

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології і генетики

Степаненко Олексій Анатолійович

УДК 577.615.28

616.006.48

**ВПЛИВ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ І СТАБІЛЬНОЇ
ТРАНСФЕКЦІЇ ГЕНА *SN3L1* НА ГЕНОМ ТА ФЕНОТИП
ПУХЛИННИХ КЛІТИН**

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот (з 2016 року лабораторія біосинтезу нуклеїнових кислот відділу функціональної геноміки) Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України
Кавсан Вадим Мусійович

доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України
Риндич Алла Володимирівна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу функціональної геноміки.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор
Глузман Данило Фішелевич,
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
завідувач відділу імуноцитохімії та онкогематології;

доктор біологічних наук, професор
Мінченко Олександр Григорович
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної біології.

Захист відбудеться 11 квітня 2016 р. о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано _____ 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради, кандидат
біологічних наук, с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Всі пухлини є анеуплоїдними і в більшості випадків є хромосомно нестабільними (ХН) (Duesberg and Rasnick, 2000; Duesberg, 2007, 2003; Duesberg et al., 2004a). ХН та генетична гетерогенність пухлини можуть бути використані як показник еволюційного потенціалу, оскільки гетерогенність дає більше можливостей для адаптації та виживання. Ступінь ХН і генетичної гетерогенності корелює з туморогенним потенціалом клітинних ліній, прогресією захворювання від передракових уражень до явних злоякісних пухлин і метастазів, виживаністю пацієнтів та терапевтичною стійкістю (Andor et al., 2015; Duesberg et al., 2007, 2004b).

Опосередкований терапією стрес може сприяти еволюції пухлини як селектуючи генетичні варіації, так і створюючи нові варіації через посилення рівня ХН. В результаті транскриптом та протеом клітин після тривалої обробки хіміопрепаратами суттєво змінюється (Duesberg et al., 2007, 2004b). Збільшення хромосомних аберацій під час і після хіміотерапії асоційовано з підвищеною агресивністю пухлин і зростанням ризику розвитку терапевтично резистентних рецидивів. В зв'язку з цим однією з найважливіших проблем молекулярної онкології і терапії раку є виражена адаптаційна еволюція геному і фенотипу пухлинних клітин під дією терапевтичного втручання та інших стресів, що напряду впливає на перебіг захворювання, формування терапевтичної резистентності, відповідь на подальшу терапію (терапію другої чи третьої лінії) та виживаність пацієнтів. Цитотоксична та таргетна терапія також може впливати на центросоми і стабільність хромосом в нормальних клітинах пацієнтів (Duesberg et al., 2007), що призводить до множинних несприятливих довгострокових побічних ефектів. Тому аналіз ХН та фенотипу пухлинних клітин після довготривалої обробки клінічними цитотоксичними хіміопрепаратами першої лінії (темозоломід або цисплатин) або таргетними клінічними та перспективними хіміопрепаратами (інгібітор mTOR кінази темзиролімус і інгібітор MEK1/2 кіназ U0126) має сприяти розумінню того, як терапевтичний стрес впливає на нестабільність геному та агресивність пухлинних клітин.

Численні клінічні дослідження показали підвищений рівень експресії хітиназа 3-подібного білку 1 (CHI3L1) у пухлинах та сироватці крові пацієнтів з різними онкологічними захворюваннями. Висока концентрація CHI3L1 у сироватці крові прямо пропорційно корелює з агресивністю пухлин молочної залози, простати, товстої кишки, меланоми, тощо, що може вказувати на його важливу роль в онкогенезі (Johansen, 2006). CHI3L1 пропонується як мішень для таргетної терапії пухлин (Libreros and Iragavarapu-Charyulu, 2015; Shao et al., 2015). Проте, в експериментальних моделях залежно від типу клітин і дизайну експеримента продемонстровано протилежний вплив надекспресії CHI3L1 на проліферацію, інвазію, ріст у м'якому агарі та формування пухлин (Balynska et al., 2011; Kawada et al., 2012; Ngernyuang et al., 2014; Salamon et al., 2014; Shao et al., 2009). Невирішеним залишається питання, чому той самий

трансген в різних моделях може демонструвати антагонистичну функціональну дуальність, проявляючи онкогенні або пухлинно-супресорні ефекти (кількість таких «парадоксів» вже досягає майже сотні (Stepanenko et al., 2013). Експериментальні маніпуляції з екзогенною ДНК (наприклад, стабільна надекспресія трансгена) можуть діяти як системний стрес, збільшуючи рівень ХН і гетерогенності, особливо, коли стрес гострий або модельна система є геномно нестійкою (Heng et al., 2010, 2011). Крім того, ефект і функція (транс)гена можуть бути протилежними і різноманітними в клітинах з різними геномами і залежати від генетичної мережі, яка в свою чергу визначається геномним контекстом (Heng et al., 2013, 2010). Характеристика ХН та фенотипу пухлинних клітин після стабільної трансфекції рекомбінантної ДНК, що містить кДНК гена *SH3L1*, або порожньою плазмідною рсDNA3.1 сприятиме розумінню того, як стрес, пов'язаний з ектопічною експерсією трансгена, а також самою проделурою стабільної трансфекції плазмідної ДНК (вплив трансфікуючих реагентів, введення екзогенної плазмідної ДНК, її многокопійна інтеграція в геном клітин-рецепієнтів та обробка селектуєчим цитотоксичним антибіотиком), впливає на геном та фенотип пухлинних клітин. Ці дані мають наблизити нас до відповіді на питання, чи можна визначити прямі причинно-наслідкові зв'язки в клітинних лініях з нестабільним геномом і відрізнити, які зміни фенотипу викликані самим продуктом (транс)гена і які у зв'язку з хромосомними/епігенетичними змінами, що супроводжують стабільну трансфекцію векторної ДНК і гостру надексперсію трансгена.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАН України (з 2016 року лабораторія біосинтезу нуклеїнових кислот відділу функціональної геноміки) і виконувалась в рамках бюджетних тем №2.4.1.12 “Функціональна характеристика генів, асоційованих з ініціацією та прогресією гліальних та сполучнотканинних пухлин головного мозку” (2008-2012 рр.) і №2.2.4.12 “Потенційні онкобілки і білки-супресори пухлин головного мозку та їхня взаємодія із сигнальними шляхами клітини” (2014-2017 рр.) та наукових проєктів, отриманих на конкурсній основі: №4688 “Гени, що приймають участь в розвитку пухлин головного мозку, та їх взаємодія з сигнальними шляхами”, який фінансувався Українським науково-технологічним центром (2011-2013 рр.); № Ф40.4/018 “Пошук і характеристика онкогенів і пухлинних генів-супресорів, що приймають участь в ініціації та розвитку гліом” спільної україно-російської програми фундаментальних досліджень ДФФД-РФФД (2011-2012 рр.) та № Ф41.4/012 “Механізми впливу хітиназоподібних білків та редокс-регуляторів на онкогенні властивості клітин” спільної україно-білоруської програми фундаментальних досліджень ДФФД-БРФФД (2010-2012 рр.), що фінансувалися Державним агентством з питань науки, інновацій та інформатизації України; № 5.16.3.14 “Створення системи інгібування росту пухлин головного мозку на основі нанокон'югатів антисенс-олігонуклеотидів та антитіл, специфічних до онкобілків, з природними біополімерами” Державної

цільової науково-технічної програми “Нанотехнології та наноматеріали” на 2010-2014 рр., а також №38/13 “Нові молекулярно-генетичні маркери для сигнатур експресії генів пухлин головного мозку і їхня взаємодія із сигнальними шляхами” Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” на 2010-2014 рр., що фінансувалися НАН України.

Мета. Дослідити наслідки впливу стабільної трансфекції асоційованого з розвитком пухлин гена *CH13L1* та клінічних цитотоксичних і таргетних хіміопрепаратів (темозоломід, цисплатин, темзиролімус, U0126) на геном та фенотип пухлинних ліній клітин.

Завдання:

1. Проаналізувати хромосомну нестабільність та фенотип клітин ліній НЕК293 та HeLa після стабільної трансфекції плазмідною ДНК рсDNA3.1 та вектором рсDNA3.1 зі вставкою кДНК *CH13L1* (НЕК293_рсDNA3.1, НЕК293_СН13L1 та клони HeLa_СН13L1).

2. Проаналізувати хромосомну нестабільність і фенотип клітин НЕК293_рсDNA3.1 і HeLa_СН13L1 після довготривалої обробки темозоломідом (ТМЗ), ДНК-алкилюючим клінічним препаратом першої лінії терапії гліобластом.

3. Проаналізувати хромосомну нестабільність і фенотип клітин гліобластоми U251 та T98G після довготривалої обробки таргетним клінічним препаратом темзиролімусом (інгібітор mTOR кінази) або експериментальним таргетним препаратом U0126 (інгібітор MEK кінази).

4. Дослідити, чи впливає *in vivo* терапія цитотоксичним хіміопрепаратом цисплатином на кількість копій хромосомних локусів та фенотип виділених з пухлин резистентних клітин С6 гліоми щура.

5. Оцінити похибку МТТ тесту на життєздатність у порівнянні з прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім у вимірюванні життєздатності пухлинних клітин після короткої або довготривалої обробки хіміопрепаратами різного механізму дії.

Об’єкт дослідження: нестабільність геному і фенотипу пухлинних клітин.

Предмет дослідження: зміни геному та фенотипу пухлинних клітин різного походження під дією стрес-факторів (стабільна трансфекція гена *CH13L1* та довготривала обробка пухлинних клітин терапевтичними хіміопрепаратами різного механізму дії).

Методи дослідження: диференційне забарвлення хромосом, порівняльна геномна гібридизація, вестерн блот аналіз, тест на життєздатність, аналіз проліферації, аналіз утворення колоній у напіврідкому агарі, аналіз міграції клітин скретч-тестом, імплантація клітин у головний мозок щурів, трансфекція, тощо.

