

DOI: 10.7868/S0041377118090072

ИЗМЕНЕНИЯ КАРИОТИПА И ПРИЗНАКОВ ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ КРЫСЫ, СЕЛЕКТИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРА mTOR-КИНАЗЫ РАПАМИЦИНА

© Н. М. Ярцева,* Т. В. Быкова, С. Г. Зубова, В. А. Поспелов,
Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: ya.ya-natm27951@yandex.ru

Исследованы структурные и численные изменения кариотипа и признаки трансформированного фенотипа клеточных линий, полученных из эмбриональных фибробластов крысы (ЭФК) селекцией на рапамицине. Антибиотик рапамицин — ингибитор mTOR-киназы — предотвращает в клетках развитие процесса репликативного старения после прохождения клетками определенного количества пассажей. В кариотипе клеток этих линий наблюдали клональные структурные перестройки хромосом (СПХ): трисомию хромосомы 7 и транслокацию t(2;7) в линии Rara-1 и в линии Rara-2 — t(4;11). При длительном пассировании клеток *in vitro* происходят накопление хромосомных перестроек и появление одновременно признаков трансформированного фенотипа — высокий пролиферативный потенциал, способность пролиферировать в клональном посеве, снижение способности к контактному ингибированию пролиферации в монослое и утрата свержочной точки на границе фаз клеточного цикла G₁/S или G₂/M. Для обработанных рапамицином линий характерно увеличение числа фокусов γH2AX и p53BP, которые не колокализуются, что свидетельствует о накоплении двухцепочечных разрывов ДНК и нарушении процессов репарации. Полученные линии Rara экспрессируют маркеры плюрипотентности — факторы Nanog и Oct3/4. Обсуждаются причины генетической и кариотипической нестабильности линий Rara при длительном культивировании.

Ключевые слова: рапамицин, репликативное старение, клеточные линии, кариотип, перестройки хромосом, генетическая нестабильность

Принятые сокращения: ДРД — двухцепочечные разрывы ДНК, МЧХ — модальное число хромосом, ОПД — ответ на повреждение ДНК, СК — стволовые клетки, СПХ — структурные перестройки хромосом, ХП — хромосомные перестройки, ЧХ — число хромосом, ЭФК — эмбриональные фибробласты крысы.

Нормальные эмбриональные фибробласты крысы (ЭФК) способны пролиферировать *in vitro* не более 10—14 пассажей, а далее претерпевают старение и погибают. Ключевую роль в процессе старения играют сигнальный путь p53/p21/Waf1, осуществляющий остановку клеток в цикле, и mTOR-сигнальный каскад, который регулирует процессы старения, пролиферации, дифференцировки, роста клеток, аутофагии и др. (Guertin, Sabatini, 2007). Серин-треониновая киназа mTOR существует в виде двух белковых комплексов — mTORC1 и mTORC2. Комплекс mTORC1 осуществляет контроль над процессами транскрипции, синтезом белков и липидов, биогенезом рибосом, лизосом и аутофагией, а также уровнем энергии и размером клеток (Guertin, Sabatini, 2007; Зубова и др., 2012; Hung et al., 2012). Клеточными репрессорами mTORC1 служат комплекс белков туберозного склероза TSC1,2 (Huang, Manning, 2009; Way et al., 2009), а также нехватка в клетке аминокислот и ростовых факторов (Kim et al., 2003; Hsu et al., 2011). Специфическим и се-

лективным ингибитором комплекса mTORC1 является антибиотик рапамицин (Blagosklonny, 2006).

Ранее было показано, что рапамицин способен отменять процесс репликативного старения первичных эмбриональных фибробластов крысы и человека *in vitro*, в результате чего клетки приобретали способность длительно пролиферировать (Kolesnichenko et al., 2012; Pospelova et al., 2012). Полученные нами клетки линии Rara (Pospelova et al., 2013) сохраняли сигнальный путь p53/p21 и останавливались в свержочных точках клеточного цикла после действия повреждающих агентов и удаления ростовых факторов сыворотки, но демонстрировали экспрессию генов плюрипотентности *oct-4*, *sox-2* и *nanog* и повышенную активность теломеразного гена *tert*. По-видимому, способность клеток к безграничной пролиферации *in vitro* может быть связана с переходом клеток в состояние, подобное индуцированным плюрипотентным клеткам.

Иммортализованные клетки линии Rara имели на 17-м пассаже нормальное число хромосом (42) и одну

клональную структурную перестройку — перичентрическую инверсию в хромосоме 3 (Pospelova et al., 2013).

Показано, что при длительном культивировании около 10 % линий стволовых клеток (СК) человека приобретают хотя бы одно изменение кариотипа, причем наиболее часто наблюдается копирование целых хромосом, плеч хромосом или их районов (Weissbein et al., 2014, и др.). Более трети линий СК мыши также имеют нарушения числа или структуры хромосом. В клеточных линиях эмбриональных и индуцированных СК человека около 50 % перестроек приходится на определенные хромосомы кариотипа — X, 1, 12, 17 и 20. Наиболее часто наблюдается трисомия хромосом 8, 12 и 17, а также длинного плеча хромосомы 1 (Baker et al., 2016). В некоторых хромосомах (1, 12, 17 и 20) выявлены амплификации отдельных районов (1q21q32 и другие ее локусы; 12p13.31 — у 13 % линий; 20q11.21 — у 14.5 % линий) (Amps et al., 2011; Dekel-Naftali et al., 2012; Weissbein et al., 2014; Rebuzzini et al., 2015; Steichen et al., 2015). Эти ХП носят неслучайный характер и затрагивают районы, содержащие гены, способствующие поддержанию плюрипотентного состояния, адаптации клеток к условиям *in vitro* и селективному преимуществу. К ним относятся гены транскрипционных факторов — *nanog*, *sox-5*, ген-регулятор клеточного цикла *cctb2*, онкоген *Ki-ras*, антиапоптотические гены типа *bcl2l1*, а также ген *dnmt3b*, относящийся к классу генов плюрипотентности (см.: Полянская, 2014). Отмечено, что изменения в хромосомах, наблюдаемые на ранних пассажах культивирования, сохраняются и дополняются другими перестройками на более поздних пассажах.

Нами были получены по той же схеме эксперимента (Pospelova et al., 2013) из ЭФК новые линии Rara-1 и Rara-2 и проведены цитогенетический анализ и анализ фенотипических признаков этих клеток.

Задача настоящей работы — выяснить характер кариотипической изменчивости линий Rara в зависимости от длительности пассирования клеток *in vitro* после отмены репликативного старения с помощью рапамицина. Кроме того, в работе анализировали корреляцию признаков трансформированного фенотипа и маркера генетической нестабильности (фокусы γ H2X и p53BP) с частотой кариотипических изменений.

Материал и методика

Клеточные культуры. ЭФК, полученные из эмбрионов от одной крысы, культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (HyClone, США) и 0.1 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия), на чашках Петри в количестве $4 \cdot 10^3/\text{см}^2$ при 37 °С и 5 % CO₂. Рапамицин (Calbiochem, Германия) добавляли в культуральную среду в концентрации 200 нМ на 7-м пассаже и поддерживали эту концентрацию до 11-го пассажа в случае линии Rara-1 и до 10-го пассажа для линии Rara-2. Рапамицин в концентрации 200 нМ ингибирует mTORC1, но не полностью подавляет пролиферацию клеток. После 10-го и 11-го пассажей культивирования в присутствии рапамицина ингибитор удаляли из культуральной среды и переводили клетки в чистую среду.

Цитогенетический анализ проводили по мере культивирования. Клетки линии Rara-1 анализировали на 14, 22 и 42-м пассажах, Rara-2 — на 12, 22, 30 и

46-м пассажах. Для получения метафазных пластинок в культуру клеток вводили колхицин в конечной концентрации 0.06 мкг/мл. Гипотоническую обработку проводили 0.55%-ным раствором KCl в течение 10—20 мин при 37 °С. Суспензию клеток фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 1 ч, меняя фиксатор трижды через 15 мин. Клетки наносили на сухие стекла над водяной баней при 50—53 °С и оставляли препараты до полного высыхания.

Анализ кариотипа клеток. Использовали метод GTG-окрашивания хромосом (Ozkinay, Mitelman, 1979). Число хромосом (ЧХ) считали в 100 клетках, исследовали не менее 10 метафазных пластинок в каждой клеточной популяции, долю полиплоидных клеток определяли среди 500 или 1000 митотических клеток. В линии Rara-1 модальное число хромосом (МЧХ) на 14-м пассаже сосчитать было трудно из-за большого числа метафазных пластинок с неполным числом хромосом. Идентифицировали хромосомы согласно номенклатуре GTG-окрашенных метафазных хромосом *Rattus norvegicus* (Sato et al., 1989). Описание кариотипа производили в соответствии с Интернациональной системой номенклатуры цитогенетики человека (Shaffer et al., 2009).

