

## БАЛАНС ДНК У ХРОМОСОМАХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ЛІНІЇ 4BL

Г.Р. АКОПЯН<sup>1,4</sup>, В.О. КУШНІРУК<sup>2</sup>, Д.О. МИКИТЕНКО<sup>3</sup>, Н.Л. ГУЛЕЮК<sup>1</sup>, Ю. КРЕМЕНСЬКА<sup>3</sup>, Л.Л. ЛУКАШ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут спадкової патології НАМН України, Львів

<sup>2</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

E-mail: kushniruk\_v\_o@ukr.net

<sup>3</sup> Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ

<sup>4</sup> Університет Жешовський, Польща

У попередніх цитогенетичних дослідженнях нової клітинної лінії людини 4BL на час досягнення 205-го пасажу охарактеризовано плідність хромосомного набору і деякі регулярні структурні перебудови. З метою вивчення природи регулярної моносомії окремих гомологічних пар застосовано методи *array CGH* і *FISH*. Структурні перебудови виявлено в усіх хромосомних парах, які відзначились моносомією за даними класичного цитогенетичного аналізу. Найбільшими виявились зміни у хромосомах 2, 4, 10, 13 і 17. Вірогідною причиною моносомії хромосомних пар 4, 10, 13 і 17 є масивна втрата генетичного матеріалу. Моносомія другої пари хромосом зумовлена суттєвою трансформацією одного з гомологів по типу множинних дуплікацій та утворення деривату *der(2)t(2;?) (q21;?)*. Завдяки застосуванню *array CGH* вдалося конкретизувати ділянки структурних перебудов у хромосомах 2, 4, 10, 13 і 17, що дозволяє провести більш точну ідентифікацію за допомогою багатоколірної *FISH*. Отримані результати підтверджують гіпотезу щодо скоординованого виникнення делецій і дуплікацій та їх стабілізуючого впливу на трансформовані хромосоми.

**Ключові слова:** лінія стовбурових клітин *in vitro*, структурні аберації хромосом, баланс ДНК, *FISH*, *array CGH*.

**Вступ.** Однією з основних проблем роботи з клітинними лініями є зміна вихідного каріотипу в процесі адаптації до умов культивування *in vitro*, джерелом якої є генетична нестабільність, що проявляється виникненням хромосомних аберацій, дестабілізацією мітотичного апарату та зміною плідності клітин [1–4]. Це вимагає постійного моніторингу клітинних ліній на предмет виникнення генетичних та епігенетичних змін, які оптимально виявляються при комплексному застосуванні цитогенетичних (диференційне забарвлення, *FISH*) та молекулярно-генетичних (*array CGH*, ПЛР) методів. Пос-

тійні клітинні лінії зазвичай мають досить великі, а часто й взагалі втрачені пасажі [5], тож для дослідження в динаміці на етапах становлення і стабілізації каріотипу клітин *in vitro* нами отримано нову клітинну лінію 4BL із периферійної крові здорового дорослого донора, що не піддавалася вірусній чи генній трансформації. Спочатку клітинну лінію 4BL вирощували у вигляді компактних клонів на фідері в середовищі, кондиціонованому ембріональними гермінативними клітинами і збагаченому цитокінами [6]. За час культивування у понад 220 пасажах (більше 8 років) не спостерігали видимих ознак старіння та кризи клітинної культури, що дає підстави вважати досліджувану лінію потенційно іморталізованою. Морфологію та ростові особливості клітинної лінії 4BL описано в роботі [7].

У попередніх цитогенетичних дослідженнях клітинної лінії 4BL на ранніх, середніх і пізніх пасажах [8, 9] спостерігали ознаки трансформації каріотипу, зумовлені адаптацією до умов культивування. Між 160-м і 205-м пасажами відбулися виразні зміни плідності каріотипу: зросла частка поліплоїдних клітин (з 2,8 до 36 %), практично зникли біягаплоїдні клітини (22,1 % на 160-му пасажі), зменшився відсоток метафазних пластинок (м.п.) з передчасним розділенням хроматид (з 5 до 1,5 %) [10].

При застосуванні GTG техніки диференційного забарвлення хромосом на 205-му пасажі підтверджено наявність єдиного незміненого гомолога із пари хромосом 1, 2, 4, 10, 11, 13, 15, 17, 21, а також регулярні структурні перебудови: *t(1;11)(q12;p15)* – 63 % м.п., *t(5;15)(q10;p10)* – 23 % м.п., *t(12;15)(p10;q10)* – 10 % м.п. та *t(16;21)(q12.1;p11.1)* – 5 % м.п. Регулярно виявляли сім маркерних хромосом, які могли містити генетичний матеріал хромосом, що були визначені як «відсутні» внаслідок моносомії чи

© Г.Р. АКОПЯН, В.О. КУШНІРУК, Д.О. МИКИТЕНКО, Н.Л. ГУЛЕЮК, Ю. КРЕМЕНСЬКА, Л.Л. ЛУКАШ, 2016

нулісомій [10]. Відповідно, метою роботи було дослідження особливостей каріотипу клітин лінії 4BL за допомогою агау CGH із поглибленим аналізом хромосом, за якими виявляли регулярну моносомію при диференційному забарвленні.

**Матеріали і методи.** Клітинна лінія 4BL отримана у 2006 р. із периферійної крові анонімного здорового дорослого донора при дотриманні вимог комісії з біоетики. Клітини культивували у поживному середовищі ДМЕМ з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти [11]. На 165-му пасажі клітини протягом доби піддавали дії стресу через культивування в середовищі з високою іонною силою. Протягом всього часу спостереження (понад 220 пасажів) лінія 4BL зберігала проліферативний потенціал та притаманні їй два морфологічних типи клітин – фібробластоподібні та епітеліоподібні.

Цитогенетичний аналіз проводили на 205-му пасажі. З цією метою фіксацію клітин здійснювали через 24 год після посіву клітин. Колхіцин («Merck», Німеччина) в концентрації 0,5 мкг/мл вводили на 2 год, після чого суспензію клітин обробляли 0,06 М розчином КСІ з експозицією 55 хв та метанол-оцтовим фіксатором у співвідношенні 3:1, виготовленим *ex tempore*. Після трьох змін фіксатора суспензію клітин розкапували на вологі предметні скельця без випалювання фіксатора, а в частині препаратів – з випалюванням фіксатора для отримання кращого розкиду хромосом [12, 13].