Наукова новизна отриманих даних. Дисертаційна робота вносить суттєве доповнення в сучасне уявлення про дестабілізацію клітинного геному і зміну фенотипових ознак під впливом екзогенних біологічних та хімічних

чинників на прикладі різних клітинних ліній, в тому числі таких, що походять від злоякісних пухлин головного мозку. Показано, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК може збільшувати рівень ХН і впливати на фенотип клітин лінії НЕК293. Білок CH3L1 здатен підвищувати життєздатність пухлинних клітин з високим рівнем ХН. Довготривала обробка пухлинних клітин клінічним цитотоксичним препаратом темозоломідом, таргетним клінічним препаратом темзиролімусом (інгібітор mTOR кінази) або експериментальним таргетним інгібітором U0126 (інгібітор MEK1/2 кіназ) призводять до суттєвих змін каріотипу та фенотипу пухлинних клітин. Вперше було продемонстровано як збільшення, так і зменшення агресивності злоякісного фенотипу пухлинних клітин під дією темозоломїду в залежності від генотипу клітин. Показано, що терапія цисплатином клітин С6 гліоми щура *in vivo* не призводить до змін кількості копій хромосомних локусів та ростових характеристик виділених з пухлини резистентних клітин.

Практичне значення одержаних результатів. Зміни геному і фенотипу клітин, стабільно трансфікованих порожнім вектором (без цільового гена), вказують на те, що онкогенні або пухлинно-супресорні функції генів можуть бути невірно інтерпретовані в клітинних моделях зі стабільною трансфекцією трансгена. Рекомендується використовувати для аналізу не тільки контрольні, але і вихідні немодифіковані клітини (дикого типу). Клінічні хіміопрепарати темозоломід та темзиролімус сприяють ХН та можуть як збільшувати, так і зменшувати агресивність злоякісного фенотипу пухлинних клітин. Ці дані потребують подальшого підтвердження і застерігають, що клінічне застосування цих препаратів може мати і негативні наслідки на перебіг онкозахворювання. В цілому, результати вказують на те, що ХН та генетична гетерогенність можуть збільшуватись під дією різних за природою стресових факторів та значно впливати на фенотип пухлинних клітин. Особливості МТТ тесту вказують на необхідність аналізу життєздатності/проліферації клітин двома або більшою кількістю незалежних методів для уникнення помилкової інтерпретації результатів. Отримані сублінії клітин гліобластоми (С6, U251 та T98G) та клітин іншого походження (НЕК293 та HeLa) з підвищеною резистентністю до хіміопрепаратів можуть використовуватись для вивчення крос-резистентності до інших лікарських препаратів або для тестування інших терапевтичних підходів.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені в дисертації, отримані за безпосередньої участі здобувача. Особисто здобувачем були отримані сублінії клітин НЕК293pcTM31/2, CL2TM31/2, U251TEM, U251U0126(1/2), T98GTEM та T98GU0126, проведені експерименти із вивчення впливу рекомбінантної конструкції pcDNA3.1_CH3L1 та хіміопрепаратів ТМЗ, ЦИС, TEM і U0126 на хромосомну нестабільність, генетичну гетерогенність, експресію генів, ефективність формування колоній у м'якому агарі, життєздатність, проліферацію і міграцію. Обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Отримання результатів з використанням порівняльної геномної гібридизації було проведено спільно з

к.м.н., доц. Микитенко Д.О. (Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ) та к.б.н. Васецьким Є.С. (CNRS UMR8126, Інститут Рака Гюстава Руссі, Вільжуїф, Франція), аналіз препаратів з диференційним забарвленням хромосом – з д.б.н. Андреевою С.В., аспірантом Корець К.В. (Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії, Київ), к.б.н. Гулеюк Н.Л. (Інститут спадкової патології Національної Академії медичних наук України, Львів) та к.б.н. Ковальновою О.А. (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), стереотактичну імплантацію клітин та моделювання терапевтичної резистентності *in vivo*, отримання субліній С6R1, С6R3ЦИС, С6R4ЦИС – з д.б.н. В.П. Баклаушевим (Російський державний медичний університет Пирогова, Москва). Одержані результати обговорено та надруковано в спільних публікаціях. Здобувач щиро вдячний науковим керівникам д.б.н., професору, член-кореспонденту НАН України В.М. Кавсану, д.б.н. В.В. Дмитренко та д.б.н., професору, член-кореспонденту НАН України А.В. Риндич за корисні поради під час планування експериментів та обговорення отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на поточних наукових семінарах Відділів функціональної геноміки та біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАНУ та на наукових конференціях: VI, VII та VIII конференціях молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2013-2015), IX міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2013), CNIO Frontiers Meeting «Chromosome Instability and Aneuploidy in Cancer: from Mechanisms to Therapeutics» (Madrid, Spain, 2013), 9th Congress «Neuroscience for Medicine and Psychology» (Sudak, Ukraine, 2013), 6th GDRI conference «From Molecular to Cellular Events in Human Pathology» (Paris, France), Human Genome Meeting (Geneva, Switzerland, 2014), 7th GDRI conference «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies» (Riga, Latvia, 2014), XI Українському біохімічному з'їзді (Київ, Україна, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 статей у наукових фахових журналах, 1 глава у монографії «Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic» (під редакцією Siregar Y., InTech Publisher, 2013) та тези 10 доповідей у збірниках матеріалів наукових з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 138 сторінок машинописного тексту. Ілюстрований та числовий матеріал дисертації подано у вигляді 34 рисунків та 1 таблиці. Список використаної літератури охоплює 286 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи досліджень

Клітинні лінії. Клітини НЕК293 (НЕКНЕК293) були люб'язно надані проф. І. Гуттом (Відділ біохімії та молекулярної біології, University College London, Лондон, Великобританія), клітинна лінія гліоми щура С6 – д.б.н. В. П. Баклаушевим (Державний центр соціальної та судової психіатрії ім. В. П. Сербського, Москва, Росія), клітини HeLa_*CHI3L1* (клон 1 та клон 2) – к.б.н. О. І. Балинською (Відділ біосинтезу нуклеїнових кислот, ІМБГ НАН України, Київ, Україна), клітини НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 1) та НЕК293_*CHI3L1* – к.б.н. А. Єршовим (Відділ Біосинтезу Нуклеїнових Кислот, ІМБГ), клітини НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 2) та HeLa – люб'язно надані Відділом сигнальних систем клітин, ІМБГ. Клітини гліобластоми U251 отримані з Банку Клітинних Ліній Тканин Людини і Тварин, Інститут Експериментальної Патології, Онкології та Радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Київ. Клітини гліобластоми T98G отримані з Американського банку клітин та тканин (АТСС). Клітини культивували згідно з рекомендаціями АТСС. Для трансфекції та селекції стабільних трансфектантів використовували 5 μ г плазмідної ДНК на 60-мм чашку, трансфекуючі реагенти jetPEI (Polyplus, США) або Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) та 0,8 мг/мл генетицин сульфату (G418) (Sigma). Антибіотик G418 не додавався до середовища клітин під час проведення тестів.

Диференційне забарвлення хромосом. Хромосомні пластинки були приготовлені акумуляцією метафаз в присутності 0.5 мкг/мл кольцеміда протягом 90 хв с послідуною обробкою 0,056М KCL (20 хвилин) та фіксацією в розчині метанолу та оцтової кислоти (3 до 1 об'єми). Фіксовані ядра були нанесені на вологе скло, підсушені на повітрі та пофарбовані 5% фарбою Гімза (4 хв). Для опису хромосомних змін 20 метафазних пластин були проаналізовані для кожної лінії. Метафазні пластини були сфотографовані, використовуючи мікроскоп Олімпус (Японія), і проаналізовані за допомогою комп'ютерної програми для каріотипування Lucis (версія 1.6.1). Опис аберацій хромосом робили згідно з рекомендаціями Міжнародної системи цитогенетичної номенклатури людини (ISCN 2013). Клональні хромосомні аберації (КХЗ) були визначені як аберації, знайдені принаймні в двох метафазах серед 20 обстежених метафаз, у той час як неклональні хромосомні аберації (НКХЗ) – аберації, виявлені тільки в одній метафазі. Частота НКХЗ в клітинній лінії розраховувалась шляхом співвідношення кількості метафаз з наявністю будь-якої кількості НКХА до загальної кількості обстежених метафаз ($\times 100\%$). Лише структурні НКХА брались до розрахунку. Маркерні хромосоми – структурно аномальні хромосоми, які не можуть бути однозначно охарактеризовані класичними цитогенетичними підходами.

Довготривала обробка клітин хіміопрепаратами. ДНК-метилуючий агент темозоломід (ТМЗ), інгібітор mTOR кінази темзиролімус (ТЕМ) та інгібітор MEK1/2 кіназ U0126 були отримані від Sigma (США) та Abcam Biochemicals (США). Сублінії клітин НЕК293рсТМ31, НЕК293рсТМ32 або CL2ТМ31, CL2ТМ32 були отримані з НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 2) або

HeLa_*CH13L1* (клон 2) клітин, відповідно, шляхом обробки клітин ТМЗ протягом 10 тижнів таким чином: 10, 20, 40, 60, 80, і 100 мкМ протягом 6 тижнів (кожна концентрація два рази на тиждень), потім 120 мкМ ТМЗ два рази на тиждень протягом ще 4 тижнів.

Клітини гліобластоми U251 і T98G обробляли 5 мкМ ТЕМ раз на тиждень протягом 5 тижнів (U251ТЕМ і T98GТЕМ сублінії) або 20 мкМ U0126 два рази на тиждень протягом 5 тижнів (U251U0126(1), U251U0126(2) та T98GU0126 сублінії). Диметилсульфоксид (ДМСО) не перевищував 0.1% за об'ємом в середовищі.

Перед початком аналізу змін геному і фенотипу, клітини культивували 2-3 тижні без додавання інгібіторів.

Аналіз життєздатності клітин МТТ тестом. Клітини НЕК293, HeLa, та їхні деривати – НЕК293_рсDNA3.1, стабільно трансфіковані плазмідною рсDNA3.1, НЕК293_*CH13L1* і HeLa_*CH13L1* (клон 1 та клон 2), які стабільно продукують *CH13L1*, довготривало оброблені ТМЗ деривати НЕК293рсТМ31, НЕК293рсТМ32, CL2ТМ31 і CL2ТМ32 – засівали (у квадруплексах) в 96-лунковий планшет з щільністю 5×10^3 клітин/лунку і вирощували в середовищі DMEM з додаванням 10% FBS протягом 7 днів (в окремих випадках 9 днів). Життєздатність клітин вимірювали з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ, Sigma) у 1-й, 3-й, 5-й та 7-й (в окремих випадках також 9-й) день після посіву. Тест був повторений принаймні чотири рази.