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки высевали на стекла и культивировали в течение 24—48 ч, затем промывали PBS и фиксировали 3%-ным раствором формальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Пермеабиллизацию клеточных мембран проводили 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в течение 20 мин, затем препараты блокировали в растворе 3%-ным BSA в буфере PBS-T в течение 1.5 ч. Далее препараты инкубировали с антителами к белкам маркерам плюрипотентности Oct3/4 и Nanog (Santa Cruz, США) и к маркерам двухнитевых разрывов ДНК — γ H2AX (Millipore, США) и p53BP1 (Abcam, США) в 3%-ном растворе BSA в буфере PBS-T в течение ночи при 4 °С. После отмывания препараты инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами — козьими антикроличьими и козьими антимышиными, несущими флуоресцентные метки Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 (Invitrogen, США) соответственно. Для визуализации ядер препараты окрашивали флуоресцентным красителем DAPI. Анализ изображений проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Германия). В качестве контроля использовали ЭФК на 6-м пассаже, мышинные эмбриональные стволовые клетки JOURD2 и минимально трансформированную линию ЭФК REF52.

Оценка жизнеспособности клеток. Использовали тест с МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Клетки высевали на 24-луночный планшет в количестве 10^4 на лунку. На следующий день в культуральную среду добавляли адриамицин (0.1 мкг/мл) либо среду с 10 % сыворотки заменяли на среду, содержащую 0.5 % сыворотки. Через 48 ч среду заменяли на раствор PBS, содержащий 0.5 мг/мл МТТ (Sigma-Aldrich, США), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Затем среду заменяли на DMSO и инкубировали 30 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм на приборе Multiskan EX Thermo.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла и время удвоения клеточных популяций. Использовали проточную цитометрию. Для этого клетки снимали с поверхности чашки Петри смесью 0.25%-ного трипсина с ЭДТА в соотно-

Число хромосом и численные перестройки хромосом в клетках линий Рапа

Линия (пассаж)	МЧХ, %	ВЧХ и доля клеток с ЧХ $\geq 10\%$	Доля полиплоидных клеток, %	Копирование нормальных хромосом (+)
Рапа-1 (14)	Нет	37—47 42 (28) ^a	4n (37)	+7
Рапа-1 (21)	45	40—45 43 (22)	4n (24) $\geq 4n$ (3)	+3
Рапа-1 (41)	52	40—44 41 (13) 44 (22)	4n (4)	+4 +1, +4
Рапа-2 (22)		41—43	4n (40)	
Рапа-2 (30)	40	40—44 43 (30)	4n (9.5) $\geq 4n$ (0.5)	+3
Рапа-2 (46)	47	40—45 41 (24) 43 (13)	4n (8.1)	Нет

Примечание. ВЧХ — вариабельность числа хромосом; ^a процентная доля клеток с ЧХ $\geq 10\%$ указана в скобках.

шении 1 : 1, промывали раствором PBS, после чего пермеабилizировали в течение 30 мин в 0.01%-ном растворе сапонина. Далее 10^5 клеток инкубировали в растворе иодистого пропидия (40 мкг/мл) и 0.1 мкг/мл РНКазы А (Sigma, США) в течение 15 мин при 37 °С. Распределение клеток по циклу анализировали на цитофлуориметре (Brucker, Франция). Для определения времени удвоения популяции клетки высаживали в количестве 10^5 на 1 лунку 24-луночного планшета и считали число клеток в течение 5 сут; эксперимент повторяли трижды. Время удвоения рассчитывали по формуле $t = \log_2 2 \cdot T / \log_2 (N/n)$, где T — время, ч, в течение которого проводили эксперимент, n — число клеток в начале эксперимента, N — число клеток в конце эксперимента.

Анализ клоногенной способности проводили путем подсчета через 12 сут числа клонов, выросших после посева 200 клеток на чашку Петри диаметром 30 мм. Клетки окрашивали в растворе кристалл-виолета (10 % уксусной кислоты, 30 % этилового спирта и 0.4 % кристалл-виолета) и считали число клонов под микроскопом. Эксперимент повторяли трижды.

Иммуноблоттинг использовали для оценки активности киназы mTOR по уровню фосфорилирования прямой мишени mTORC1 фактора 4E-BP1. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем 1 % Igepal, 0.5 % дексихолата натрия, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, 60 mM NaF, коктейль протеазных и фосфатазных ингибиторов в присутствии ванадата натрия. Белок в пробах измеряли по методу Бредфорда и разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле. После разделения проводили мокрый перенос на мембрану PVDF. Неспецифическое связывание антител блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в PBS-T в течение 1 ч, после чего инкубировали с первичными антителами к p4E-BP1 (Thr 37/46) или GAPDH (Cell Signaling, США) в растворе 3%-ного BSA, растворенного в буфере PBS-T, в течение 12 ч при 4 °С. Визуализацию проводили после инкубации со вторичными козьими антикочными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, методом ECL.

Статистическая обработка данных. Использовали *t*-критерий Стьюдента и программу Microsoft Excel 2016. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты

Кариотип клеточных линий Рапа-1 и Рапа-2 исследован при длительном культивировании на разных пассажах, после удаления из среды культивирования рапамицина. Показано, что при первичном анализе (14-й и 21-й пассажи) полиплоидные клетки составляли значительную часть клеточной популяции обеих линий (табл. 1). Кариотип диплоидных клеток Рапа-2 имел нормальное МЧХ (42) в отличие от диплоидной популяции клеток Рапа-1, у которых МЧХ не выявили, а число хромосом варьировало.

Показано, что в обеих линиях Рапа модальный кариотип был псевдодиплоидным и содержал 1—3 хромосомы с измененной структурой при диплоидном числе хромосом (табл. 2). На более поздних пассажах увеличилась гетерогенность по числу хромосом и структурных перестроек хромосом (СПХ). Самой гетерогенной клеточной популяцией была линия Рапа-2: на 22-м пассаже в дипло-

идных клетках обнаружили два варианта кариотипа с одинаковым ЧХ ($2n = 42$). В первом варианте выявлены две структурно перестроенные хромосомы — der(4) и der(11), вероятно образовавшиеся в результате реципрокной транслокации t(4;11)(q44;q21.2). Кроме того, во всех кариотипированных клетках наблюдали делецию короткого плеча хромосомы 17 — del(17) (рис. 1, I). Во втором варианте кариотипа выявлены те же перестройки, только der(4) присутствовал в двух копиях и при этом исчезал нормальный гомолог хромосомы 4. В кариотипе клеток с измененным ЧХ (41 или 43) наблюдали моносомию или трисомию других нормальных хромосом, но эти изменения имели неклональный характер. В то же время на 12-м пассаже клетки с транслокацией t(4;11)(q44;q21.2) составляли всего 4 %, остальные клетки имели нормальный кариотип.

На 30-м пассаже появились новые численные и структурные изменения хромосом. Стало больше клеток с ЧХ 43 (30 %), доля полиплоидных клеток уменьшилась до 9.5 % (табл. 1). Выявлено несколько вариантов кариотипа (табл. 2): с двумя или тремя копиями деривата хромосомы 4, но без ее нормального гомолога; с дупликацией района 4q31-11qter в деривате хромосомы 4 (рис. 1, II); без транслокации t(4;11)(q44;q21.2) — 29 %. Клеток с нормальным ЧХ и одной копией der(4) не обнаружено.