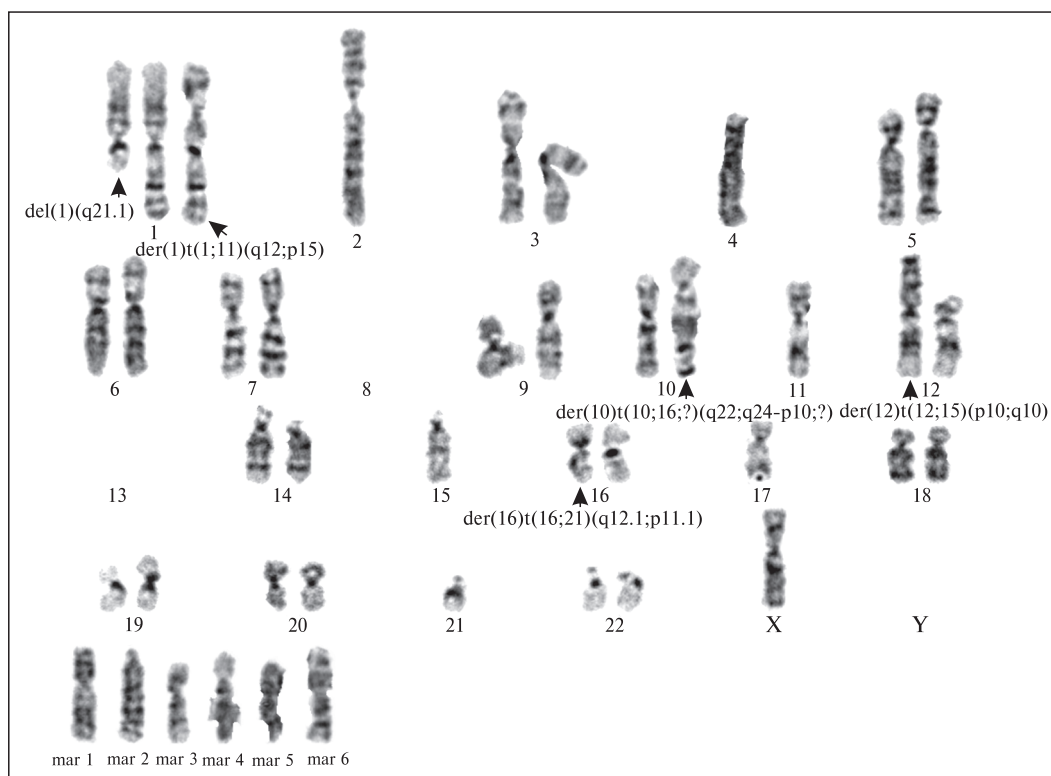
Препарати метафазних хромосом аналізували з використанням диференційного GTG-забарвлення за методом [14] у власній модифікації та техніки FISH «Cytocell OctoChrom» (Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ). Хромосоми аналізували за допомогою світлового мікроскопа «Olympus», обладнаного системою автоматизованого аналізу Cyto-Vision 4.01, при збільшенні у 1000 разів на рівні визначення 400–550 бендів на гаплоїдний набір. Аналізували 100 метафазних пластинок, в яких якість диференційного забарвлення дозволяла ідентифікувати хромосоми та їхні структурні перебудови. Для ідентифікації хромосомних аномалій застосовували міжнародну цитогенетичну номенклатуру ISCN-2013 [15].

Діагностику мікроструктурних хромосомних аномалій на основі оцінки балансу ДНК проводили методом порівняльної геномної гібридизації (array CGH) з використанням CytoSure Aneuploidy array 15k (Oxford Gene Technology, Product code 020024, Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ). ДНК виділяли з клітин 205-го пасажу, що не піддавались дії стресу, за допомогою QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, кат № 51106) та очищали QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, кат № 28104). Отриманий біологічний матеріал у кількості 1 мкг проаналізований відповідно до рекомендацій OxfordGeneTechnology на приладі Innopsys InnoScan 710, обладнаному програмним забезпеченням OGT CytoSure Interpret Software 3.3.2.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Асоціація моносомії з присутністю стабільних хромосомних аберацій у клітинній лінії 4BL за даними цитогенетичних досліджень. В культурі 4BL на 205-му пасажі досягнуто якості GTG-забарвлення, достатньої для диференціації хромосом за парами. При поглибленому аналізі 100 м.п. із біядиплоїдним каріотипом (39–44 хромосом) у 82 % виявлено хромосомні перебудови. Найчастіше хромосомні аномалії знаходили в клітинах із кількістю 43 хромосоми в наборі. Спільним для всіх проаналізованих клітин виявилися моносомія за хромосомою X, відсутність одного або двох гомологів з хромосомних пар 10 і 13, наявність єдиного незміненого гомолога хромосомних пар 1, 2, 4, 11, 15, 17 і 21, наявність типових транслокацій та семи маркерних хромосом.

Саме участь у транслокаціях виявилась вірогідною причиною реєстрації єдиної хромосоми з гомологічної пари 1, 11, 15 і 21 при проведенні стандартного цитогенетичного дослідження. «Втрачений» генетичний матеріал увійшов до складу дериватів, які утворилися внаслідок транслокацій і регулярно реєструвалися на препаратах хромосом: der(1)t(1;11)(q12;p15), der(5)t(5;15)(q10;p10), der(12)t(12;15)(p10;q10), der(16)t(16;21)(q12.1;p11.1) (рис. 1 і 2). Варто зазначити, що транслокації t(5;15)(q10;p10) і t(12;15)(p10;q10) ніколи не виявлялися одночасно.

Що стосується природи моносомії другої хромосомної пари (рис. 1), умовно «втрачений» або структурно змінений гомолог виявлявся на препаратах хромосом як del(2)(q21) або дери-