Аналіз проліферації клітин. Клітини висівали на 6 см чашки з щільністю 5×10^4 клітин у DMEM з високим вмістом глюкози (4,5 г/л) з додаванням 10% FBS. На 7-й день посіву, клітини збирали, інкубували з трипановим синім і підраховували за допомогою гемоцитометра. Тест був повторений принаймні три рази.

Аналіз ефективності формування колоній у м'якому агарі. В 6-лункові планшети попередньо заливали підтримуючий шар 0,5% легкоплавкої агарози (Gibco, США), приготованої з використанням середовища DMEM та 10% FBS. Клітини у кількості 5×10^3 на лунку додавали до розплавленої та охолодженої до 37°C 0,35% агарози, приготованої із використанням середовища DMEM з 10% FBS. Через 21 добу колонії візуалізували додаванням 0,005% кристалічного фіолетового та інкубуванням протягом доби при кімнатній температурі. Кількість колоній підраховували за допомогою програми OpenCFU. Тест був повторений принаймні три рази.

Аналіз міграції за допомогою скретч-тесту. U251 і T98G сублінії нарощували до конфлюентності. Скретчі були зроблені шляхом зіскоблювання моношару клітин кінчиком піпетки P200. Клітини промивали PBS і додавали свіжий DMEM з 10% FBS. Фотографії були зроблені в 0 год та 24 год. Автоматизований аналіз зображень проводили з використанням програмного забезпечення TScratch, щоб уникнути будь-якої потенційної упередженості в кількісній оцінці ступеня міграції. Принаймні дванадцять скретчів для кожної клітинної лінії сфотографували і проаналізували, щоб прийняти до уваги

відмінності в щільності клітин і ширині зроблених подряпин/скретчів. Клітини були забарвлені барвником Гімза для збільшення контрасту з фоном у світловій мікроскопії. Відсоток площі закриття скретчу був розрахований виходячи з того, що площа скретчу в 0 год дорівнювала 100%.

Стереотактична імплантація клітин у мозок дорослих імунно-компетентних щурів. Дослідження проведено у відповідності з установленими правилами використання лабораторних тварин на дорослих самках щурів лінії Вістар під кетаміновим наркозом (вага тварин - 200-220 г). Клітини у кількості 5×10^5 /щура були введені за наступними координатами: Ар -1, L 3.0, V 4.5, і TBS - 2.4 мм, згідно Атласу мозку щурів, використовуючи Stereotactic Apparatus (Narishige, Японія) в каудопутамен за допомогою мікрошприцу "Гамільтон" зі швидкістю 3 мкл/хв (загальний об'єм клітин складав 5-10 мкл). Неврологічні ознаки контролювали щотижня. Об'єм пухлини (V) було визначено, виходячи з довжини (l) та ширини (w) пухлини, за формулою: $V = (\pi/6) \times ((l + w)/2)^3$. Щури з С6 гліомами отримували 20% ДМСО (n = 1, С6R1) або 5 мг/кг цисплатин (ЦИС) (n = 2, С6R4ЦИС та С6R5ЦИС), які вводили внутрішньочеревинно три рази на тиждень. Щурів забивали через 10 ін'єкцій. Гліоми механічно роздроблювали, і суспензію клітин висівали на адгезивні чашки. Клітини використовували для аналізу на пасажах 3-10.

Магнітно-резонансна томографія (MPT) in vivo. Щурам було введено розчин гадопентенової кислоти (Gd-DTPA). Прижиттєву візуалізацію пухлин виконували за допомогою MPT на томографі BioSpec 70/30 (Bruker, Італія) з постійним магнітним полем 7 Тесла.

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми Statistica 10 (США) із використанням Т-тесту для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартної похибки ($\pm S.D.$) середнього значення. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ та *** $p \leq 0,001$.

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив стабільної трансфекції порожньої плазміди pcDNA3.1 або рекомбінантного вектору pcDNA3.1_CHI3L1 на каріотип та фенотип клітин ліній НЕК293 та HeLa. Модальні числа хромосом контрольних ліній НЕК293_pcDNA3.1 (варіант 1) (68-70 хромосом/клітина), НЕК293_pcDNA3.1 (варіант 2) (68-72 хромосом/клітина), стабільно трансфєкованих порожньою плазмідною, та лінії НЕК293_CHI3L1 (67-71 хромосом/клітина), стабільно трансфєкованої рекомбінантним вектором pcDNA3.1_CHI3L1, були нижчі, ніж вихідної немодифікованої лінії НЕК293 (72-76 хромосом/клітина) (рис. 1).

Для візуалізації відмінностей каріотипу між клітинними лініями ми використали каріографи, трьохмірні графіки, де X-вісь позначає нормальні і аномальні хромосоми (клональні хромосомні зміни і неклональні хромосомні зміни, КХЗ/НКХЗ), Y-вісь – кількість копій кожної хромосоми (окремо інтактні і аномальні), і Z-вісь – кількість проаналізованих метафаз (20 метафаз).

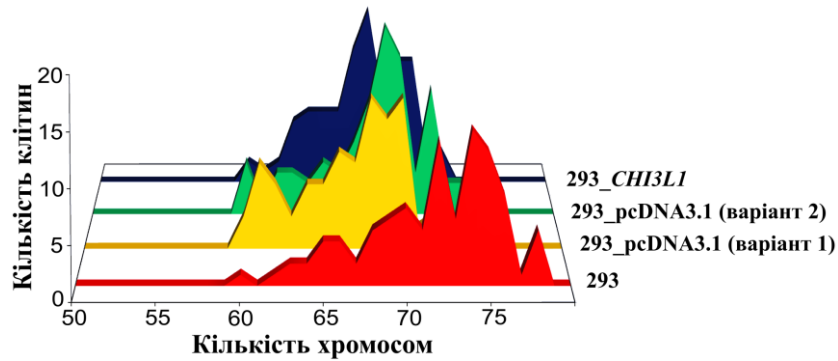


Рис. 1. Розподіл кількості хромосом між 200 клітинами кожної лінії

Каріографи дають змогу наглядно продемонструвати ступінь клональності і гетерогенності між клітинами лінії шляхом порівняння кількості копій інтактних і аномальних хромосом метафаз одна до одної. Відмінності між каріотипами клітинних ліній були візуалізовані вирівнюванням та порівнянням каріографів батьківських, контрольних та експериментальних клітин.

Клітини НЕК293_pcDNA3.1 (варіант 1) і незалежно отримані та довший час культивовані клітини НЕК293_pcDNA3.1 (варіант 2) мали збільшену кількість КХЗ та кількість і частоту НКХЗ в порівнянні з клітинами лінії НЕК293 (рис. 2). Кожен варіант ліній НЕК293_pcDNA3.1 характеризувався багатьма новими специфічними КХЗ, що вказує на стохастичні зміни каріотипу після одного і того ж типу стресу. Клітини НЕК293_CHI3L1 також придбали багато нових КХЗ у порівнянні з клітинами лінії НЕК293 (рис. 2). У похідних ліній НЕК293 середня кількість маркерних хромосом (структурно аномальних хромосом, які не можуть бути однозначно охарактеризовані класичними цитогенетичними підходами) збільшилась у середньому в 1.6-1.7 разів.

Таким чином, стабільна трансфекція як рекомбінантного вектору pcDNA3.1_CHI3L1, так і порожньої плазмідної ДНК pcDNA3.1 та відбір клітинних субліній, стійких до цитотоксичного антибіотика генетицин сульфату (G418), сприяло підвищенню кількості КХЗ і НКХЗ (збільшення рівня ХН) в клітинах лінії НЕК293. Стабільна трансфекція плазмідної ДНК може діяти як генотоксичний стрес-фактор і мати дестабілізуючий вплив на геном. Зміни рівня нестабільності геному і генетичної гетерогенності збільшує імовірність адаптації пухлинних клітин до цитотоксичного стресу.

Життєздатність клітин НЕК293_CHI3L1 була вище, ніж обох варіантів контрольних клітин НЕК293_pcDNA3.1 або немодифікованих клітин НЕК293. У свою чергу, життєздатність обох варіантів клітин НЕК293_pcDNA3.1 була нижче, ніж немодифікованих клітин НЕК293 (рис. 3 а). Ефективність формування колоній (ЕФК) у напіврідкому агарі клітинами НЕК293_CHI3L1 та обома варіантами клітин НЕК293_pcDNA3.1 була вище, ніж ЕФК немодифікованими клітинами лінії НЕК293, при цьому ЕФК клітинами НЕК293_CHI3L1 була найвищою (рис. 3 б).

Таким чином, стабільна трансфекція плазмідної ДНК pcDNA3.1 значно вплинула на фенотип клітин НЕК293. Збільшення ХН корелювало із зниженням

життєздатності. Ектопічна продукція *CHI3L1* врівноважувала негативний вплив ХН високого рівня на життєздатність.