На 46-м пассаже в кариотипе клеток линии Рапа-2 были отмечены новые изменения числа и структуры хромосом. МЧХ оставалось равным 42, но изменилась доля клеток с ЧХ 43 и 41 (табл. 1). Кроме того, обнаружены клетки без транслокации t(4;11)(q44;q21.2), но содержащие либо перестроенную хромосому 2, либо в совокупности с ней транслокацию t(6;14)(cen;q11.1) (рис. 1, III). Количество таких клеток больше, чем клеток с t(4;11) (табл. 2). Измененная хромосома 2 по рисунку G-дисков идентична перестроенной хромосоме 2 в линии Рапа-1 (рис. 2, II), вероятно это транслокация t(2;7)(q44;q22.3q34). На 46-м пассаже, в отличие от 12-го и 30-го пассажей, клеток с нормальным кариотипом не обнаружено. Скорее всего, в линии Рапа-2, перестройки

Таблица 2

Варианты кариотипа и структурные перестройки в линиях Рапа

Линия (пассажи)	СПХ, %	Копирование (+) или потери (-) районов хромосом	Варианты кариотипа в линиях Рапа
Рапа-1 (14)	t(2;7)(q44;q11.1)	+7q22.3-q34	42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1),+7; 42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34) 14.3 % 43,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1),+3,+7; 42,XX 9.4 %
Рапа-1 (21)	t(2;7)(q44;q22.3q34) (100) i(14)(qcen), (80)	+7q22.3-q34 -7q11.1-q22.3 -7q34-q36 +14cen-qter -14pter-cen	42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34), i(14)(qcen); 43,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34),+3, i(14)(qcen)
Рапа-1 (41)	t(2;7)(q44;q22.3q34) (100) i(14)(qcen) (60) t(4;4)(qcen;qcen) (10) t(6;14)(cen;q11.1) (14)	+7q22.3-q34 -7q11.1-q22.3 -7q34-q36 +14cen-qter -14pter-cen	42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34),i(14)(qcen); 42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34),+4,t(4;4)(qcen;qcen),i(14)(qcen); 41,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34), (6;14)(cen;q11.1),-14; 44,XX,+1,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34),+4,i(14)(qcen)
Рапа-2 (22)	t(4;11)(q44;q21.2) (100) del(17)(p14) в 10 клетках	-17pter-p14	42,XX,der(4)t(4;11)(q44;q21.2), der(11)t(4;11)(q44;q21.2),del(17)(p14)
Рапа-2 (30)	t(4;11)(q44;q21.2) dup(der4)(4q31;11qter) (5) del(17)(p14) в 5 из 10 клеток	-17pter-p14 +4cenq44 +4q31-q44 +11q21.2-qter	42,XX,der(4)t(4;11)(q44;q21.2)×2, der(11)t(4;11)(q44;q21.2),del(17)(p14); 43,XX,der(4)t(4;11)(q44;q21.2)×3, der(11)t(4;11)(q44;q21.2) 18 %; 42,XX,der(4)dup(der4)(4q31;11qter) t(4;11)(q44;q21.2),der(11)t(4;11)(q44;q21.2); 43,XX,+3 12 %; 42,XX 17 %
Рапа-2 (46)	t(4;11)(q44;q21.2) t(2;7)(q44;q22.3q34) t(6;14)(cen;14q11.1) del(17)(p14)	+4cen-q44 -17pter-p14 +11q21.2-qter	42,XX,der(4)t(4;11)(q44;11q21.2)×2, der(11)t(4;11)(q44;q21.2),del(17)(p14); 43,XX,der(4)t(4;11)(q44;q21.2)×3, der(11)t(4;11)(q44;q21.2);del(17)(p14); 42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q22.3q34); 41,XX,der(2)t(2;7)(q44;q22.3q34), der(6)t(6;14)(cen;q11.1),-14

хромосом 2, 6, 7 и 14 произошли в клетках с нормальным кариотипом между 30-м и 46-м пассажирами.

В линии Рапа-1 на 14-м пассажире большая часть клеток с ЧХ, равным 42, имела три копии хромосомы 7 — два нормальных гомолога и гомолог, который участвовал в транслокации t(2;7)(q44;q11.1) (рис. 2, I). На 21-м пассажире клетки с ЧХ 42 представляли модальный класс, клетки с ЧХ 43 составляли 20 % (табл. 1). В большей части клеток в деривате хромосомы 2 утратилась большая часть хромосомы 7 (табл. 2), при этом сохранился район 7q22.3-q34, который, по-видимому, перестроен (рис. 2, II), сохранились также два нормальных гомолога хромосомы 7. Обнаружена новая клональная структурная перестройка хромосомы 14 — i(14)(qcen), в результате чего копируется ее длинное плечо (табл. 2).

На 41-м пассажире линии Рапа-1 МЧХ осталось 42, однако увеличилось количество клеток с ЧХ 44 за счет трисомии хромосом 1 и 4 (табл. 1). Кроме того, наряду с транслокацией t(2;7)(q44;q22.3q34), которая выявлена во всех исследованных клетках, а также i(14)(qcen) обнаружены две новые СПХ. В кариотипе клеток обеих линий выявлены потери и копирование отдельных локусов хромосом, что часто наблюдается в опухолевых клетках (табл. 2).

Таким образом, к 40-м пассажирам в популяциях клеток линий Рапа доля полиплоидных клеток уменьшилась в несколько раз, а популяция диплоидных клеток с ЧХ 42 приблизилась к 50 %. На более поздних пассажирах в обеих линиях сохранились клональные СПХ, обнаруженные ранее, которые претерпели дополнительные структурные изменения. В то же время в обеих линиях появились новые СПХ. В линии Рапа-2 количество клеток с новой перестройкой типа t(2;7)(q44;q22.3q34) стало преобладающим в популяции. Эти данные свидетельствуют об усилении процесса кариотипической нестабильности клеток линий Рапа в процессе пассирования *in vitro*.

Полученные нами иммортализованные линии после культивирования в присутствии рапамицина показали более высокую по сравнению с ЭФК пролиферативную активность при длительном культивировании. Однако можно отметить значительно более высокий пролиферативный потенциал у Рапа-2: время удвоения популяции — 18.2, а у Рапа-1 — 26.9 ч (рис. 3, б). Это согласуется с результатами, полученными методом проточной цитофлуориметрии: доля клеток, находящихся в фазе S, для Рапа-1 составила 28.07, в то время как для Рапа-2 — 59.39 % (рис. 3, в). Способность пролиферировать в клональном посеве (признак, характерный для трансформированных

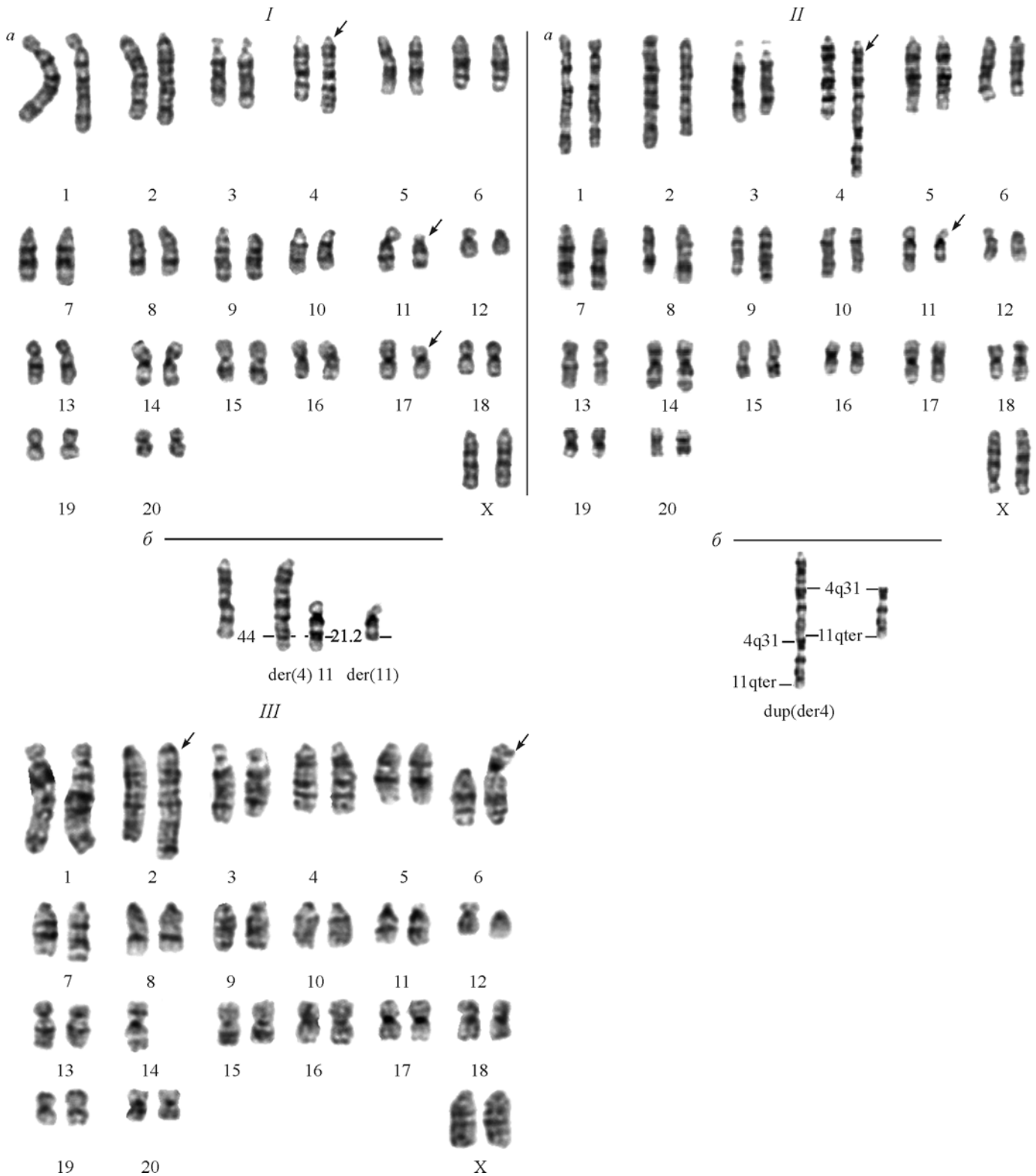


Рис. 1. Кариотип диплоидной клетки линии Rara-2 на 22 (I), 30 и (II) и 46-м (III) пассажах со структурно перестроенными хромосомами (стрелки). G-окрашивание.