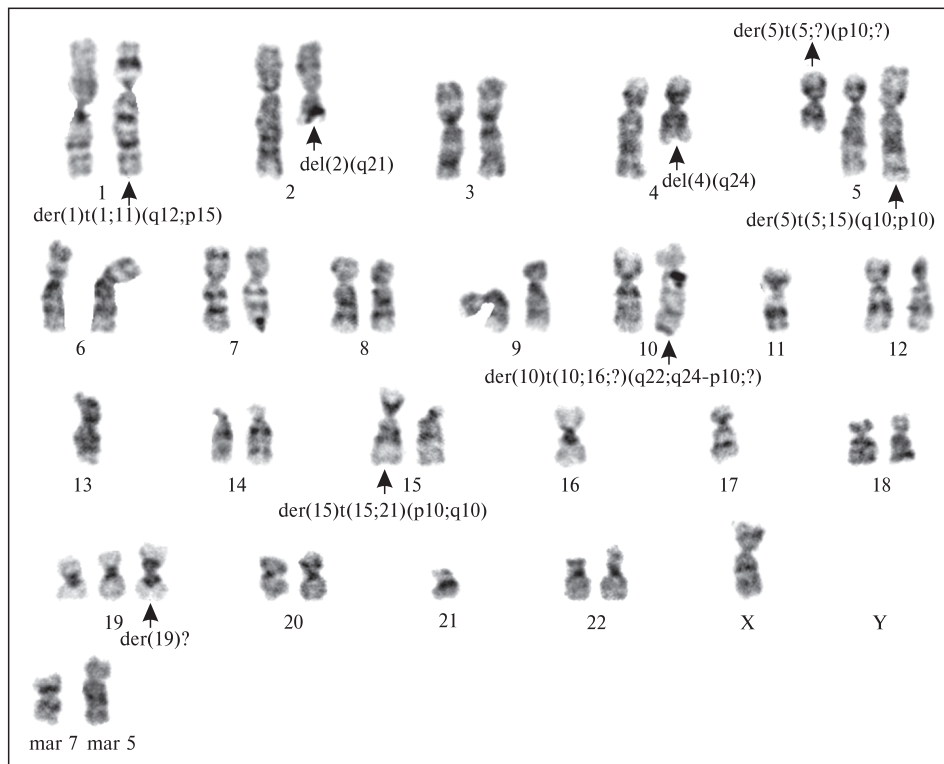
**Рис. 1.** GTG-аналіз клітин лінії 4BL, 205-й пасаж. Каріотип 42,X, моносомія хромосом 2, 4, 11, 15, 17, 21,X; нулісомія хромосом 8 і 13; del(1)(q21.1); der(1)t(1;11)(q12;p15); der(10)t(10;16?)(q22;q24-p10;?); der(12)t(12;15)(p10;q10); der(16)t(16;21)(q12.1;p11.1); шість маркерних хромосом. Стрілками позначені хромосоми, які зазнали перебудов

ват der(2)t(2;?)(q21;?), що утворився внаслідок транслокації із невідомою хромосомою (рис. 2). Подібним чином могла виникнути моносомія четвертої пари (рис. 1): одну із маркерних хромосом, попри виразні структурні зміни, визначили як del(4)(q24) або der(4)t(4;?)(q24;?) (рис. 2). Відсутність хромосоми 10-ї пари могло спричинити утворення del(10)(q26.11) або складної транслокації між декількома хромосомами – der(10)t(10;16;?)(q22;q24→q10;?) (рис. 1 і 2). Незважаючи на наявність обох гомологів 19-ї пари, часто реєстрували маркерну хромосому, ймовірно der(19) (рис. 2).

Отже, чотири із семи маркерних хромосом, які регулярно виявляли в біядиплоїдних клітинах, вірогідно представлені: del(2)(q21) або der(2)t(2;?)(q21;?); del(4)(q24) або der(4)t(4;?)(q24;?); der(5)t(5;?)(q11.1;?) або i(5p), der(19) (рис. 2). В інших маркерних хромосомах може локалізуватися матеріал хромосом 10, 13, 17, а

також хромосом, які відзначились регулярною моносомією за даними класичних цитогенетичних досліджень (рис. 1 і 2).

Остаточна ідентифікація маркерних хромосом, які виникли внаслідок складних міжхромосомних перебудов, потребує застосування багатоколірного або вибіркового FISH аналізу. Щоб виготовити інформативні гібридизаційні проби ДНК, слід володіти інформацією про «гарячі точки» структурних перебудов і обсяг зміненого генетичного матеріалу. Застосована в даному дослідженні молекулярно-цитогенетична техніка FISH «Cytocell OctoChrom» спеціально розроблена для верифікації транслокаційних перебудов, а порівняльна геномна гібридизація (array CGH) вже довела високу роздільну здатність для оцінки балансу ДНК гомологічних хромосом та встановлення ділянок структурних перебудов [16–18]. Array CGH на сучасному етапі застосовується як допов-



**Рис. 2.** GTG-аналіз клітин лінії 4BL, 205-й пасаж. Каріотип 44,X, моносомія хромосом 11, 13, 16, 17, 21,X; der(1)t(1;11)(q12;p15); del(2)(q21); del(4)(q24); der(5)t(5;?) (p10;?); der(5)t(5;15)(q10;p10); der(10)t(10;16;?) (q22;q24-p10;?); der(15)t(15;21)(p10;q10); der(19)?; дві маркерні хромосоми. Стрілками позначені хромосоми, які зазнали перебудов

нення до стандартного цитогенетичного дослідження, проте в деяких випадках дозволяє виявляти хромосомні аномалії, які не вдалося ідентифікувати при каріотипуванні [19]. Попри це, порівняльна геномна гібридизація не може замінити стандартного цитогенетичного дослідження, оскільки не візуалізує хромосомні перебудови, а тому є малоінформативною у випадках збалансованих транслокацій, інсерцій, інверсій, низькорівневого мозаїцизму та маркерних хромосом [16, 17, 20]. Використання арсеналу методів в даному дослідженні відкрило перспективу верифікації природи виявлених моносомій та вірогідно асоційованих із ними дериватів хромосом у клітинах людини 4BL в умовах тривалого культивування.

*Аналіз балансу ДНК хромосомних пар, які характеризуються моносомією за даними цитогенетичних досліджень.* У роботі [21] охарактеризовано динаміку ультраструктурних аберацій каріотипу стовбурових клітин людини лінії 4BL,

виявлених за допомогою агау CGH на трьох пасажах – 120, 160, 205-му. Цікавим та неочікуваним виявилось, що більшість аберацій (дуплікації хромосом 2, 10, 16, 19 і делеції хромосом 4, 10, 12, 13, 17 та X) спостерігали на всіх досліджених пасажах. Це дозволило стверджувати, що клітинна лінія 4BL пройшла етап становлення до 120-го пасажу і від того моменту перебуває на стадії стабілізації.