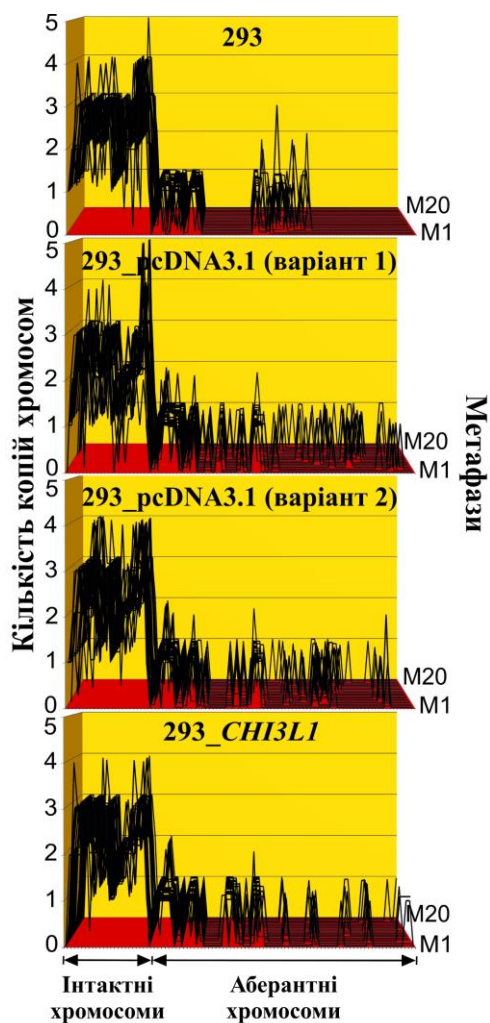


Рис. 2. Стабільна трансфекція як рекомбінантним вектором *pcDNA3.1_CHI3L1*, так і порожньою плазмідною *pcDNA3.1* сприяє ХН клітин HEK293

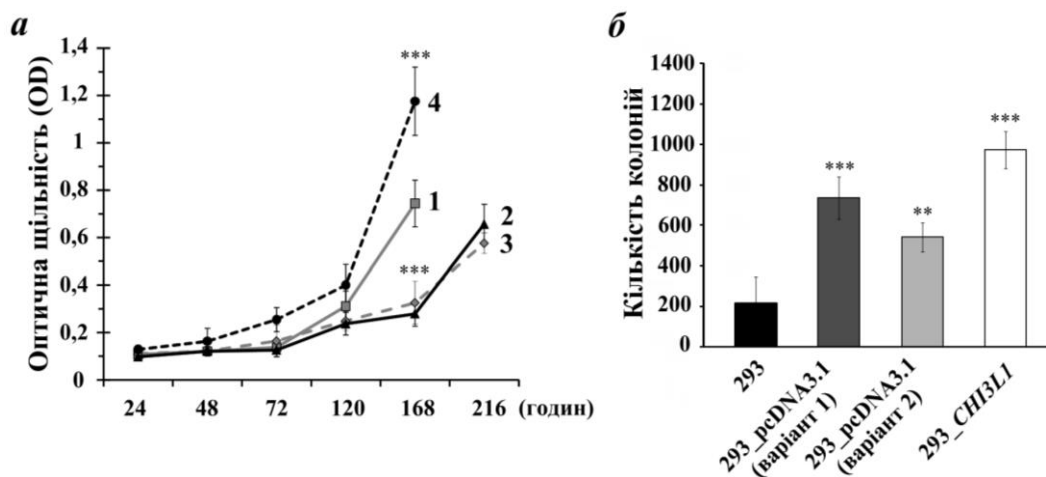


Рис. 3. Порівняння кривих життєздатності клітин HEK293 (1), HEK293_ *pcDNA3.1* (варіант 1) (2), HEK293_ *pcDNA3.1* (варіант 2) (3) та HEK293_ *CHI3L1* (4) (а); порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі (б). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Модальні числа хромосом клонів 1 і 2 клітин HeLa_ *CHI3L1* (69-73 і 72-74 хромосом/клітина, відповідно) були вищі, ніж немодифікованої лінії клітин

HeLa (68-71 хромосом/клітина) (рис. 4 а) (контрольні клітини HeLa_pcDNA3.1 були недоступні для аналізу).

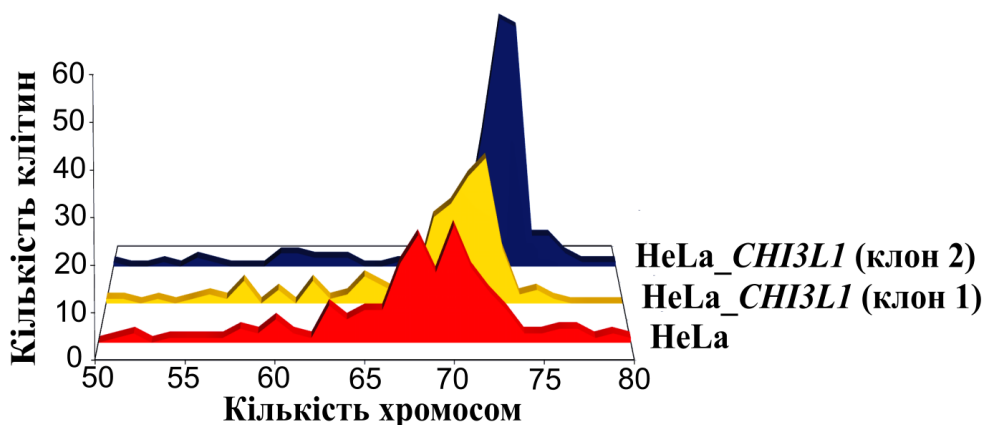


Рис. 4. Розподіл кількості хромосом між 200 клітинами кожної лінії

Таким чином, зміни модального числа хромосом у похідних клітин ліній HEK293 і HeLa були протилежними (зменшення і зростання, відповідно).

Клітини HeLa_CHI3L1 (клон 1, 40 пасажів після pcDNA3.1_CHI3L1 трансфекції, 20 – після клонування) характеризувалися зниженням кількості КХЗ і відсутністю НКХЗ у порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa. На відміну від цього, клітини HeLa_CHI3L1 (клон 1) після 70 пасажів (50 пасажів після клонування) вже демонстрували придбання 9 нових КХЗ і підвищення кількості НКХЗ (рис. 5). Поступове/ступінчасте накопичення хромосомних аберацій, на нашу думку, скоріше вказує на зміни у хромосомах в результаті дії інших факторів (наприклад, внутрішня нестабільність анеуплоїдного стану та вплив високої продукції CHI3L1), ніж на побічні ефекти інтеграції pcDNA3.1 вектору та придбання стійкості до G418 антибіотика.

Клітини HeLa_CHI3L1 (клон 2, 60 пасажів після pcDNA3.1_CHI3L1 трансфекції, 40 пасажів після клонування) мали 9 нових КХЗ і збільшення кількості НКХЗ в порівнянні з батьківськими клітинами HeLa. Більшість КХЗ в клонах HeLa_CHI3L1 відрізнялися (рис. 5). Цікаво, що середня кількість маркерних хромосом в клонах HeLa_CHI3L1 зменшилася у 1.7-2.0 рази. Цей факт свідчить про те, що клонування веде до значного зменшення генетичної гетерогеності популяції, яка не відновлюється у відносно стабільних сублініях навіть після довготривалого культивування клонів. З іншого боку, збільшення каріотипічної гетерогеності популяції клітин спостерігалось навіть протягом короткого періоду часу для ліній з високим рівнем ХН, вказуючи на те, що вкрай нестабільні популяції клітин не можуть бути взагалі клоновані в строгому сенсі цього поняття (Abdallah *et al.*, 2013).

Незважаючи на ектопічну продукцію CHI3L1 клонами клітин HeLa_CHI3L1, їхня життєздатність і ЕФК були нижчі в порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa (рис. 6 а, б).

Таким чином, ми спостерігали протилежні зміни фенотипу між HeLa_CHI3L1 клонами і HEK293_CHI3L1 клітинами.

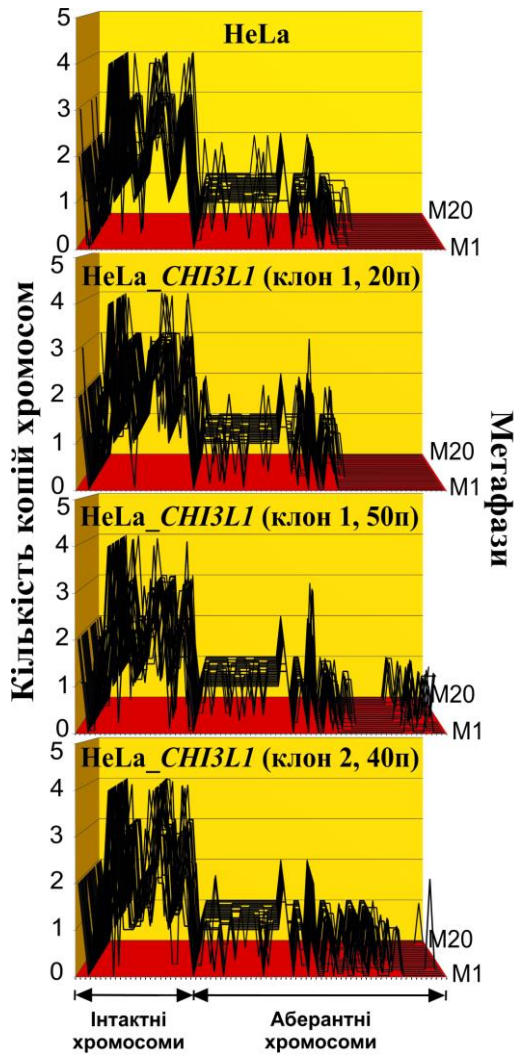


Рис. 5. Клоні клітин HeLa_CHI3L1 характеризуються низьким рівнем хромосомної нестабільності (ХН). Клон 1 був каріотипован на пасажах 20 та 50 після клонування, клон 2 – на 40 пасажі

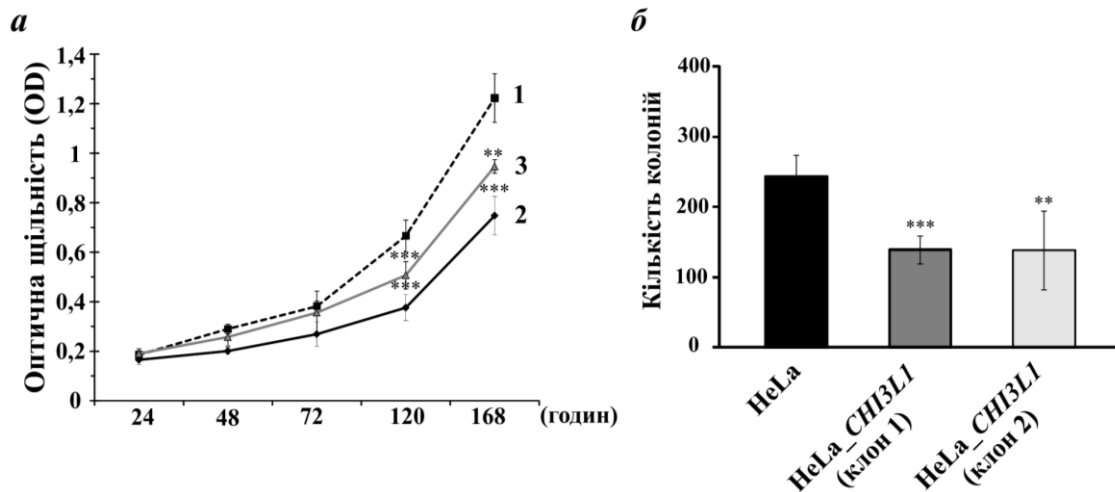


Рис. 6. Порівняння кривих життєздатності клітин HeLa (1), HeLa_CHI3L1 (клон 1) (2), HeLa_CHI3L1 (клон 2) (3) (а); порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі (б). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Вплив довготривалої обробки темозоломідом (ТМЗ) на каріотип та фенотип клітин ліній HEK293_рсDNA3.1 та HeLa_CHI3L1. Щоб виявити, як додатковий генотоксичний стрес впливає на каріотип і фенотип клітин з

