE DESTABILIZATION

T. M. Grinchuk,<sup>1</sup> M. A. Shilina, L. L. Alexeenko

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
<sup>1</sup>email: grintat@bk.ru

In this article we show that long-term cultivation of *Chinese hamster* fibroblasts of line V-79 RJK at elevated temperature resulted in the selection of variants with genetic changes at the level of karyotype. From the first steps of resistance selection to elevated temperature we identified population of cells with changes in karyotype (polyploidy cells, deletions, inversions, translocations of chromosomes, and some cells with DM-chromosomes). Further cultivation was accompanied with selection of cells with paracentral chromosome breakages and HSR's on chromosomes. Nonspecific destabilization of the karyotype (on first steps of selection) was associated with increased expression of *hsc70* and *pgp*. After long-term incubation at an elevated temperature, the cells with karyotypic changes had the basal level of *hsc70* and *pgp* expression.

**Key words:** heat shock proteins, hyperthermia, karyotype destabilization, stress, temperature resistance.

---