За даними агау CGH на час досягнення клітинами 4BL 205-го пасажу жодних змін не зазнали хромосомні пари 3, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 18, 20, 21 і 22, які зберегли диплоїдний набір унікальних генів (рис. 3). Деякі з цих хромосом, а саме 11, 15 та 21, демонстрували моносомію при цитогенетичному дослідженні, проте результати агау CGH дозволили аргументовано стверджувати: невизначений при класичному каріотипуванні матеріал гомологічної хромосоми хоча і збережений, але зазнав структурних перебудов і опинився у скла-



Рис. 3. Ідіограма профайлу агау CGH клітин лінії 4BL на 205-му пасажі. Графічно зазначені ділянки делецій і дуплікацій

ді хромосом-дериватів через участь даних хромосом у транслокаціях. Одночасно із підтвердженням диплоїдного статусу хромосом 5, 11 та 15 доведено збалансований характер регулярних структурних перебудов, що утворилися за їхньою участі:  $der(1)t(1;11)(q12;p15)$  і  $der(5)t(5;15)(q10;p10)$ . При цьому збалансованість транслокації  $t(5;15)(q10;p10)$  досягаласть появою регулярної маркерної хромосоми із вмістом матеріалу коротких плечей хромосоми 5 –  $der(5)t(5;?)q11.1;?)$  або  $i(5p)$  (рис. 2).

Для решти хромосом каріотипу клітин 4BL на 205-му пасажі характерна більш або менш виражена незбалансованість вмісту ДНК (рис. 3). Вибіркову втрату значної кількості генетичного матеріалу спостерігали у хромосомах 12 і 13, незначної – 8, 9 і X. Переважну втрату генетичного матеріалу при одночасних незначних дуплікаціях ДНК виявили у хромосомах 4 і 17. Вибіркові значні дуплікації ДНК визначено у хромосомах 2, 16, 19, незначні – у хромосомі 1. В 10-й хромосомній парі спостерігали великі делецію і дуплікацію, практично однакові за розміром. За питомою часткою зміненого генетичного матеріалу, що відповідає об-

сягу втрати гетерозиготності гомологічними хромосомами, порядок виявився наступний: хромосома 4 (50,5 % конститутивної ДНК), 10 (44,4 %), 19 (37,5 %), 13 (34,5 %), 16 (32,3 %), 17 (25,8 %), 12 (25,5 %), 2 (15,7 %). Найменш виразних втрат ДНК зазнали хромосоми 1 (1,6 %), 8 (2,1 %), 9 (1,5 %) та X (2,8 %). Серед порівняно незначних змін у хромосомі X виявили часткову нулісомію за трьома відносно малими ділянками (1,5–2,9 Mb), проте із повною втратою 49 генів, серед яких чотири визначені OMIM (*XG*, *ARSE*, *SHOX*, *CSF2RA*).

У табл. 1 охарактеризовано баланс ДНК та супутні структурні зміни у хромосомах 4, 13, 17-ї пар, за якими регулярно реєстрували моносомію на препаратах метафазних хромосом (рис. 1 і 2). Застосування агау CGH дозволило підтвердити великі втрати генетичного матеріалу, що вірогідно спричинило однокопійність експресії генів в ділянках розміром 50,5; 34,5; 25,8 % від конститутивної кількості ДНК у згаданих хромосомах. У хромосомі 4 одночасно із делецією розміром 86,4 Mb виявлено порівняно незначну дуплікацію (9,97 Mb), за рахунок чого 157 генів присутні у трьох копіях (визначе-

ні OMIM: *ADD1, MSX1, WHSC1, DOK7, WFS1, DRD5, HTT, EVC, PDE6B, SH3BP2, FGFR3, EVC2, RNF212, SLC2A9, IDUA*). У хромосомі 17 одночасно із делецією розміром 18 Мб виявлено порівняно незначну дуплікацію (2,49 Мб), в якій 39 генів присутні у трьох копіях (визначені OMIM: *CANT1, SOCS3, CBX2, TMC6, TMC8*). Отже застосування агау CGH підтвердило значну втрату генетичного матеріалу хромосомами 4, 13 і 17 каріотипу клітин 4BL на 205-му пасажі, що могло спричинити візуалізацію регулярної моносомії зазначених хромосомних пар при стандартному цитогенетичному аналізі. Оскільки втрата ДНК була частковою, виникало питання: чи могла вона призвести до виникнення моносомії і в який спосіб?

Результати агау CGH підтвердили наявність другого гомолога четвертої хромосомної пари, але він зазнав значних структурних змін із втратою ділянки 4q24–q35.2 довгого плеча (86,4 Мб) та порівняно незначної дуплікації ділянки 4p16.3–p16.1 короткого плеча (9,96 Мб). Наявність де-

леції del(4)(q24) доведено при застосуванні молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell OctoChrom, а разом це дозволило уточнити природу невеликої метацентричної хромосоми «типу F без гетерохроматину», яка, власне, й виявилась наслідком делеції хромосоми 4 (рис. 2 та 4).

На нашу думку, збільшення ділянки короткого плеча хромосоми 4 (дуплікація 4p16.3–p16.1) є більш пізньою подією, аніж делеція, і служить для стабілізації нової маркерної хромосоми del(4)(q24). Це узгоджується з сучасними уявленнями про поєднане виникнення делецій і дуплікацій при формуванні стабільних структурних аномалій хромосом. Випадок асоціації інтерстиціальної інвертованої дуплікації з термінальною делецією короткого плеча хромосоми 8 вперше описаний Weleber et al. [22] у 1976 р. Запропоновано три основних механізми утворення інвертованих дуплікацій з термінальними делеціями. На думку Gorinati et al. [23], причиною є рекомбінація всередині

Таблиця 1. Характеристика структурних змін у хромосомах клітин лінії 4BL з регулярною моносомією каріотипу та значною втратою ДНК на 205-му пасажі (за даними агау CGH)