високим або низьким рівнем ХН, ми використали НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 2) та HeLa_СНІ3L1 (клон 2) клітини. Дві сублінії клітин, а саме НЕК293рсТМ31 і НЕК293рсТМ32 та CL2ТМ31 і CL2ТМ32, були отримані шляхом довготривалої обробки НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 2) та HeLa_СНІ3L1 (клон 2) клітин, відповідно, зростаючими концентраціями ТМЗ (10-120 μM) протягом 10 тижнів, після чого клітини культивували протягом трьох тижнів у середовищі без ТМЗ, щоб уникнути при аналізі тимчасових ефектів ТМЗ на фенотип та дати селектуватися більш стабільним і життєздатним каріотипам після останнього додавання ТМЗ (всього додаткових 25-30 пересівів клітин).

Зміни каріотипу клітин НЕК293рсТМ31 супроводжувались втратою 15 КХЗ, придбанням 11 нових КХЗ та високою частотою і загальною кількістю НКХЗ (рис. 7). Точно так само зміни каріотипу клітин НЕК293рсТМ32 супроводжувались втратою 22 КХЗ, придбанням 15 нових КХЗ і високою, але зменшеною загальною кількістю і частотою НКХЗ при порівнянні з клітинами НЕК293_рсDNA3.1 (варіант 2) (рис. 7). Більшість придбаних КХЗ були індивідуальні в лініях НЕК293рсТМ31 та НЕК293рсТМ32, що знову вказує на стохастичність змін каріотипу у відповідь на той самий тип стресу. Середня кількість маркерних хромосом на клітину виросла в лінії НЕК293рсТМ31, але зменшилась в лінії НЕК293рсТМ32.

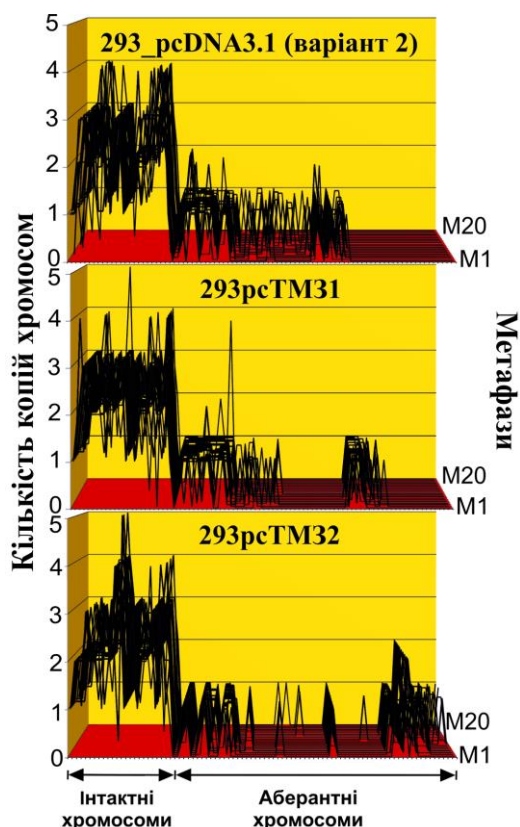


Рис. 7. Клітини НЕК293рсТМ31 і НЕК293рсТМ32 мають високий рівень хромосомної нестабільності (ХН)

Життєздатність і ЕФК клітинами НЕК293рсТМ31 і НЕК293рсТМ32 суттєво зменшились (рис. 8 а, б).

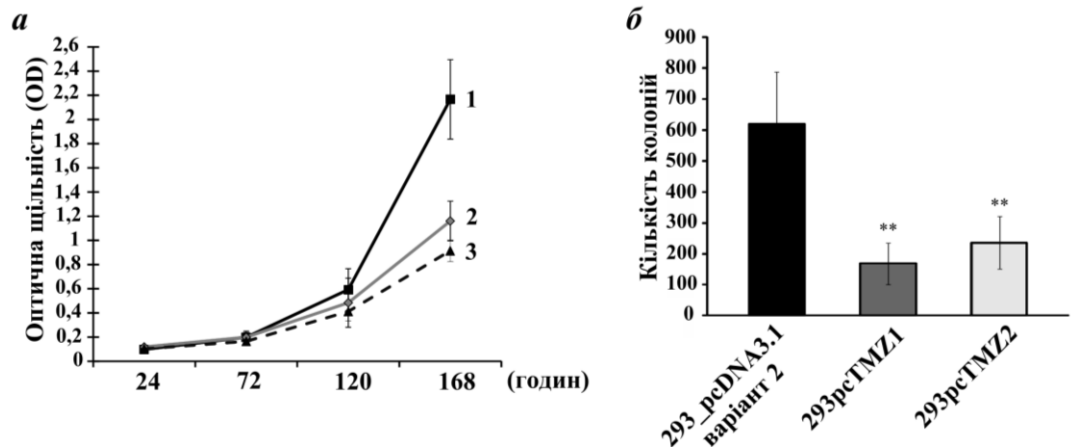


Рис. 8. Порівняння кривих життєздатності клітин HEK293_rcDNA3.1 (варіант 2) (1), HEK293rcTM31 (2), HEK293rcTM32 (3) (а); порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі (б). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким чином, послідовний вплив генотоксичних стресів різної природи (стабільна трансфекція векторної ДНК/резистентність до G418 та довготривала обробка клітин генотоксичним препаратом ТМЗ) на клітини HEK293 індукував високий рівень ХН з негативним впливом на життєздатність і ЕФК.

Клітини CL2TM31 і CL2TM32 зменшили кількість КХЗ, тоді як ніяких суттєвих змін в кількості і частоті НКХЗ не було виявлено при порівнянні з клітинами HeLa_CHI3L1 (клон 2) (рис. 9). Середня кількість маркерних хромосом істотно не змінилась.

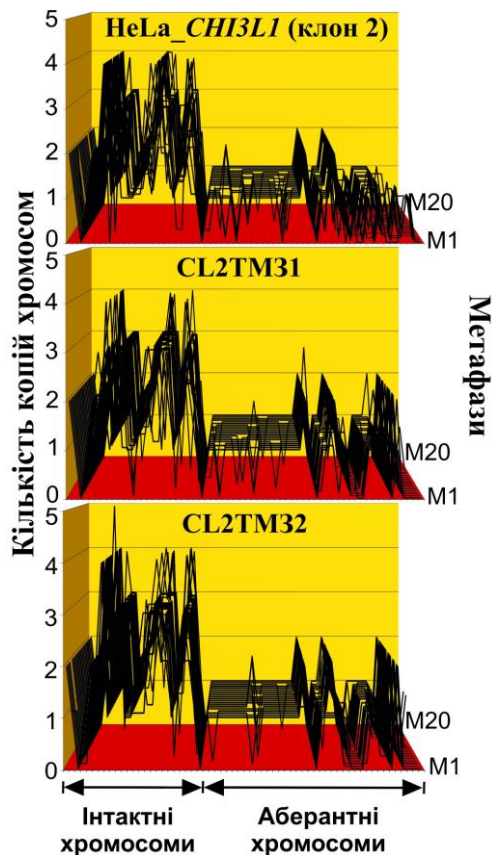


Рис. 9. Клітини CL2TM31 та CL2TM32 характеризуються низьким рівнем хромосомної нестабільності (ХН)

Життєздатність клітин CL2TM31 не змінилась, тоді як клітин CL2TM32 збільшилась, незважаючи на те, що ефективність адгезії знизилась (точка «24 години» на кривій життєздатності) (рис. 10 а). Клітини CL2TM31 і CL2TM32 формували більше колоній у м'якому агарі, ніж клітини HeLa_*CHI3L1* (клон 2) (рис. 10 б). Зміни фенотипу не корелювали з ектопічною продукцією *CHI3L1*, яка зменшилась після довготривалої обробки клітин ТМЗ.

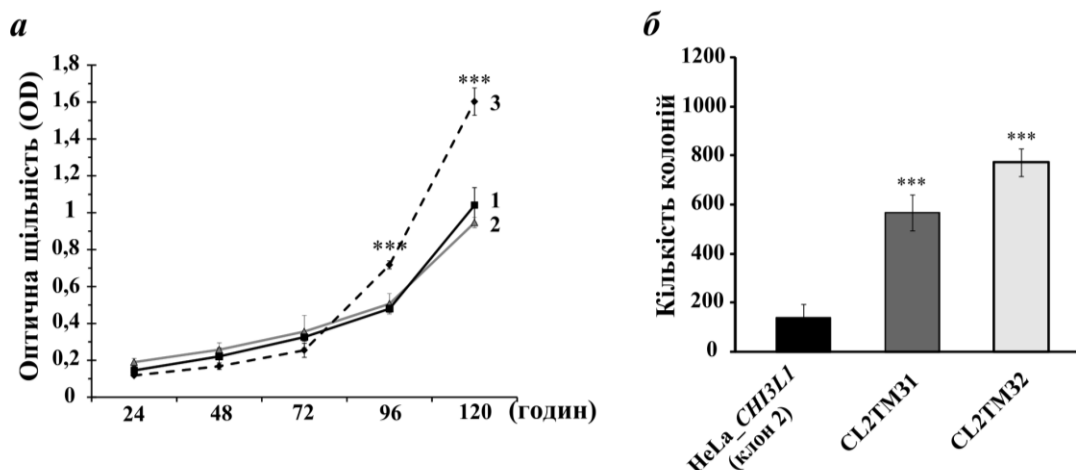


Рис. 10. Порівняння кривих життєздатності клітин HeLa_*CHI3L1* (клон 2) (1), CL2TM31 (2), CL2TM32 (3) (а); порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі (б). ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким чином, продемонстровано як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією клінічного хіміопрепарата темозоломід.