I: 42,XX,der(4)t(4;11)(q44;q21.2),der(11)t(4;11)(q44;q21.2),del(17)(p14); II: 42,XX,der(4)dup(der4)(4q31;11qter)t(4;11)(q44;q21.2),der(11)t(4;11)(q44;q21.2); III: 41,XX,der(2)t(2;7)(q44;q22.3q34),der(6)t(6,14)(cen;q11.1),-14. a — кариограмма клетки; б (I, II) — происхождение структурно перестроенных хромосом der(4), der(11) и dup(der4); цифры рядом — локусы хромосом 4 и 11 с точками разрыва (I) или дублированно-го района der(4) (II).

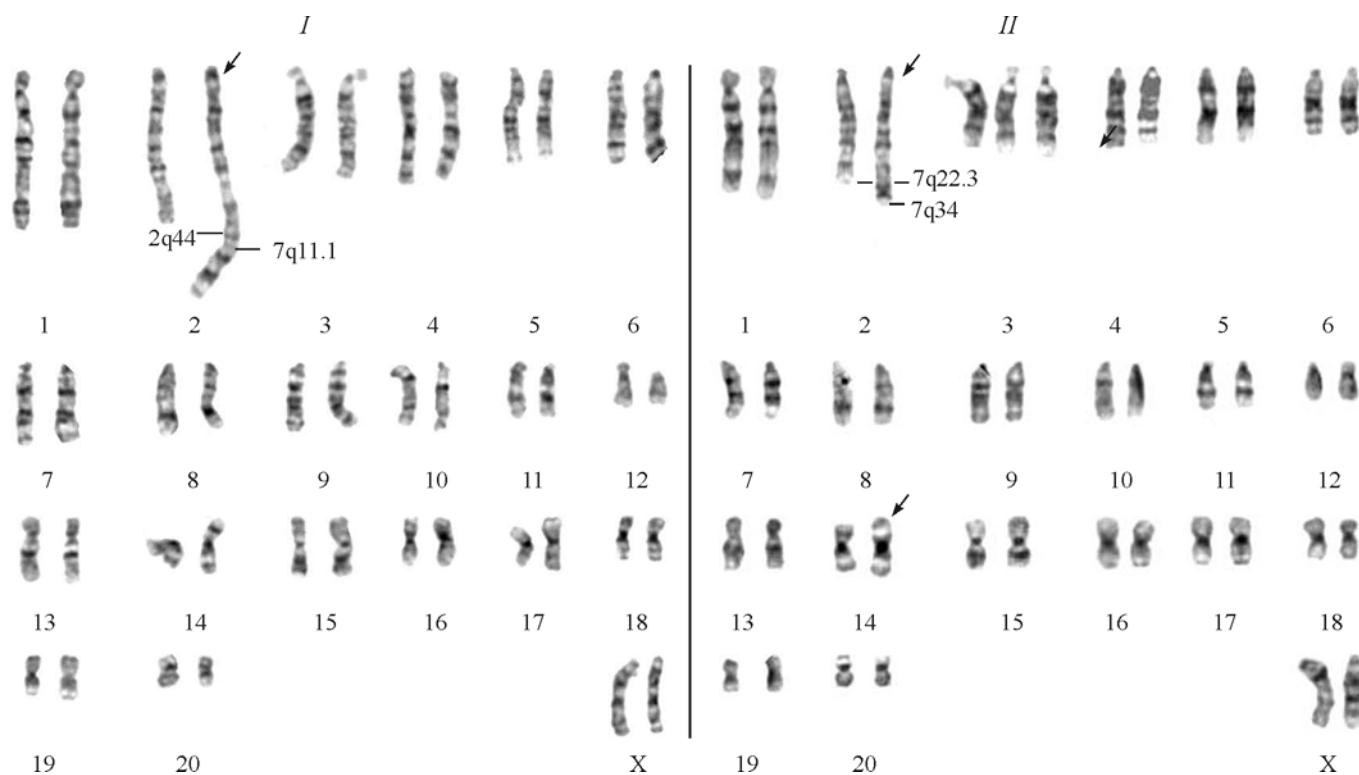


Рис. 2. Кариотип диплоидной клетки линии Rara-1 на 14-м (I) и 21-м (II) пассажах со структурно перестроенными хромосомами (стрелки). G-окрашивание.

I: 42,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1),+7; II: 43,XX,der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34),+3,i(14q). Цифры у перестроенных хромосом — локусы хромосом 2 и 7 с точками разрыва (I) и локусы оставшейся части хромосомы 7 с точками разрыва (II).

клеток) демонстрируют около 95 % клеток популяции Rara-2 и только 68 % клеток Rara-1 (рис. 3, а). Полученные нами клеточные линии имели также пониженную способность к контактному ингибированию пролиферации после достижения монослоя. Насыщающая плотность для Rara-1 и Rara-2 составила $(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^5$ и $(7.7 \pm 0.5) \cdot 10^5$ кл./см² соответственно, что характеризует их как трансформированные линии. Клетки Rara-1 практически утратили способность к остановке в сверхочных точках клеточного цикла как в отсутствие ростовых факторов, так и при действии цитостатика адриамицина (рис. 3, в). Клетки линии Rara-2 имели большую зависимость от присутствия ростовых факторов: через 48 ч культивирования в среде с 0.5 % сыворотки доля клеток в фазе S снижалась в 2 раза, а после действия адриамицина у них появлялся блок на границе фаз G₂/M. Утрата сверхочной точки G₁/S в отсутствие ростовых факторов, а также после действия ДНК-повреждающих агентов является характерной чертой процесса трансформации клеточных линий. Согласно данным МТТ-теста, жизнеспособность обеих клеточных линий снижалась в отсутствие эмбриональной сыворотки и при действии интеркалятора адриамицина (рис. 3, з).

Как было показано ранее, рапамицин подавляет активность mTOR-киназы, что приводит к подавлению фосфорилирования его прямой мишени — фактора 4E-BP1. В фибробластах мыши это сопровождается ингибированием белкового синтеза и клеточной пролиферации, которое связано с подавлением трансляции mРНК и белков, участвующих в регуляции клеточного цикла (Dowling et al., 2010). В полученных нами линиях Rara

уровень p4E-BP1 (Thr 37/46) после длительного срока культивирования был ниже, чем в исходных ЭФК (рис. 4).

Показано, что трансформированные клетки, так же как и стволовые, могут экспрессировать маркеры плюрипотентности, в том числе факторы Nanog и Oct3/4 (Barr et al., 2013). В полученных нами линиях, как и в минимально трансформированных крысиных клетках REF-52, экспрессия плюрипотентных маркеров выявлена в цитоплазме, причем в линии Rara-2 она выражена наиболее ярко. В стволовых клетках JOURD2 оба фактора интенсивно экспрессируются в ядре (рис. 5), в то время как в эмбриональных клетках 6-го пассажа экспрессия обоих маркеров отсутствует.

Известно, что в основе высокой кариотипической изменчивости лежат двухцепочечные разрывы ДНК (ДРД), которые приводят к формированию транслокаций, делеций и других перестроек хромосом. Маркером ДРД служат фокусы γ H2AX и p53BP (Schultz et al., 2000). В ядрах клеток линий Rara-1 и Rara-2 наблюдаются многочисленные мелкие фокусы γ H2AX и p53BP, которые не образуют крупных локализуемых фокусов. В контрольных ЭФК, как и в клетках минимально трансформированной линии REF-52, наблюдаются крупные единичные фокусы γ H2AX и p53BP (рис. 6). Экспрессия гистона γ H2AX может свидетельствовать о наличии ДРД, а присутствие p53BP в этих фокусах свидетельствует о процессе репарации. В клетках линий, полученных после действия рапамицина, несовпадение фокусов γ H2AX и p53BP, по-видимому, является отражением неэффективности процесса репарации, которая может быть одной из при-