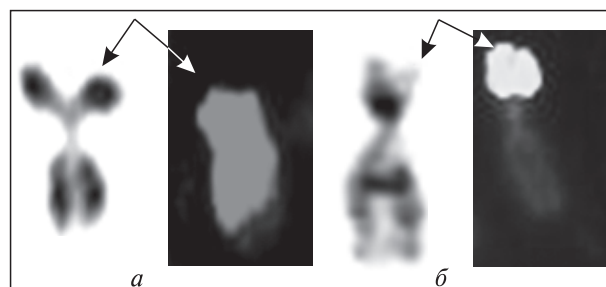
Делеція (ISCN Notation)	Розмір, Мб	Локалізовані гени	Кількість копій генів
<i>Хромосома 4</i>			
агау 4q24q35.2 (104 635 637–190 992 677)	86,3	533 генів, OMIM: <i>UCP1, TACR3, EDNRA, PRSS12, FGA, GLRB, CYP4V2, ELMOD2, HHIP, GYPA, TLR3, F11, MFSD8, PALLD, FGB, BBS12, KLKB1, SLC25A4, HPGD, NEK1, LRAT, AGA, PITX2, ANK2, MMAA, TLL1, FGG, HADH, TLR2, CFI, EGF, BBS7, ETFDH, NR3C2</i>	1
<i>Хромосома 13</i>			
агау 13q12.11q21.2 (19 663 361–58 983 135)	39,32	469 генів, OMIM: <i>B3GALTL, ARL11, FREM2, RXFP2, RNF6, GJB6, GJB2, PHF11, SMAD9, ITM2B, ATP7B, CENPJ, RFXAP, TNFSF11, HTR2A, ALOX5AP, FGF9, PDX1, SGCG, RNASEH2B, KL, SPG20, RB1, SUCLA2, SACS, FLT3, SLC25A15, BRCA2</i>	1
<i>Хромосома 17</i>			
агау 17q11.1q21.31 (22 431 116–40 458 230)	18,0	515 генів, OMIM: <i>PYY, CCL3L3, SLC4A1, STAT5B, BLMH, NOS2, ACACA, HNF1B, TCAP, TMEM132E, KRT12, KRT14, JUP, NAGLU, KRT13, CCL2, CCL11, PEX12, SLC46A1, SOST, NF1, KRT10, KRT16, G6PC3, GFAP, G6PC, GRN, RARA, STAT3, HCRT, CCL3, KRT9, BRCA1, TAF15, ERBB2, ITGA2B, FOXN1, WNK4, SLC6A4, NAGS, CRYBA1</i>	1

Примітка. У хромосомах 4 і 17 одночасно виявлені порівняно незначні дуплікації (9,97 і 2,49 Мб відповідно).

ні парацентричної інверсії, яка виникає приблизно у 0,1–0,5 % популяції [24]. Згідно з другим механізмом, підставою для виникнення інвертованих дуплікацій із термінальними делеціями є рекомбінація між LCR (low copy repeats) розміром 10–500 kb та гомологією послідовностей 95 % [25, 26]. Третій механізм базується на припущенні, що інвертовані дуплікації з термінальними делеціями виникають із початкових дволанцюгових розривів двох сестринських хроматид [27]. Злиття липких кінців призводить до симетричного U-типу об'єднання з утворенням дицентричної хромосоми, а премітотичний розрив дицентрика дистально від сайту злиття спричиняє утворення моноцентричної хромосоми з термінальною делецією та інвертованою дуплікацією. На думку Rowe et al. [26], U-тип обміну є найпоширенішим для багатьох хромосом.

У роботі Tassano et al. [28] повідомляється про перший випадок утвореної *de novo* inv dup del(4) з частковою дуплікацією 4p і делецією 4q. Дуплікований регіон простягався від 4p15.1 до теломери і мав розмір 29,27 Mb, в той час як розмір термінальної делеції 4q35.1 становив 3,114 Mb. У нашому випадку в хромосомах четвертої пари клітинної лінії 4BL також відбулася термінальна дуплікація короткого плеча 4p16.3–p16.1, хоча й меншого розміру (9,966 Mb), проте втрата генетичного матеріалу внаслідок термінальної делеції 4q24–q35.2 виявилася значно більшою – 86,357 Mb. Цікаво, що співвідношення розмірів делеції і дуплікації в обох дослідженнях склало приблизно 1 до 9. Загалом на даний час описано десять пацієнтів з дуплікацією 4p14–p15 і делецією 4q35. В усіх випадках аномалії хромосоми 4 утворювались внаслідок перичентричної інверсії, успадкованої від одного з батьків. Утворення *de novo* inv dup del(4) нашою хурою на думку, що термінальні делеції і дуплікації можуть маскувати складні перебудови та реконструювання геному [28], що, власне, ми й спостерігали при дослідженні каріотипу клітин 4BL на 205-му пасажі.

Якщо дотримуватись гіпотези щодо одночасної появи делеції і дуплікації для стабілізації хромосоми, регулярна моносомія або нулісомія 13-ї хромосомної пари у клітинах лінії 4BL може бути наслідком великої делеції довгого плеча 13q12.11–q21.2 (39,32 Mb) за відсут-



**Рис. 4.** Ідентифікація структурних перебудов хромосом 4-ї (а) та 17-ї (б) пар у клітинах лінії 4BL за допомогою молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell OctoChrom: а – del(4)(q24); б – der(17)t(17;?) (q11.1;?)

ності одночасних дуплікацій, які могли би стабілізувати нову хромосому як самостійну одиницю. Єдина можливість зберегти залишковий генетичний матеріал хромосоми 13 – це утворення деривату з іншою хромосомою, а його наявність підтверджено агау CGH (рис. 3). Причину відсутності «стабілізуючої» дуплікації у хромосомі 13 можна пов'язати з особливостями генетичного матеріалу її короткого плеча. Воно побудоване із мікросателітної ДНК, а можливість раптових узгоджених змін конститутивного гетерохроматину у відповідь на велику втрату еухроматину представляється доволі низькою [29]. У дослідженні впливу бензолу на хромосоми миші та людини хромосомні розриви спостерігали переважно в районах еухроматину [30]. В численних описах випадків делеції 13q, яка містить відомий онкосупресор Rb1, не повідомлялося про наявність супутніх дуплікацій в ділянках еухроматину при застосуванні агау CGH [31–33]. Ймовірність втрати хромосоми 13 збільшується, якщо разом із делецією 13q12.11–q21.2 втрачається центромерна альфойдна ДНК, але це важко довести через нечутливість агау CGH до оцінки ДНК гетерохроматину [18].

Отже, на прикладі хромосоми 4 можна припустити, що дуплікація короткого плеча стабілізує нову хромосому del(4)(q24), і завдяки цьому вона зберігає гомологічну пару, тоді як у випадку хромосоми 13 невірноважена, вибіркова втрата великої частини довгого плеча (34,5 %) є вірогідною причиною моно- або нулісомії каріотипу. Збережені структурні елементи хромосоми 13 варто шукати у складі

регулярних маркерних хромосом, що узгоджується з даними Виї et al. [34].

При каріотипуванні клітин лінії 4BL спостерігали регулярну моносомію 17-ї пари хромосом (рис. 1 та 2). За даними агау CGH значні структурні зміни відбулися в її довгому плечі: делеція великої ділянки 17q11.1-q21.31 (18 Mb) та порівняно незначна дуплікація субтеломерної ділянки 17q25.3 (2,49 Mb) (рис. 3). Через незначну молекулярну масу залишковий матеріал хромосоми 17 або втратився, або, що більш ймовірно, опинився у складі дериватів маркерних хромосом. Так, застосування молекулярно-цитогенетичної техніки FISH Cytocell OctoChrom дозволило ідентифікувати матеріал

довгих плечей хромосоми 17 у складі невеликого субметацентрика – деривата der(17)t(17;?) (q11.1;?) (рис. 4).