Вплив терапії цисплатином гліоми щура С6 in vivo на кількість копій хромосомних локусів та характеристики росту виділених з пухлини резистентних клітин С6R4ЦИС і С6R5ЦИС. Варіації кількості копій хромосомних локусів, виявлених за допомогою порівняльної геномної гібридизації, в клітинах С6R4ЦИС і С6R5ЦИС після лікування цисплатином не змінилися при порівнянні з контрольними клітинами С6R1.

Різниця між проліферацією клітин С6R1 і С6R4ЦИС не було виявлено. Однак, клітини С6R5ЦИС знизили проліферативну активність (рис. 11 а). Крім того, не спостерігалось значної різниці в ЕФК між клітинами С6R1 і С6R4ЦИС або С6R5ЦИС (рис. 11 б).

Ми спостерігали зниження проліферації клітин С6R1, С6R4ЦИС і С6R5ЦИС, а також ЕФК клітинами С6R4ЦИС і С6R5ЦИС у порівнянні з немодифікованими клітинами С6 (Рис. 11 а, б). Те, що лікування цисплатином зменшує швидкість росту гліом С6 і збільшує виживаність щурів, але не впливає на стабільність хромосом та характеристики росту клітин С6 *in vitro*, які вижили після лікування *in vivo*, вказує скоріше на цитостатичний, ніж генотоксичний ефект цисплатину на клітини С6 *in vivo*.

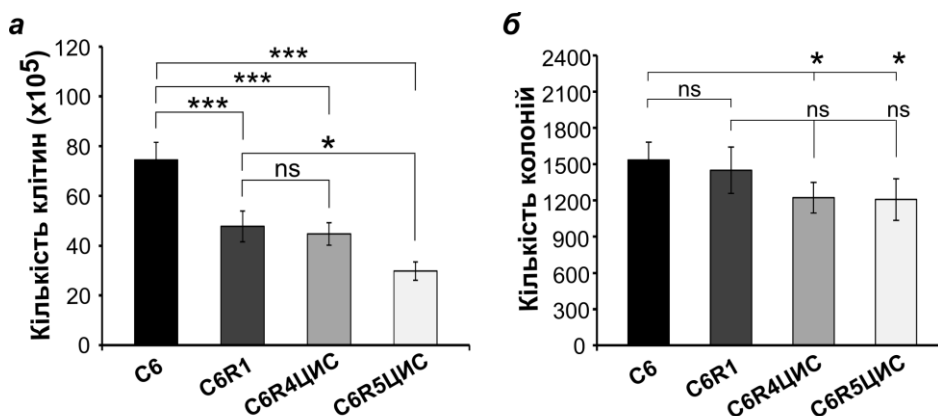


Рис. 11. Порівняння проліферації клітин (а); порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі (б). * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$; ns, не суттєво

Вплив довготривалої обробки темзіролімусом (ТЕМ) або U0126 на каріотип та фенотип клітин гліобластоми ліній U251 та T98G. Для характеристики опосередкованих ТЕМ і U0126 змін каріотипу і фенотипу клітинних ліній гліобластоми були отримані сублінії U251ТЕМ, U251U0126(1), U251U0126(2), T98GТЕМ і T98GU0126 шляхом багаторазової обробки ТЕМ або U0126 клітин U251 і T98G *in vitro*. Контрольні клітини U251 мали гіпердиплоїдний каріотип із середньою кількістю хромосом 53 ± 9.2 . На відміну від цього, клітини U251ТЕМ представляли собою суміш гіпердиплоїдних і поліплоїдних клітин із середньою кількістю хромосом 88.5 ± 25.1 . Зміни каріотипу лінії U251ТЕМ супроводжувались втратою 8 КХА, придбанням 17 нових КХА і збільшенням загальної кількості і варіації між клітинами НКХА (рис. 12).

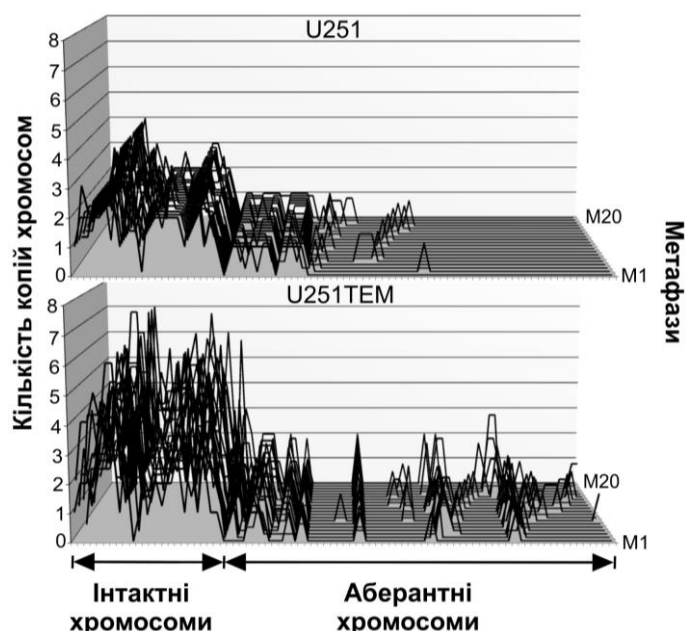


Рис. 12. Довготривала обробка темзіролімусом (ТЕМ) клітин U251 збільшує рівень поліплоїдизації та хромосомної нестабільності (ХН)

Клітини T98G і T98GТЕМ мали головним чином пентаплоїдний каріотип з середньою кількістю хромосом 121.5 ± 8.7 і 120.9 ± 12.8 , відповідно. Зміни

каріотипу T98GTEM лінії супроводжувались втратою 7 КХА, придбанням 26 нових КХА і значним збільшенням загальної кількості, частоти і варіації між клітинами НКХА (рис. 13).

Таким чином, рівень ХН зростав у клітинах гліобластоми U251 та T98G після довготривалої обробки клінічним таргетним хіміопрепаратом темзиролімусом (ТЕМ), інгібітором mTOR кінази.

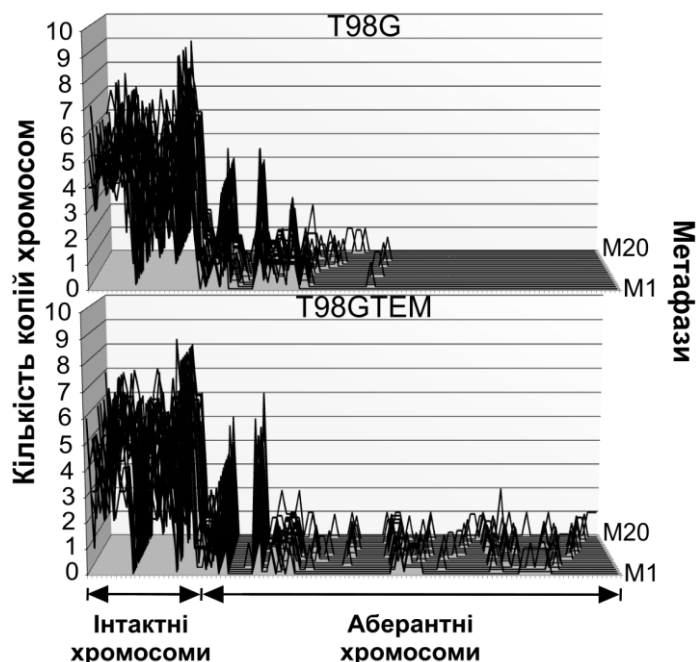


Рис. 13. Довготривала обробка темзиролімусом (ТЕМ) клітин T98G збільшує рівень хромосомної нестабільності (ХН)

U251ТЕМ клітини знизили проліферацію, в той час як U251U0126(1) і U251U0126(2) клітини проліферували в два рази швидше, ніж контрольні U251 клітини. На противагу цьому, ніякої відмінності в проліферації між T98G і T98GТЕМ або T98GU0126 лініями не спостерігалось (рис. 14).

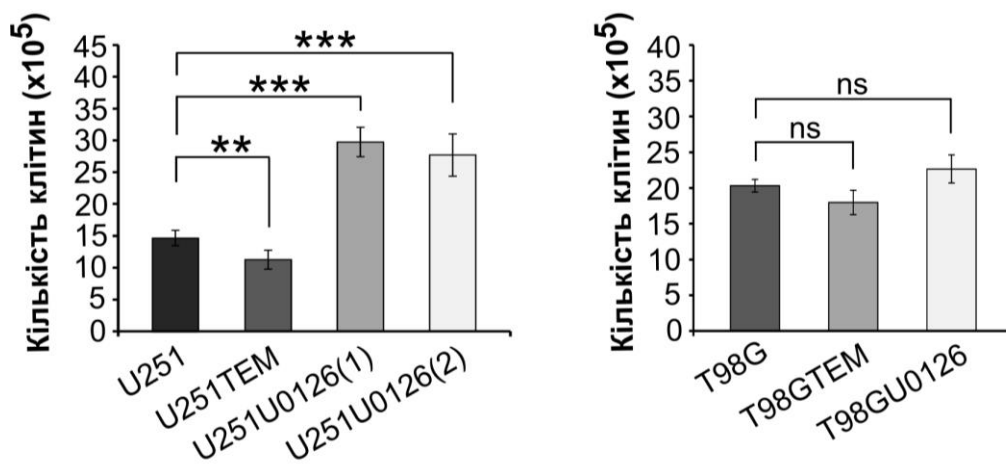


Рис. 14. Порівняння проліферації клітин. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; ns, не суттєво

Аналіз ефективності формування колоній (ЕФК) не виявив ніякої різниці між U251 і U251U0126(1) або U251U0126(2) клітинами. Аналогічно, ніякої

різниці в ЕФК не спостерігалось між T98G і T98GTEM або T98GU0126 клітинами. На противагу цьому, клітини U251TEM формували значно меншу кількість колоній (рис. 15).