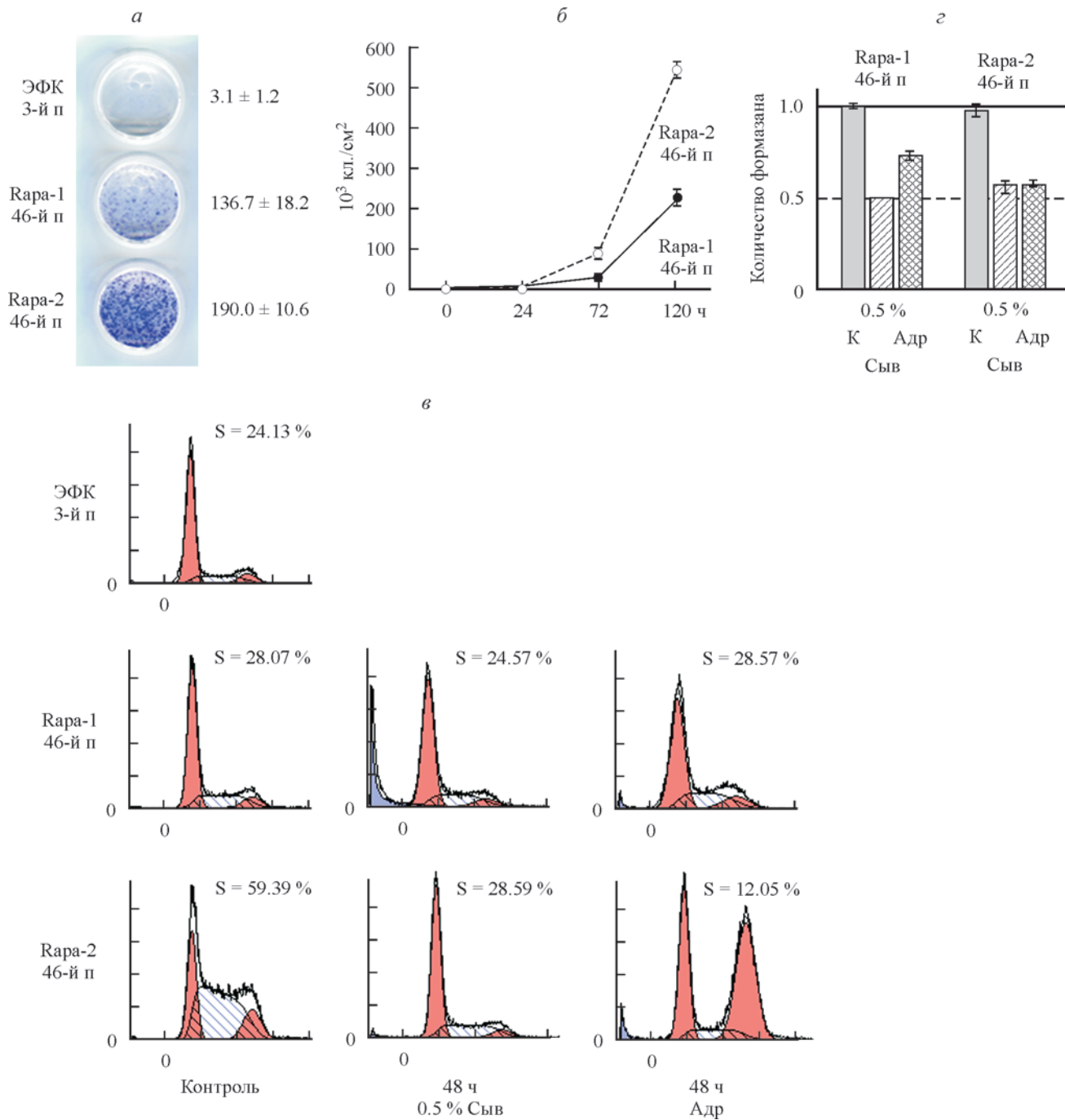


Рис. 3. Клоногенная выживаемость (а), пролиферативная активность (б), распределение по фазам клеточного цикла (в) и жизнеспособность в условиях низкого содержания сыворотки (0.5 % сыворотки) или после ДНК-повреждающего действия адриамицина (г) клеток линий Rara-1 и Rara-2.

а — число клонов спустя 12 сут после посева 200 клеток на чашку 20 мм: *слева* — клетки и номер пассажа (п), *справа* — среднее число клонов и стандартные ошибки, $n = 3$; б — кривые клеточного роста: указаны средние значения и стандартные ошибки среднего, $n = 3$; в, г — данные проточной цитометрии и жизнеспособность клеток по данным МТТ-теста соответственно через 48 ч культивирования в условиях низкого содержания сыворотки (Сыв) или в присутствии 0.1 мкг/мл адриамицина (Адр) по сравнению с контрольными ЭФК, указаны средние значения и стандартные ошибки среднего, $n = 3$.

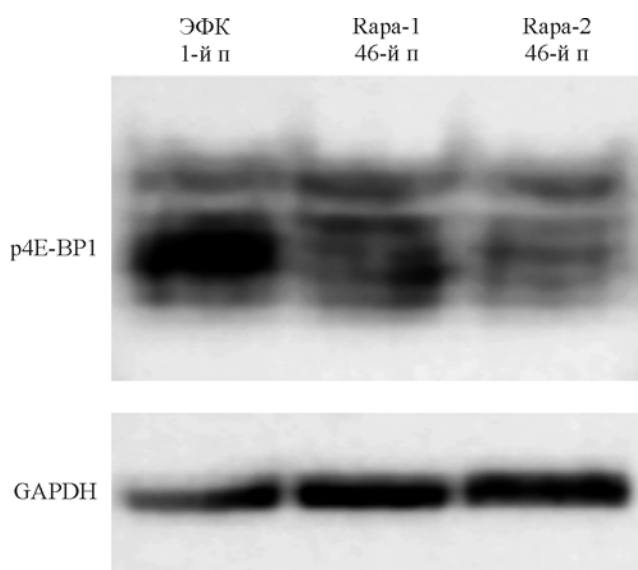


Рис. 4. Фосфорилирование мишени комплекса mTORC1 белка 4E-BP1 в ЭФК 1-го пассажа (1-й п) и в клетках линий Рапа на 46-м пассаже (46-й п).

В качестве контроля нагрузки использовали GAPDH.

чин кариотипической нестабильности. Таким образом, на поздних пассажах линии, полученные с помощью рапамицина, характеризуются высоким пролиферативным потенциалом и рядом признаков, характерных для трансформированного фенотипа.

Обсуждение

Репликативное старение, как и RAS-индуцированное, характеризуется общим набором связанных со старением маркеров: гипертрофией клеточного размера, секрецией цитокинов, активацией активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -gal) и повышенной

экспрессией опухоле-супрессорных белков p53 и p21/Waf1 (Shay et al., 1991; Dimri et al., 1995; Deng et al., 2004). Существуют механизмы, которые могут задерживать или отменять клеточное старение. К их числу относится истощение белков, стимулирующих старение, таких как опухоле-супрессорные белки p53 или pRB, которые отменяют как репликативное, так и вызванное онкогеном RAS старение (Beausejour et al., 2003). Введение белка hTERT и его повышенная экспрессия в клетках, находящихся в процессе репликативного старения, приводят к реверсии процесса старения и иммортализации (Bodnar et al., 1998). Кроме того, показано, что старение, вызванное ДНК-повреждающими агентами, может задерживаться ингибиторами mTOR, что свидетельствует в пользу вовлечения TOR-киназы в регуляцию процесса старения (Demidenko et al., 2009).

Подавление mTOR рапамицином в клетках HeLa приводило к нарушению соотношения ядерных белков, вовлеченных в трансляцию и модификацию РНК, при этом мишенями рапамицина являлись ядерные белки, участвующие в ответе на повреждение ДНК (ОПД): повышалась активность АТМ-киназы и менялось соотношение между содержанием p53BP1 в ядре и цитоплазме (Bandhakavi et al., 2010). На модели дрожжей показано (Matsui et al., 2013), что подавление активности mTOR с помощью рапамицина препятствует развитию ОПД. Рапамицин подавляет фосфорилирование Rad53, отвечающего за репарацию, и способствует выходу из G₁-блока, что сокращает время, отведенное на репарационные процессы. В то же время существуют и противоположные данные, свидетельствующие о том, что, останавливая клеточный цикл в фазе G₁, рапамицин может способствовать репарации (Shen et al., 2007).