Отже, виявлено узгодженість моносомії каріотипу 4, 13, 17-ї хромосомних пар при каріотипуванні зі значною втратою ними ДНК за результатами агау CGH на час досягнення клітинною лінією 4BL 205-го пасажу. Цікаві результати отримано для 2-ї і 10-ї хромосомних пар, в яких відтворення моносомії асоціювалося із значними дуплікаціями ДНК за даними агау CGH (табл. 2).

При стандартному каріотипуванні із застосуванням GTG-зabarвлення препаратів хромосом у кожній другій диплоїдній та більшості

Таблиця 2. Суттєвий набуток ДНК, за даними агау CGH, хромосомами 2-ї і 10-ї пар в асоціації із регулярною моносомією каріотипу клітин лінії 4BL на 205-му пасажі

Делеція (ISCN Notation)	Кількість копій генів	Дуплікація (ISCN Notation)	Кількість копій генів
<i>Хромосома 2</i>			
Немає	2	array 2p24.1 (19 256 636–19 858 012) 0,6 Mb, 1 ген <i>OSR1</i>	3
Немає	2	array 2p21 (45 963 657–46 669 292) 0,71 Mb, 9 генів, OMIM: <i>EPAS1</i>	3
Немає	2	array 2p13.3p12 (69 055 375–75 314 398) 6,2 Mb, 111 генів, OMIM: <i>FIGLA, ANTXR1, DGUOK, HTRA2, ALMS1, DCTN1, SPR, ATP6V1B1, DYSF, MCEE</i>	3
Немає	2	array 2q31.1q33.1 (171 590 598–202 272 828) 30,7 Mb, 257 генів, OMIM: <i>FRZB, CASP8, PRKRA, HOXD4, HSPD1, DIRC1, COL5A2, MSTN, SATB2, NEUROD1, PMS1, STAT1, TTN, SLC25A12, HOXD13, COL3A1, AGPS, HOXD10, CHN1, SLC40A1, CHRNA1, STAT4, PDE11A, CASP10, DFNBS9, ITGA6, CERKL, HIBCH</i>	3
<i>Хромосома 10</i>			
array 10p14p12.1 (7 120 936–27 185 631) 20,1 Mb, 202 гени, OMIM: <i>PDSS1, PTF1A, MYO3A, OPTN, MLLT10, CUBN, PHYH, CACNB2, DCLRE1C, GATA3</i>	1	array 10q24.2q26.11 (99 711 439–120 783 547) 21.1 Mb, 261 ген, OMIM: <i>TLX1, SUFU, PNLIP, HPS6, CYP17A1, CPN1, COX15, TCF7L2, PAX2, HPS1, RBM20, SMC3, ABCC2, FGF8, SHOC2, COL17A1, FBXW4, PITX3, HABP2, EMX2, ADRB1, MXI1</i>	3
array 10q26.11q26.3 (121 105 410–135 196 293) 14,1 Mb, 153 гени, OMIM: <i>FGFR2, DMBT1, OAT, ACADSB, PLEKHA, BAG3, HTRA1, UROS</i>	1	array 10q22.1q22.2 (70 994 899–75 740 231) 4,75 Mb, 113 генів, OMIM: <i>SLC29A3, CHST3, PRF1, PLAU, PSAP, VCL, CDH23, NEUROG3, NODAL, PCBD1, MRPS16</i>	3



тетраплоїдних клітин реєстрували моносомію другої хромосомної пари за наявності візуально незміненого гомолога (рис. 1). За результатами стандартного цитогенетичного аналізу «втрачену» гомологічну хромосому визначили як делецію довгого плеча – del(2)(q21) (рис. 2), проте за даними агау CGH в ділянці 2q31.1–q33.1, навпаки, відбулася велика дуплікація розміром 30,6 Mb із результативною трикопійністю 257 генів, з яких 28 визначені OMIM (табл. 2). У роботі Bonaglia et al. [35] описано випадок дуплікації 2q, яка відбулася внаслідок інверсії, асоційованої із виникненням термінальної делеції, проте наявність делеції хромосоми 2 у клітинах 4BL заперечується результатами агау CGH. Єдиним можливим поясненням візуальної відсутності частини довгого плеча хромосоми 2 при збереженні відповідного генетичного матеріалу є утворення деривату з іншою хромосомою. Отже, друга хромосомна пара каріотипу клітин 4BL вірогідно містить структурно збережений гомолог та структурно змінений дериват der(2)t(2;?)(q21;?). Цікаво, що істотні зміни довгого плеча хромосоми 2, які візуально створювали картину втрати його генетичного матеріалу, згідно з даними агау CGH супроводжувалися утворенням дуплікацій у візуально незміненому короткому плечі: порівняно невеликої (6,2 Mb) в ділянці 2p13.3–p12 та двох дрібних (0,6–0,7 Mb) в ділянках 2p21 і 2p24.1 (табл. 2 і рис. 3).

Щоб ідентифікувати генетичний матеріал довгого плеча хромосоми 2 у складі маркерних хромосом та об'єктивно охарактеризувати зміни в її короткому плечі, слід провести молекулярно-цитогенетичне дослідження із застосуванням багатоколірної FISH.

При цитогенетичному дослідженні переважно спостерігали моносомію 10-ї пари хромосом, яка в диплоїдному стані містила один структурно змінений гомолог (рис. 1 і 2). Результати агау CGH засвідчили гетерогенність змін балансу ДНК, які вірогідно й супроводжували виникнення структурних змін. Відбулася втрата великої ділянки 10p14–p12.1 короткого плеча (20,07 Mb) та множинні гетерогенні зміни довгого плеча, а саме велика дуплікація 10q24.2–q26.11 (21,07 Mb), порівняно незначна дуплікація 10q22.1–q22.2 (4,75 Mb) і значна втрата ДНК внаслідок делеції субтеломерної ділянки

10q26.11–q26.3 (14 Mb) (рис. 3 і табл. 2). В літературі описані випадки поєднання термінальної делеції і дуплікацій 10-ї хромосоми [36]. Подібно до наведених характеристик генетичного матеріалу хромосоми 10 у клітинах 4BL описано клінічний випадок з аналогічними ділянками дуплікації (10q25.3q26.2, 13, 1 Mb) і делеції (10q26.2q26.3, 5 Mb), причому використання FISH аналізу дозволило встановити, що дуплікований фрагмент знаходиться в інвертованій позиції [37].