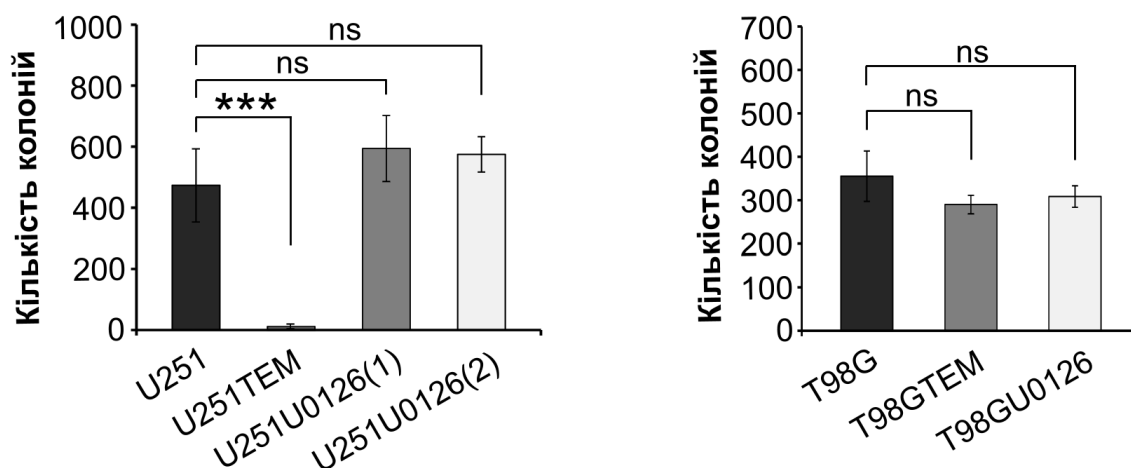


Рис. 15. Порівняння ефективності формування колоній (ЕФК) в м'якому агарі. *** $P \leq 0,001$; ns, не суттєво

Міграційний тест показав, що клітини U251TEM мігрували значно повільніше, в той час як клітини U251U0126(1) і U251U0126(2) помірно повільніше, ніж контрольні клітини U251. На противагу цьому, ніякої відмінності в міграції не спостерігалось між клітинами T98G і T98GTEM або T98GU0126 (рис 16).

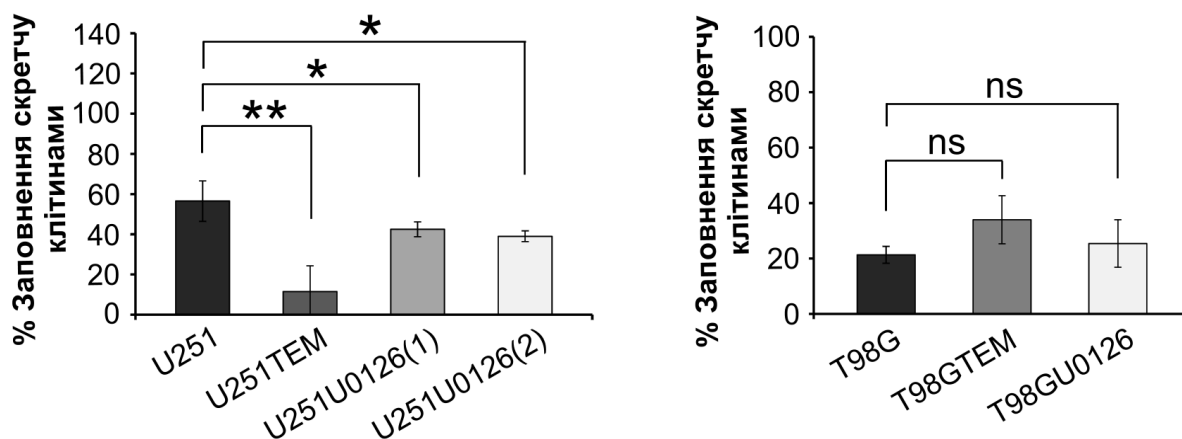


Рис. 16. Порівняння міграційного потенціалу клітин. * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$; ns, не суттєво

Таким чином, рівень ХН зростав в гліальних клітинах U251 та T98G після довготривалої обробки клінічним таргетним хіміопрепаратом темзиролімусом (TEM), інгібітором mTOR кінази. Довготривала обробка пухлинних клітин таргетними препаратами індукує клітинно-специфічні і інгібітор-специфічні адапційні фенотипові зміни.

В цілому, зміни рівня ХН і асоційовані з цим зміни фенотипу (популяційна гетерогенність) можуть бути спрямовані на адаптацію пухлинних

клітин до стресових факторів різної природи та мутаційного і немутаційного механізму дії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі охарактеризована хромосомна нестабільність та фенотип пухлинних клітин гліального та негліального походження після впливу стресових факторів різної природи. Встановлено, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК або трансгена *CH13L1*, а також довготривала обробка клітин терапевтичними хіміопрепаратами впливає на фенотип пухлинних клітин через зміни рівня нестабільності геному. Хромосомна нестабільність та генетична гетерогенність можуть бути універсальним механізмом адаптації пухлинних клітин до стресів різної природи.

1. Клітини HEK293_pcDNA3.1 мають підвищений рівень хромосомної нестабільності та зміни фенотипу. Ектопічна продукція *CH13L1* підвищила життєздатність клітин HEK293_*CH13L1* і ефективність формування ними колоній, тоді як для клітин HeLa_*CH13L1* були виявлені протилежні зміни фенотипу.

2. Вперше продемонстровано як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією довготривалої обробки (10 тижнів, 10-120 μM) клінічним хіміопрепаратом темозоломідом.

3. Терапія цисплатином гліоми щура С6 *in vivo* (4 тижні, 10 ін'єкцій, 5 мг/кг) не впливає на кількість копій хромосомних локусів та характеристики росту виділених з пухлин резистентних клітин.

4. Вперше показано, що рівень клональних і неклональних хромосомних аберацій зростає у клітинах гліобластоми U251 та T98G після 5 тижнів обробки клінічним таргетним хіміопрепаратом темзіролімусом, інгібітором mTOR кінази (5 μM). Обробка клітин U251 інгібітором MEK кіназ U0126 (5 тижнів, 20 μM) збільшила їхню проліферацію вдвічі.

5. Ступінь недооцінки/переоцінки життєздатності клітин в МТТ тесті у порівнянні з прямим підрахунком клітин після короткої або довготривалої обробки інгібіторами темозоломідом, темзіролімусом або U0126 залежить від клітинної лінії, концентрації препарату, часу вимірювання життєздатності після додавання інгібітора та інших параметрів експерименту.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreieva, K.V. Korets, D.O. Mykytenko, V.P. Vaklaushev, V.P. Chekhonin, V.V. Dmitrenko // Gene. – 2016. – Vol. 579, N. 1. – P. 58-68. *Особистий внесок здобувача: отримання субліній клітин, аналіз проліферації, міграції, ефективності формування колоній та експресії білків.*

2. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability / A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko // Gene. – 2015. – Vol. 579, N. 1. – P. 58-68. *Особистий внесок здобувача: отримання субліній клітин, аналіз проліферації, аналіз життєздатності.*
3. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets, D. Mykytenko, N. Huleyuk, Y. Vassetzky, V. Kavsan // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2015. – Vol. 31, N. 4. – P. 209-217. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*
4. Cisplatin treatment of C6 rat glioma *in vivo* did not influence copy number alterations and growth pattern of tumor-derived resistant cells / A.A. Stepanenko, V.P. Baklaushev, Y.S. Vassetzky, V.V. Dmitrenko // Biopolymers and Cell. – 2015, Vol. 31, N. . – P. 209-217. *Особистий внесок здобувача: аналіз проліферації і ефективності формування колоній в м'якому агарі.*
5. Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 glioma cell lines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities / A. Stepanenko, V. Kavsan // Gene. – 2014. – Vol. 540, N. 2. – P. 263-265. *Особистий внесок здобувача: аналіз змін каріотипу і фенотипу клітин ліній одного походження.*
6. Structure and function of oncogene-transfected immortal cells / V.M. Kavsan. T.A. Kulagova, T.A. Kuznetsova, G.N. Semenкова, A.A. Stepanenko, Y.S. Vassetzky // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 25-28. *Особистий внесок здобувача: аналіз змін каріотипу субліній клітин HEK293.*
7. Antagonistic functional duality of cancer genes / A. Stepanenko, Y. Vassetzky, V. Kavsan // Gene. – 2013. – Vol. 529, N. 2. – P. 199-207. *Особистий внесок здобувача: аналіз генів, які в різних умовах експерименту демонстрували як онкогенні так і пухлино-супресорні властивості.*
8. Evolutionary karyotypic theory of cancer *versus* conventional cancer gene mutation theory / A. Stepanenko, V. Kavsan // Biopolym. Cell. – 2012. – Vol. 28, N. 2. – P. 267-280. *Особистий внесок здобувача: порівняльний аналіз генної і геномної теорії раку.*
9. Immortalization and malignant transformation of eukaryotic cells / A. Stepanenko, V. Kavsan // Tsitol. Genet. – 2012. – Vol. 46, N. 2. – P. 96-129. *Особистий внесок здобувача: аналіз іморталізації і малігнізації клітин.*
10. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in immortalized HEK293 cells / A. A. Stepanenko, S. V. Andreieva, D. A. Mikitenko, N. Huleyuk, L. L. Lukash, V. V. Dmitrenko, V. M. Kavsan // VI конференція молодих вчених ІМБГ НАН України, Київ, Україна. – 2013. – P. 26. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*
11. Expression of *CHI3L1* in plasmid vector, vector DNA itself, and cytotoxic drug temozolomide promote karyotype and phenotype evolution of tumor cells / A. A. Stepanenko, V. P. Baklaushev, K. V. Korets, S. V. Andreieva, D. O. Mykytenko, Y. S. Vassetzky, V. P. Chekhonin, V. M. Kavsan // VII конференція молодих