Согласно данным из литературы, экспрессия плюрипотентных факторов Oct4 и Nanog наблюдается во многих трансформированных линиях и клетках первичных опухолей как в ядре, так и в цитоплазме. Ядерную локализацию плюрипотентных факторов связывают с опухолевыми стволовыми клетками, что подтверждается корреляцией между злокачественностью опухоли и ядерной

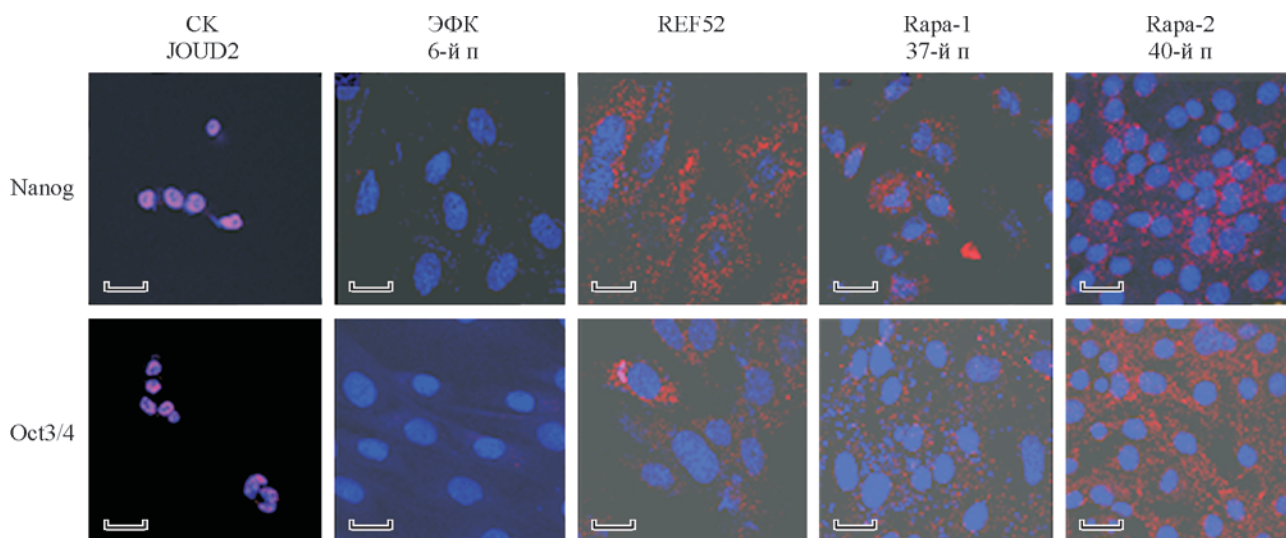


Рис. 5. Маркеры плюрипотентности Nanog и Oct3/4 в иммортализованных клетках линий Рапа по данным иммунофлуоресцентного анализа.

В качестве контроля использованы ЭФК, мышинные стволовые клетки JOUND2 и минимально трансформированные ЭФК (линия REF52). Ядра визуализированы DAPI.

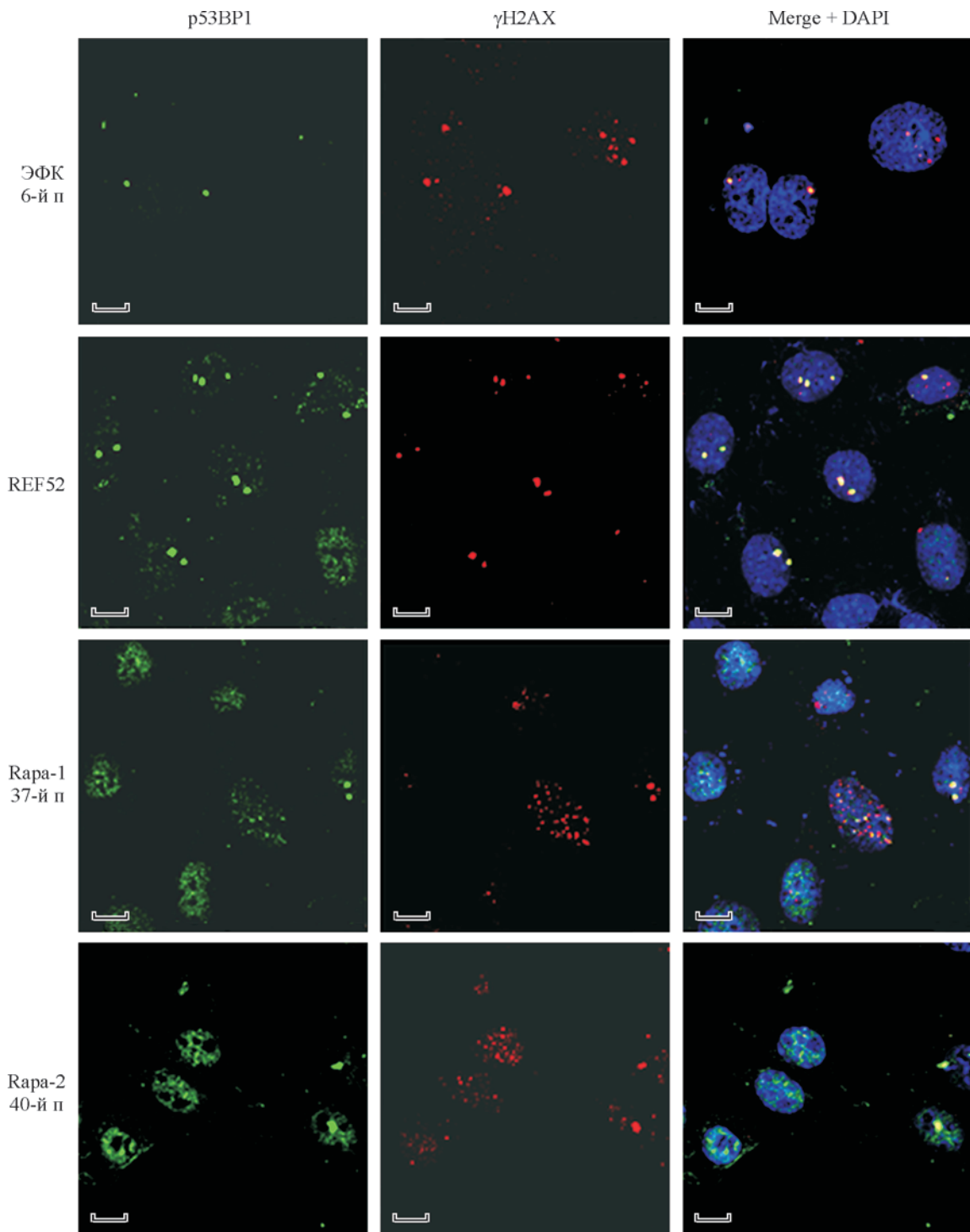


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ двухнитевых разрывов ДНК в ядрах клеток линий Rara с использованием антител к гистону γ H2AX (красный) и фосфатазе p53BP1 (зеленый).

Для визуализации ядер использовали краситель DAPI.

локализацией факторов плюрипотентности (Guo et al., 2011). В то же время причины появления и роль маркеров плюрипотентности в цитоплазме пока неясны.

При спонтанной иммортализации *in vitro*, как и при иммортализации клеток крысы различного гистогенеза с помощью вирусных или клеточных онкогенов, на ранних пассажах сохранялся нормальный диплоидный кариотип или минимально измененный (Pories et al., 1992; Foudah

et al., 2009). Изменения были связаны главным образом с копированием хромосом, преимущественно 4, 7, 11, 19 и 20, или же с появлением одной или двух структурно перестроенных хромосом. В основном повреждаются хромосомы 7 и 9 или различные локусы хромосомы 1 — q37, q43 и другие локусы. На поздних пассажах во многих линиях усиливается генетическая нестабильность в результате появления в кариотипе клеток новых СПХ и копи-

Таблица 3

Гены, локализованные в точках разрыва хромосом

Локус хромосомы	Ген	Полное название гена
2q44	<i>Bcl 10</i>	B-cell, CLL/lymphoma 10
	<i>Cyr 61</i>	Cystein-rich angiogenic inducer
	<i>Dapp1</i>	Dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositids 1
	<i>Ddit 41</i>	DNA-damage-inducible transcript 4-like
	<i>Eif4e</i>	Eucaryotic translation initiation factor 4e (вовлечен в mTOR-сигнальный путь)
4q44	<i>Ki-ras</i>	Proto-oncogene
	<i>Casc1</i>	Cancer susceptibility, candidate 1
7q11 ^a	<i>Cdk 2</i>	Cyclin-dependent kinase 2
	<i>Eef 2</i>	Eukaryotic translation elongation factor 2e
	<i>Map2k2</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 2
	<i>Stk 11</i>	Serine-threonine kinase 11
11q21	<i>Atg3</i>	Autophagy related gene 3
	<i>Arhgap 31</i>	Rho GTPase activating protein 31
	<i>Cbl</i>	Proto-oncogene B

Примечание. Сокращенные и полные названия генов даны по базе данных генома крысы (Rat genome database).
^aВсе гены локуса вовлекаются в mTOR-сигнальный путь.

рования определенных районов хромосом — 6q12-q32, 9q13-qter, 7q22.1-qter и других районов (Brett et al., 1986; Funaki et al., 1991; Godwin et al., 1992; Kato et al., 1992; Foudach et al., 2009; Ярцева, Федорцева, 2014).