Якщо підсумувати результативні зміни, трансформована хромосома 10-ї пари повинна мати майже акроцентричну конституцію із видовженим довгим плечем приблизно на 11 Mb, проте враховуючи чисельні «гарячі точки» в місцях перебудов, можна припустити, що вона утворила транслокації з іншими хромосомами і привнесла до складу дериватів (маркерних хромосом) надлишковий генетичний матеріал двох ділянок довгого плеча (10q24.2–q26.11 і 10q22.1–q22.2). Ймовірність цього підтверджує регулярне виявлення частини довгого плеча хромосоми 10 у складі деривату der(10) t(10;16;?) (q22;q24q10;?), який утворився внаслідок транслокації між хромосомами 10 і 16 та невизначеною (рис. 1 і 2).

Виявлені за допомогою агау CGH незбалансовані зміни генетичного матеріалу асоціюються із достовірною втратою гетерозиготності онкогенів, генів-протекторів пухлинного росту, генів проліферації, апоптозу та інших функцій, що могло створити основу для трансформації генетичної програми клітин 4BL і забезпечити її здатність до тривалого культивування. Структурні зміни хромосом у клітинах 4BL узгоджуються з гіпотезою щодо скоординованого виникнення делецій і дуплікацій та їх стабілізуючого впливу на трансформовані хромосоми, що дозволяє рекомендувати використання клітинної лінії 4BL для таких досліджень.

**Висновки.** Усі хромосомні пари клітинної лінії 4BL людини, що демонстрували моносомію при класичному цитогенетичному аналізі, зазнали структурних перебудов, які імітували втрату однієї гомологічної хромосоми. Делеції розміром 18–50,5 Mb ДНК відбулися у хромосомах 4, 10, 13, 17-ї пар, причому «втрачений» генетичний матеріал частково опинив-

ся у складі хромосом-дериватів, природу яких вивчали за допомогою технік GTG, FISH і агау CGH. Якщо виникнення делеції було визначальною подією в утворенні моносомій 4, 10, 13 і 17, то моносомія хромосоми 2 виявилась наслідком множинних дуплікацій з утворенням деривату. Завдяки застосуванню агау CGH конкретизовано ділянки структурних перебудов у хромосомах 2, 4, 10, 13 і 17, що дозволяє провести більш точну ідентифікацію за допомогою багатоколірної FISH.

*Колектив авторів висловлює щире подяку В.Д. Зукіну, канд. мед. наук, керівнику клініки репродуктивної медицини «Надія» (м. Київ) за допомогу в проведенні досліджень.*

#### CHROMOSOMAL DNA BALANCE IN HUMAN STEM CELL LINE 4BL

H.R. Akopyan, V.O. Kushniruk, D.O. Mykytenko,  
N.L. Huleuk, Y. Kremenskaya, L.L. Lukash

Institute of Hereditary Pathology, Lviv  
Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv  
E-mail: kushniruk\_v\_o@ukr.net  
Clinic of reproductive medicine «Nadiya», Kyiv  
University of Rzeszyw, Poland

In the previous cytogenetic study of new human stem cell line 4BL at the 205<sup>th</sup> passage we observed the ploidy of chromosomal set and regular aberrations. To investigate the nature of monosomy of certain chromosomes the array CGH and FISH analyses have been used. The aberrations of chromosomes have been identified in all the cases of monosomies previously revealed by G-banding. The largest changes of the DNA balance have been detected in the chromosomes 2, 4, 10, 13 and 17. The probable cause of the monosomies of chromosomes 4, 10, 13 and 17 is massive loss of the genetic material. The monosomy of the second chromosome pair is caused by significant transformation one of the homologs in a type of numerous duplications and formation of der(2)t(2;?)(q21;?). Due to application of array CGH the regions of the structural aberrations of the chromosomes 2, 4, 10, 13 and 17 have been concretized, what permitted to perform their clarifying identification by multicolored FISH method. The results obtained by us confirm the hypothesis about coordinated appearance of the deletions and duplications and their stabilization impact on the transformed chromosomes.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Chandra, T., Ewels, P.A., Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Wingett, S.W., Kirschner, K., Thuret, J.Y., Andrews, S., Fraser, P., and Reik, W., Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells, *Cell Rep.*, 2015, vol. 10, no. 4, pp. 471–483.

- Oh, J.H., Kim, Y.J., Moon, S., Nam, H.Y., Jeon, J.P., Lee, J.H., Lee, J.Y., and Cho, Y.S., Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines, *J. Hum. Genet.*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 16–20.
- Pihan, G.A., Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer, *Front. Oncol.*, 2013, vol. 3, p. 277.
- Stepanenko, A.A., and Kavsan, V.M., Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells, *Cytol. Genet.*, 2012, vol. 46, no. 2, pp. 96–129.
- <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
- Lukash, L.L., Iatsyshyna, A.P., Kushniruk, V.O., and Pidpala, O.V., Reprogramming of human adult somatic cells in vitro, *Factor of experimental evolution*, Kyiv, Logos, 2011, vol. 11, pp. 493–498.
- Kushniruk, V.O., Ruban, T.P., and Lukash, L.L., Morphological and growth peculiarities of new human cell line 4BL, *Ibid*, 2013, vol. 13, pp. 315–319.
- Macewicz, L.L., Kushniruk, V.O., Iatsyshyna, A.P., Kotsarenko, K.V., Lylo, V.V., Akopyan, G.R., Huleyuk, N.L., Mykytenko, D.M., and Lukash, L.L. Correlation the level of mutagenesis with expression of reparative enzyme O<sup>6</sup>-methylhuanin DNA methyltransferase (MGMT) during establishment of cell lines in vitro, *Biopolym. Cell*, 2013, vol. 29, no. 6, pp. 485–492.
- Кушнірук, В.О., Кочубей, Т.П., Мацевич, Л.Л., Рубан, Т.П., Лукаш, Л.Л., Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні in vitro, *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*, К.: Логос, 2012, т. 3, сс. 313–318.
- Акоюн, Н.Р., Хулейук, Н.Л., Кушнірук, В.О., Муkyтенко, Д.О., Іатсьшйна, А.Р., і Лукаш, Л.Л., Comparative analysis of the karyotype of new human cell line 4BL at long cultivation. Ploidy of the chromosomal set, *Cytol. Genet.*, 2013, vol. 47, no. 5, pp. 305–317.
- Freshney, R.I., *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*, 6<sup>th</sup> ed., Wiley Blackwell, 2011, 768 p.
- Hungerford, D.A., Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl, *Stain. Technol.*, 1965, vol. 40, no. 6, pp. 333–338.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.I., Bat-tips, D.M., and Hungerford, D.A., Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Exp. Cell Res.*, 1960, vol. 20, no. 3, pp. 613–616.
- Seabright, M., A rapid banding technique for human chromosomes, *Lancet*, 1971, vol. 2, no. 7731, pp. 971–972.
- ICSN 2013. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, eds Shaff L.G., McGowan-Jordan, J., Schmid, M., Basel, Karger, 2013, 140 p.