вчених ІМБГ НАН України, Київ, Ukraine. – 2014. – Р. 20. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*

12. Temozolomide promotes the diverse genome and phenotype changes of glioblastoma cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreieva, K.V. Korets, D.O. Mykytenko, N.L. Huleyuk, O.A. Kovaleva, V.P. Baklaushev, V.P. Chekhonin, Y.S. Vassetzky, V.V. Dmitrenko // VIII конференція молодих вчених ІМБГ НАН України, Київ, Ukraine. – 2015. – Р. 13. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі.*

13. Karyotype evolution drives phenotype changes in transgenic cell lines / Stepanenko A.A., Korets K.V., Andreeva S.V., Huleyuk N.R., Mykytenko D.O., Vassetzky Y.S., Kavsan V.M. // XI Ukrainian Biochemistry Congress, Kyiv, Ukraine. – 2014. – Р. 33. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*

14. Both constitutive expression of CHI3L1 in plasmid vector and vector DNA itself promote chromosome instability and phenotype changes in immortalized cells / Stepanenko A.A., Andreeva S.V., Huleyuk N.R., Mykytenko D.O., Kavsan V.M. // Human Genome Meeting “Genome variation and human health”, Geneva, Switzerland. – 2014 – Р. 102. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1*

15. Evolutionary karyotypic theory *versus* conventional cancer gene mutation theory / Stepanenko A.A., Andreeva S.V., Mikitenko D.A., Dmitrenko V.V., Huleyuk N.O., Kavsan V.M. // 9th Congress ‘Neuroscience for Medicine and Psychology’, Sudak, Ukraine. – 2013. – Р.313. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*

16. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in HEK293 cells / Stepanenko A.A., Andreeva S.V., Mikitenko D.A., Dmitrenko V.V., Huleyuk N.O., Kavsan V.M., Vassetzky Y.S. // CNIO Frontiers Meeting ‘Chromosomal Instability and Aneuploidy in Cancer: from Mechanisms to Therapeutics’, Madrid, Spain. – 2013. – Р. 112. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*

17. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in immortalized HEK293 cells / Stepanenko AA, Andreeva SV, Mikitenko DA, Dmitrenko VV, Huleyuk NO, Kavsan VM // IX internat. scientific conference. ‘Молодь і поступ біології’, Lviv, Ukraine. – 2013 – Р.389. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, ефективності формування колоній в м'якому агарі, експресії CHI3L1.*

АНОТАЦІЯ

Степаненко О.А. Вплив терапевтичних хіміопрепаратів і стабільної трансфекції гена *CH3L1* на геном та фенотип пухлинних клітин. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2016.

Робота присвячена аналізу хромосомної нестабільності і фенотипа пухлинних клітин гліального та негліального походження після впливу цитотоксичних стресових факторів. Встановлено, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК або трансгена *CH3L1*, а також довготривала обробка клітин терапевтичними хіміопрепаратами (темозоломід, цисплатин, темзиролімус, U0126) впливає на фенотип пухлинних клітин через зміни рівня нестабільності геному. Хромосомна нестабільність може бути універсальним механізмом адаптації пухлинних клітин до стресів різної природи.

Показано, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК pcDNA3.1 викликала збільшення рівня хромосомної нестабільності (клональні і неклональні хромосомні аберації) в клітинах HEK293_pcDNA3.1, що супроводжувалось зниженням їхньої життєздатності та збільшенням ефективності формування колоній (ЕФК) у м'якому агарі. Ектопічна продукція *CH3L1* підвищувала життєздатність і ЕФК клітинами HEK293_*CH3L1* у порівнянні з контрольними HEK293_pcDNA3.1 або немодифікованими вихідними клітинами HEK293. Незважаючи на ектопічну продукцію *CH3L1* клонами клітин HeLa_*CH3L1*, їхня життєздатність і ЕФК були навпаки нижчі в порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa.

Продемонстровано як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією клінічного хіміопрепарата темозоломїду.

Терапія клінічним хіміопрепаратом цисплатином гліоми щура C6 *in vivo* не вплинуло на кількість копій хромосомних локусів та патерн росту виділених з пухлин резистентних клітин.

Показано, що рівень клональних і неклональних хромосомних аберацій зростав в гліальних клітинах U251 та T98G після довготривалої обробки клінічним таргетним хіміопрепаратом темзиролімусом (ТЕМ), інгібітором mTOR кінази. U251ТЕМ клітини знизили проліферацію, ЕФК і міграцію, тоді як ніякої відмінності між T98G і T98GТЕМ клітинами не спостерігалось. Довготривала обробка клітин U251, але не T98G, таргетним інгібітором MEK кіназ U0126 збільшила їхню проліферацію вдвічі. Таким чином, довготривала обробка пухлинних клітин таргетними препаратами індукує клітинно-специфічні і інгібітор-специфічні адапційні ефекти.

Ключові слова: анеуплоїдія, геном, *CH3L1*, темзиролімус, темозоломід, фенотип, хромосомна нестабільність.

АННОТАЦИЯ

Степаненко А.А. Влияние терапевтических химиопрепаратов и стабильной трансфекции гена *CH3L1* на геном и фенотип опухолевых клеток. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

Работа посвящена анализу хромосомной нестабильности и фенотипа опухолевых клеток глиального и неглиального происхождения после воздействия цитотоксических стрессовых факторов. Установлено, что стабильная трансфекция плазмидной ДНК, трансгена *CH3L1* или долговременная обработка клеток терапевтическими химиопрепаратами (темозоломид, цисплатин, темзиролимус, U0126) влияет на фенотип опухолевых клеток через изменения уровня нестабильности генома. Хромосомная нестабильность может быть универсальным механизмом адаптации опухолевых клеток к стрессам различной природы.

Стабильная трансфекция плазмидной ДНК pcDNA3.1 вызвала увеличение уровня хромосомной нестабильности в клетках HEK293_pcDNA3.1, снизила их жизнеспособность и увеличила эффективность формирования колоний (ЭФК) в мягком агаре. Эктопическая продукция *CH3L1* повысила жизнеспособность и ЭФК клетками HEK293_*CH3L1* по сравнению с контрольными HEK293_pcDNA3.1 или родительскими HEK293 клетками. Несмотря на эктопическую продукцию *CH3L1* клонами клеток HeLa_*CH3L1*, их жизнеспособность и ЭФК были наоборот ниже по сравнению с родительскими клетками HeLa.

Продемонстрировано как увеличение, так и уменьшение геномной гетерогенности и агрессивности злокачественного фенотипа клеток под действием клинического химиопрепарата темозоломида.

Терапия клиническим химиопрепаратом цисплатином клеток С6 глиомы крысы *in vivo* не повлияла на количество копий хромосомных локусов и паттерн роста выделенных из опухолей резистентных клеток.

Уровень клональных и неклональных хромосомных aberrаций вырос в глиальных клетках U251 и T98G после длительной обработки клиническим таргетным химиопрепаратом темзиролимусом (ТЕМ), ингибитором mTOR киназы. U251ТЕМ клетки снизили пролиферацию, ЭФК и миграцию, тогда как никакого различия между T98G и T98GТЕМ клетками не наблюдалось. Долговременная обработка клеток U251, но не T98G, таргетным ингибитором MEK киназ U0126 увеличила их пролиферацию вдвое. Таким образом, длительная обработка опухолевых клеток таргетными препаратами индуцирует клеточно-специфические и ингибитор-специфические адаптационные эффекты.

Ключевые слова: анеуплоидия, геном, *CH3L1*, темзиролимус, темозоломид, фенотип, хромосомная нестабильность.

SUMMARY

Stepanenko A.A. The influence of drugs and stable transfection of *CHI3L1* gene on genome and phenotype of tumor cells. – Manuscript.

The thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.03 - molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The research is dealing with the analysis of chromosomal instability and phenotype of tumor cells of a glial and non-glial origin after exposure to cytotoxic stress factors. It was found that stable transfection of plasmid DNA, transgene *CHI3L1* or long-term drug treatment (temozolomide, cisplatin, temsirolimus, and U0126) affected the phenotype of tumor cells by changing the level of genome instability and genetic heterogeneity. Chromosomal instability may be a universal mechanism of tumor cells adaptation to stresses of various nature.

The stable transfection of plasmid DNA pcDNA3.1 caused an increase in the level of chromosomal instability (clonal and nonclonal chromosomal aberrations) in HEK293_pcDNA3.1 cells, which was associated with the decreased viability and increased colony formation efficiency (CFE) in soft agar. Changes in the genome and phenotype of tumor cells stably transfected with empty vector (without the target gene) raises a question about the adequacy of the cell models with stable transgene transfection for the investigation of oncogenic gene functions, since it is impossible to distinguish, which phenotype changes are caused by the product of a (trans)gene and which are connected with the chromosome changes that accompany the stable transfection of the vector DNA and the transgene acute overproduction.

The ectopic production of *CHI3L1* increased the viability and CFE of HEK293_ *CHI3L1* cells compared to the control HEK293_pcDNA3.1 or parental HEK293 cells. On the contrary, despite ectopic production of *CHI3L1* by HeLa_ *CHI3L1* clones, their viability and CFE were lower compared to the parental HeLa cells.

Both an increase and decrease in the genomic heterogeneity and aggressive malignant phenotype of tumor cells after long-term treatment with DNA-methylating agent temozolomide were demonstrated depending on the cell lines.

The treatment of rat C6 glioma cells *in vivo* with drug cisplatin did not significantly affect the copy number of chromosome loci and growth pattern of resistant cells isolated from residual tumors.

The level of clonal and nonclonal chromosomal aberrations was increased in glial U251 and T98G cells after prolonged clinical treatment with targeted drug temsirolimus (TEM), an inhibitor of mTOR kinase. U251TEM cells had reduced proliferation, CFE and migration, whereas no difference between T98G and T98GTEM cells was observed. Long-term treatment of U251 cells, but not T98G, with targeted MEK kinase inhibitor U0126 increased their proliferation twice. Thus, long-term treatment of tumor cells with targeted agents induced cell-specific and inhibitor-specific adaptation effects.

Key words: aneuploidy, genome, *CHI3L1*, temsirolimus, temozolomide, chromosomal instability, phenotype.