Важно отметить, что кариотип клеток Rara-2 на 12-м пассаже не отличался от нормального, как и клетки ранее полученной линии Rara (Pospelova et al., 2013), которые имели минимально измененный кариотип. На 5-м и 17-м пассажах в этих клетках обнаружена перичентрическая инверсия хромосомы 3, затрагивающая локус p12, часть которого вследствие инверсии переместилась к локусу q12. Этот локус содержит ген *Scai*, кодирующий белок супрессор инвазии раковых клеток, а локус p12 — кластер рибосомных генов, которые активно экспрессируются, а также ген *Lame3*, кодирующий субъединицу ламина. При этом клетки могли длительно пролиферировать *in vitro*, сохраняли контрольные точки клеточного цикла и функциональный сигнальный путь p53/p21, т. е. они фактически не являлись трансформированными (Pospelova et al., 2013). Возможно, одна из причин сохранения минимально измененного кариотипа и отсутствия в этой линии признаков трансформации связана с перестройкой хромосомы 3, затрагивающей гены *Scai* и кластеры рибосомных генов, которые блокируют процесс нестабильности и сохраняют, несмотря на длительное пассирование *in vitro*, минимально измененный кариотип.

Наиболее критическими поражениями ДНК, вызываемыми в клетках разными воздействиями, включая ионизирующее излучение, являются ДРД. Принято считать, что именно ДРД индуцируют различные программы клеточного ответа на повреждение, включая клеточное старение (Osipov et al., 2013; Mladenov et al., 2016). Большая часть индуцированных ионизирующим излучением ДРД подвергается репарации относительно быстрым, но неточным и подверженным ошибкам методом негомологического соединения концов (end-joining: NHEJ), что может приводить к образованию микроделций и хромосомных перестроек (Jeggo, Löbrich, 2006; Kakarougkas et al., 2014). Неточно репарированные ДРД могут приводить к гибели клеток, инактивации тумор-супрессорных генов

и активации онкогенов (Halazonetis et al., 2008; Marnef, Legube, 2017). Накопление ХП вследствие неправильного восстановления ДРД играет важную роль в становлении опухолевого фенотипа. Имеющиеся в клетке ДРД инициируют комплекс событий, приводящих к активации ОПД, остановке клеток в контрольных точках и собственно восстановлению ДНК. Начальные шаги ОПД включают в себя активацию киназ семейства PI3K — ATM, ATR и ДНК-ПК — с последующим фосфорилированием и активацией множественных нижележащих мишеней, среди которых главными являются гистон γ H2AX и белок p53BP1 (Wang et al., 2005; Kotenko et al., 2013; DeLoughery et al., 2015). Основные механизмы, лежащие в основе формирования фокусов γ H2AX/p53BP1, связаны с правильным привлечением в места повреждений соответствующих киназ, которые эти белки фосфорилируют, а затем идет собственно репарация и репликация участков, которые были повреждены.

В клетках Rara с высокой кариотипической нестабильностью мы не обнаружили фокусов совпадения γ H2AX с белком p53BP1, что говорит о дефектном процессе репарации спонтанных повреждений в линиях, полученных путем отмены процесса репликативного старения с помощью рапамицина. В этих клеточных линиях были выявлены различия по частоте образования фокусов γ H2AX с белком p53BP1, которые используются для оценки частоты ДРД и генетической нестабильности (Redon et al., 2011).

Известно, что генетическая нестабильность относится к числу признаков, которые лежат в основе формирования трансформированного фенотипа (Coleman, Tsongalis, 2006; Raptis, Varat, 2006; Janssen, Medema, 2013). Трансформированные и опухолевые клетки характеризуются наличием и накоплением хромосомных перестроек, при этом структура и экспрессия генов, которые содержатся в точках разрывов хромосом, подвергаются изменениям (Mitelman, 2000; Mitelman et al., 2007). Часто новые СПХ в опухолевых клетках происходят в уже перестроенных хромосомах и затрагивают районы с онкогенами или генами, регулирующими пролиферацию клеток.

Так, в клетках миелоидной лейкемии человека K-562 копируется фрагмент перестроенной хромосомы der(22)t(9;13;22), содержащий онкоген — гибридный ген *bcr/abl1* (Gribbl et al., 2000).

Согласно нашим данным, в линии Rara-1 на 21-м пассаже в перестроенной хромосоме — der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34) — утрачена большая часть хромосомы 7, в том числе район 7q11. Известно, что в районе 7q11, согласно базе данных RGD (rat genome database; <http://rgd.mcw.edu>), картированы гены, вовлеченные в mTOR-сигнальный путь (табл. 3). В то же время локус q33, который содержит протоонкоген *c-myc*, сохраняется и существует в трех копиях, поскольку остаются две нормальные копии хромосомы 7. Увеличение копий протоонкогена *c-myc* может способствовать прогрессии клеточной пролиферации. В локусе 2q44 выявлен ген *Eif4e* (eucariotic translation initiation factor 4e), который также вовлекается в mTOR-сигнальный путь (табл. 3).

В линии Rara-2 на 30-м пассаже обнаружены клетки с двумя или с тремя копиями деривата хромосомы 4 — der(4)t(4;11)(q44;11q21.2) — либо с дубликацией части, содержащей перестроенный район, в результате локус q44, содержащий антиапоптотический протоонкоген *Ki-ras* (табл. 3), копируется. В спонтанно трансформированной линии Fwa 3 (Ярцева, Федорцева, 2014) обнаружено также копирование района 4q42-qter, включающего в себя локус q44. Копирование локуса q44 с протоонкогеном *Ki-ras* в линиях Rara-2 и Fwa 3, по-видимому, неслучайно и имеет существенное значение для эволюции этих линий. Появление в линии Rara-2 на 46-м пассаже перестроенной хромосомы 2 — der(2)t(2;7)(q44;q11.1q22.3q34), возможно, способствовало увеличению пролиферативного потенциала клеток вследствие приобретения клетками третьей копии протоонкогена *c-myc*.

Таким образом, с помощью рапамицина из ЭФК можно получать иммортализованные клеточные линии с нормальным или минимально измененным кариотипом на ранних пассажах, которые можно использовать для генетических и молекулярных исследований. Однако длительное пассирование клеток *in vitro* приводит к накоплению генетических и кариотипических изменений в клетках, способствующих их дальнейшей трансформации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. 2012. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке. Цитология. 54 (8) : 589—602. (Zubova S. G., Shitikova Zh. V., Pospelova T. V. 2012. TOR-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. Tsitologiya. 54 (8) : 589—602.)

Полянская Г. Г. 2014. Проблема нестабильности генома культивируемых стволовых клеток человека. Цитология. 56 (10) : 697—707. (Poljanskaya G. G. 2014. The problem of genomic instability of cultivated human stem cells. Tsitologiya. 56 (10) : 697—707.)

Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2014. Особенности изменений кариотипа клеток крысы в процессе их трансформации *in vitro*. Цитология. 56 (1) : 14—35. (Yartseva N. M., Fedortseva R. F. 2014. Features of rat cells karyotypic abnormalities in rat cells in their transformation *in vitro*. Tsitologiya. 56 (1) : 14—35.)

Amps K., Andrews P. W., Anyfantis G. 2011. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. Nat. Biotechnol. 29 : 1132—1144.

Baker D., Hirst A. J., Gokhale J., Juarez M. A., Williams S., Wheeler M., Bean K., Allison T. F., Moore H. D., Andrews P. W., Barbaric I. 2016. Detecting genetic mosaicism in cultures of human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports. 7 : 998—1012.

Bandhakavi S., Kim Y. M., Ro S. H., Xie H., Onsongo G., Jun C. B., Kim D. H., Griffin T. J. 2010. Quantitative nuclear proteomics identifies mTOR regulation of DNA damage response. Mol. Cell Proteomics. 9 : 403—414.

Barr M. P., Gray S. G., Hoffmann A. C., Ralf A., Hilger R. A., O'Flaherty T. J. D., Fennell D. A., Richard D., O'Leary J. J., O'Byrne K. J. 2013. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. PLoS ONE. 8 : e54193.

Beausejour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P., Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. EMBO J. 22 : 4212—4222.

Blagosklonny M. V. 2006. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. Cell Cycle. 18 : 2087—2102.

Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright S. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science. 279 : 349—352.

Brett J. G., Godman G. C., Miller D. F. 1986. Phenotypic and karyotypic transition in the spontaneous transformation of a rat cell line. Tissue. Cell. 18 : 27—49.

Coleman W. B., Tsongalis G. J. 2006. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. EXS. 96 : 321—349.

Dekel-Naftali M., Aviram-Goldring A., Litmanovitch T., Shmash J., Reznik-Wolf H., Laevsky I., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Yung Y., Hourvitz A., Schiff E., Riesenstein S. 2012. Screening of human pluripotent stem cells using CGH and FISH reveals low-grade mosaic aneuploidy and a recurrent amplification of chromosome 1q. Eur. J. Hum. Genet. 20 : 1248—1255.