16. Riegel, M., Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides, *Genet. Mol. Biol.*, 2014, vol. 37, no. 1, pp. 194–209.
17. Evangelidou, P., Alexandrou, A., Moutafi, M., Ioannides, M., Antoniou, P., Koumbaris, G., Kallikas, I., Velissariou, V., Sismani, C., and Patsalis, P.C., Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: advantages, challenges, and review of the literature, *Biomed. Res. Int.*, 2013, vol. 2013, Article ID 346762, 14 p.
18. Wan, T.S., and Ma, E.S., Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis, *Chang Gung Med. J.*, 2012, vol. 35, no. 2, pp. 96–110.
19. Yin A., Lu J., Liu C., Guo, L., Wu, J., Mai, M., Zhong, Y., and Zhang, X., A prenatal missed diagnosed case of submicroscopic chromosomal abnormalities by karyotyping: the clinical utility of array-based CGH in prenatal diagnostics, *Mol. Cytogenet.*, 2014, vol. 7, 26 p.
20. Bi, W., Borgan, C., Pursley, A.N., Hixson, P., Shaw, C.A., Bacino, C.A., Lalani, S.R., Patel, A., Stankiewicz, P., Lupski, J.R., Beaudet, A.L., and Cheung, S.W., Comparison of chromosome analysis and chromosomal microarray analysis: what is the value of chromosome analysis in today's genomic array era?, *Genet Med.*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 450–457.
21. Kushniruk, V.O., Akopyan, H.R., Mykytenko, D.O., Huleyuk, N.L., Zukin, V.D., and Lukash, L.L., The dynamic of ultrastructural pathologies of the karyotype of human stem cell line 4BL, revealed by array CGH, *Factors in experimental evolution*, 2015, vol. 16, pp. 216–221. (article in Ukrainian).
22. Weleber, R.G., Verma, R.S., Kimberling, W.J., Fieger, H.G. Jr., and Iubs, H.A., Duplication-deficiency of the short arm of chromosome 8 following artificial insemination, *Ann. Genet.*, 1976, vol. 19, no. 4, pp. 241–247.
23. Gorinati, M., Caufin, D., Minelli, A., Memo, L., Gaspardo, G., and Dodero, A., Inv dup (8) (p21.1–22.1): further case report and a new hypothesis on the origin of the chromosome abnormality, *Clin. Genet.*, 1991, vol. 39, no. 1, pp. 55–59.
24. Pettenati, M.J., Rao, P.N., Phelan, M.C., Grass, F., Rao, K.W., Cosper, P., Carroll, A.J., Elder, F., Smith, J.L., Higgins, M.D., et al. Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases, *Am. J. Med. Genet.*, 1995, vol. 55, no. 2, pp. 171–187.
25. Stankiewicz, P., and Lupski, J.R., Genome architecture, rearrangements and genomic disorders, *Trends Genet.*, 2002, vol. 18, no. 2, pp. 74–82.
26. Shaffer, L.G., and Lupski, J.R., Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans, *Annu. Rev. Genet.*, 2000, vol. 34, pp. 297–329.
27. Rowe, L.R., Lee, J.Y., Recto, L., Kaminsky, E.B., Brothman, A.R., Martin, C.L., and South, S.T., U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements, *J. Med. Genet.*, 2009, vol. 46, no. 10, pp. 694–702.
28. Tassano, E., Alpigiani, M.G., Salvati, P., Gimelli, S., Lorini, R., and Gimelli, G., Molecular cytogenetic characterization of the first reported case of an inv dup (4p)(p15.1-pter) with a concomitant 4q35.1-pter deletion and normal parents, *Gene*, 2012, vol. 511, no. 2, pp. 338–340.
29. Horvath, J.E., Bailey, J.A., Locke, D.P., and Eichler, E.E., Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin, *Hum. Mol. Genet.*, 2001, vol. 10, no. 20, pp. 2215–2223.
30. Eastmond, D.A., Schuler, M., Frantz, C., Chen, H., Parks, R., Wang, L., and Hasegawa, L., Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans, *Res. Rep. Health Eff. Inst.*, 2001, vol. 103, pp. 1–68; discussion 69–80.
31. Rapini, N., Lidano, R., Pietrosanti, S., Vitiello, G., Grimaldi, C., Postorivo, D., Nardone, M., Del Bufalo, F., Brancati, F., and Manca Bitti, M.L., De novo 13q13.3–21.31 deletion involving RB1 gene in a patient with hemangioendothelioma of the liver, *Ital. J. Pediatr.*, 2014, vol. 40, pp. 1–5.
32. Mitter, D., Ullmann, R., Muradyan, A., Klein-Hitpass, L., Kanber, D., Ounap, K., Kaulisch, M., Lohmann, D., Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2011, vol. 19, no. 9, pp. 947–958.
33. Thienpont, B., Vermeesch, J.R., and Fryns, J.P., 25 Mb deletion of 13q13.3–q21.31 in a patient without retinoblastoma, *Eur. J. Med. Genet.*, 2005, vol. 48, no. 3, pp. 363–366.
34. Bui, T.H., Vetro, A., Zuffardi, O., and Shaffer, L.G., Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era? *Prenatal. Diagn.*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 235–243.
35. Bonaglia, M.C., Giorda, R., Poggi, G., Raggi, M.E., Rossi, E., Baroncini, A., Giglio, S., Borgatti, R., and Zuffardi, O., Inverted duplications are recurrent rearrangements always associated with a distal deletion: description of a new case involving 2q, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2000, vol. 8, no. 8, pp. 597–603.
36. Kibe, T., Mori, Y., Okanishi, T., Shimojima, K., Yokochi, K., and Yamamoto, T., Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale, *Am. J. Med. Genet.*, 2011, vol. 155A, no. 1, pp. 215–220.
37. Xiao, B., Ji, X., Xing, Y., Jiang, W.T., Zhang, J.M., and Tao, J., Inverted duplication and deletion of 10q25q26 in a patient without any obvious skeletal anomalies, *Mol. Syndromol.*, 2012, vol. 3, no. 4, pp. 185–189.

Надійшла 29.07.15