DeLoughery Z., Luczak M. W., Ortega-Atienza S., Zhitkovich A. 2015. DNA double-strand breaks by Cr (VI) are targeted to euchromatin and cause ATR-dependent phosphorylation of histone H2AX and its ubiquitination. Toxicol. Sci. 143 : 54—63.

Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Pospelova T. V., Blagosklonny M. V. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. Cell Cycle. 8 : 1888—1895.

Deng Q., Liao R., Wu B. L., Sun P. 2004. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. J. Biol. Chem. 279 : 1050—1059.

Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 9363—9367.

Dowling R. J. O., Topisirovic I., Alain T., Bidinosti M., Fonseca B. D., Petroulakis E., Wang X., Larsson O., Selvaraj A., Liu Y., Kozma S. C., Thomas G., Sonenberg N. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. Science. 328 : 2117—21176.

Foudah D., Redaelli S., Donzelli E., Bentivegna A., Miloso M., Dalpra L., Tredici G. 2009. Monitoring the genomic stability of *in vitro* cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. Chrom. Res. 17 : 1025—1039.

Funaki K., Everitt J., Bermudez E., Walker C. 1991. Trisomy of rat chromosome 1 associated with mesothelial cell transformation. Cancer Res. 51 : 4059—4066.

Godwin A. K., Testa J. R., Handel L. M., Liu Z., Vanderveer L. A., Tracey P. A., Hamelton T. C. 1992. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implication of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. J. Nat. Cancer Inst. 84 : 592—601.

- Gribbl S. M., Roberts I., Grace C., Andrews K. M., Green A. R., Nacheva E. P. 2000. Cytogenetics of the chronic myeloid leukaemia-derived cell line K-562: karyotype clarification by multicolour fluorescence *in situ* hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 118 : 1—8.
- Guertin D. A., Sabatini D. M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 12 : 9—22.
- Guo Y., Liu S., Wang P., Zhao S., Wang F., Bing L., Zhang Y., Ling E. A., Gao J., Hao A. 2011. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology.* 59 : 763—775.
- Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. 2008. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 319 : 1352—1355.
- Hsu P. P., Kang S. A., Rameseder J., Zhang Y., Ottina K. A., Lim D., Peterson T. R., Choi Y., Gray N. S., Yaffe M. B., Marto J. A., Sabatini D. M. 2011. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science.* 332 : 1317—1322.
- Huang J., Manning B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Transact.* 37 : 217—222.
- Hung C.-M., Garcia-Haro L., Sparks C. A., Guertin D. A. 2012. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harbor. Perspect. Biol.* 4 : 1—17.
- Janssen A., Medema R. H. 2013. Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene.* 32 : 4459—4470.
- Jeggo P. A., Löbrich M. 2006. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 122 : 124—127.
- 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.* 55 : 723—732.
- Kato H., Nishida J., Honda T., Miyamoto S., Fujinaga K., Wake N. 1992. Chromosome alterations contribute to neoplastic progression of transformed rat embryonal fibroblasts. *Cancer Genet. Cytogenet.* 58 : 39—47.
- Kim D. H., Sarbassov D. D., Ali S. M., Latek R. R., Guntur K. V., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D. M. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell.* 11 : 895—904.
- Kolesnichenko M., Hong L., Liao R., Vogt P. K., Sun P. 2012. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic RAS-induced senescence. *Cell Cycle.* 11 : 2391—2401.
- Kotenko K. V., Bushmanov A. Y., Ozerov I. V., Guryev D. V., Anchishkina N. A., Smetanina N. M., Arkhangelskaya E. Y., Vorobyeva N. Y., Osipov A. N. 2013. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates. *Int. J. Mol. Sci.* 14 : 13 719—13 726.
- Marnef A., Legube G. 2017. Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Curr. Opin. Cell Biol.* 46 : 1—8.
- Matsui A., Kamada Y., Matsuura A. 2013. The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS Genet.* 9 : e1003245.
- Mitelman F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat. Res.* 462, issues 2—3 : 247—253.
- Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev. Cancer.* 7 : 233—245.
- Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. 2016. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* 37—38 : 51—64.
- Osipov A., Buleeva G., Arkhangelskaya E., Klokov D. 2013. *In vivo* γ -irradiation low dose threshold for suppression of DNA double strand breaks below the spontaneous level in mouse blood and spleen cells. *Mutat. Res.* 756 : 141—145.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.
- Pories S., Jaros K., Steele G. Jr., Pauley A., Summerhayes I. C. 1992. Oncogene-mediated transformation of fetal rat colon *in vitro*. *Oncogene.* 7 : 885—893.
- Pospelova T. V., Bykova T. V., Zubova S. G., Katolikova N. V., Yartseva N. M., Pospelov V. A. 2013. Rapamycin induces pluripotent genes associated with avoidance of replicative senescence. *Cell Cycle.* 12 : 3841—3851.
- Pospelova T. V., Leontieva O. V., Bykova T. V., Zubova S. G., Pospelov V. A. 2012. Suppression replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle.* 11 : 2402—2407.
- Raptis S., Bapat B. 2006. Genetic instability in human tumors. *EXS.* 96 : 303—320.
- Rebuzzini P., Zuccotti M., Redi C. A., Garagna S. 2015. Chromosomal abnormalities in embryonic and somatic stem cells. *Cytogenet. Genome Res.* 147 : 1—9.
- Redon C. E., Nakamura A. J., Martin O. A., Parekh P. R., Weyemi U. S., Bonner W. M. 2011. Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double strand break biomarker. *Aging (Albany NY).* 3 : 168—174.
- Satoh H., Yoshida M. S., Sasaki M. 1989. Resolution chromosome banding in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 50 : 151—154.
- Schultz L. B., Chehab N. H., Halazonetis T. D. 2000. P53 binding protein 1 (53bp1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 151 : 1381—1390.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (Eds.). 2009. *ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature.* Basel: Karger. 138 p.
- Shay J. W., Pereira-Smith O. M., Wright W. E. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 196 : 33—39.
- Shen C., Lancaster C. S., Shi B., Guo H., Thimmaiah P., Bjornsti M. A. 2007. TOR signaling is a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 7007—7017.
- Steichen C., Maluenda J., Tosca L., Luce E., Pneau D., Dianat N., Hannoun Z., Tachdjian G., Melki J., Dubart-Kupperschmitt A. 2015. An atypical human induced pluripotent stem cell line with a complex stable and balanced genomic rearrangement including a large *de novo* 1q uniparental disomy. *Stem Cells Transl. Med.* 4 : 224—229.
- Wang H., Wang M., Wang H., Bocker W., Iliakis G. 2005. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell. Physiol.* 202 : 492—502.
- Way S. W., McKenna J., 3rd, Mietzsch U., Reith R. M., Wu H. C., Gambello M. J. 2009. Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18 : 1252—1265.
- Weissbein U., Benvenisty N., Ben-David U. 2014. Genome maintenance in pluripotent stem cells. *J. Cell Biol.* 204 : 153—163.

CHROMOSOMAL INSTABILITY AND EVOLUTION OF FEATURES OF TRANSFORMED
PHENOTYPE OF CELL LINES DERIVED FROM SENESCENT RAT EMBRYONAL FIBROBLASTS
BY RAPAMYCIN SELECTION

N. M. Yartseva,* T. V. Bykova, S. G. Zubova, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

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

The evolution of the karyotype of cell lines obtained by selection in the presence of rapamycin from rat embryonic fibroblasts (REF) has been studied. Rapamycin, an inhibitor of the mTOR kinase, prevents replicative aging of the REF cells that is initiated after 7—10 passages *in vitro*. Karyotype of the obtained cell lines undergoes an evolution upon their cultivation *in vitro*. On early passages, clonal structural rearrangements of chromosomes (SPX) are observed: trisomy of chromosome 7 and translocation t(2;7), or t(4;11). On late passages, chromosome rearrangements (CP) accumulate. Simultaneously, there are signs of a transformed phenotype: the ability to clonal growth, a decrease of contact inhibition and high proliferation rate in monolayer at saturating density. The evolution of the transformed phenotype is accompanied by the disappearance of the cell cycle checkpoints G₁/S and (or) G₂/M. Rapa lines are characterized by accumulation of γ H2AX and p53BP foci, which however do not colocalize, thus indicating accumulation of unrepaired double-strand DNA breaks (DSB). The Rapa lines are shown to express the markers of pluripotency Nanog and Oct3/4. The causes of genetic and karyotypic instability of Rapa lines during long-term cultivation are discussed.

Key words: rapamycin, replicative senescence, cell lines, karyotype, genetic instability
