

ПЕРЕСТРОЙКИ ХРОМОСОМ И ИХ РОЛЬ В СПОНТАННОЙ ИММОТАЛИЗАЦИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ *IN VITRO*

© Н. М. Ярцева,¹ Р. Ф. Федорцева,² И. В. Арцыбашева¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: Yartseva@mail.cytspb.rssi.ru

Исследованы особенности хромосомных перестроек в клетках спонтанно иммортализованных клеточных линий LRec-1, 3, а также в клетках клона LRec-1k и линии LRec-1sf с аутокринной регуляцией пролиферации на разных стадиях трансформации клеток. Линии получены из эмбриональных фибробластов крысы путем клонирования при быстром старении культуры. С помощью метода окрашивания хромосомом на G-диски показано, что в процессе трансформации клетки линий LRec-1, 3, а также линии LRec-1sf сохранили диплоидность и специфические клональные перестройки хромосом 7 и 19, которые были выявлены ранее на стадии иммортализации. В клетках LRec-1 наблюдались также новые клональные перестройки хромосом 10 и 20, а в клетках LRec-1sf — хромосом 1, 2, 11, 15, 18 и 19. В клетках LRec-3, а также клетках клона LRec-1k новые перестройки хромосом отсутствовали. Проведено сопоставление локусов, вовлеченных в хромосомные перестройки с локализованными в них генами, согласно с данными RАТМАР. Обсуждается роль перестроек хромосом 7 и 19 в иммортализации и опухолевой трансформации эмбриональных фибробластов, а также роль других хромосом в приобретении клетками LRec-1 и LRec-1sf специфических признаков трансформированного фенотипа.

Ключевые слова: спонтанная иммортализация и трансформация клеток, клеточные линии, хромосомные перестройки, гибридные гены, ростовые факторы, аутокринная регуляция пролиферации.

Принятые сокращения: ГКГ — главный комплекс гистосовместимости, ИД — интерстициальная делеция, МЧХ — модальное число хромосом, ОТ — опухолевая трансформация, СИ — спонтанная иммортализация, СТ — спонтанная трансформация, ХП — хромосомные перестройки, ЭФ — эмбриональные фибробласты.

Нормальные диплоидные клетки млекопитающих *in vitro* имеют ограниченный пролиферативный потенциал, который может существенно варьировать у разных видов животных и человека. Известно, что для эмбриональных фибробластов (ЭФ) человека он может составлять от 40 до 60 удвоений клеточной популяции, для ЭФ крысы — 14—28, для клеток белой мыши — 10—12 (так называемый лимит Хейфлика; Hayflick, 1965). Диплоидные клетки *in vitro* проходят несколько стадий развития: первая — стадия адаптации к условиям культивирования; вторая — стадия роста, на которой клетки делятся определенное число раз в зависимости от видовой принадлежности и пролиферативного потенциала; третья — стадия старения, клетки прекращают деление (терминальная остановка пролиферации) и могут довольно долго сохранять жизнеспособность, затем наступает кризис, и клетки гибнут (Хейфлик, 1997).

Показано, что при старении в диплоидных фибробластах происходит активация опухолевого супрессора белка p53, а также опосредованная p53 экспрессия белка p21^{waf1}, который ингибирует циклин-киназные комплексы типа Cdc2, A/Cdk2. Это приводит к дефосфорилированию белка pRB, секвестрированию транскрипционных факторов S-фазы — E2F1 и в результате — к остановке клеточного деления (Вазири, 1997; Coleman et al., 2004).

Известно, что стадия старения диплоидных клеток сопровождается анеуплоидией, а также большим числом структурных хромосомных перестроек (ХП). В фибробластах человека 90 % перестроек составляют дицентрические хромосомы (Sherwood et al., 1989; Harley et al., 1990). Согласно данным других авторов (Вазири, 1997), доля дицентрических и кольцевых хромосом составляет от 30 до 70 %. Некоторым клеткам, которые имеют ХП, удается преодолеть стадию старения и кризис, в результате чего они переходят в иммортализованное состояние. Спонтанная иммортализация (СИ) — редкое событие, которое происходит с частотой 10⁻⁵—10⁻⁹ (Дункан, Редел, 1997), тем не менее существует и описано значительное число СИ и трансформированных клеточных линий грызунов.

Опухолевая трансформация (ОТ) клеток — многостадийный процесс, в котором возникает последовательное нарушение работы различных генов, регулирующих важнейшие клеточные процессы, такие как поддержание геномной стабильности, строгий контроль пролиферации, дифференцировки и апоптоза, морфогенетические реакции клетки.

Известно, что часть изменений, связанных с нарушением структуры этих генов или их экспрессии, происходит в результате ХП. Сбалансированные хромосомные

нарушения — транслокации, а также инверсии — могут привести к изменению экспрессии генов в результате их перемещения к промоторам или энхансерам активных генов (генам иммуноглобулинов или гену Т-клеточного рецептора). С другой стороны, в результате соединения генов, находящихся в точках разрыва хромосом, могут образоваться слитные или гибридные гены, обладающие онкогенным потенциалом. В настоящее время выявлено около 200 гибридных генов как в клетках гемобластов: *abl/bcr* t(9; 21) — хронический миелоидный, *pml/Rar* t(15; 17) — промиелоцитарный, *AF4/MLL* t(4; 11) — острый лимфобластный лейкозы, так и в солидных опухолях: *ETV6/NTRK3* — инфантильная фибросаркома и др. (Rabbitts, 1994; Mitelman, 2000; Mitelman et al., 2004).

Инактивация генов супрессоров опухолей, как правило, связана с хромосомными делециями, приводящими к утрате доминантных аллелей, и рецессивный аллель этого гена, имеющий мутацию, может проявиться (Knudson, 1993; Macleod, 2000). Иногда могут теряться оба аллеля, и тогда супрессорный ген полностью отсутствует (Fink et al., 2003). Таким образом, для понимания механизмов канцерогенеза важно изучение закономерностей ХП, которые возникают в процессе трансформации клеток на разных этапах. Важно также идентифицировать локусы хромосом, участвующих в перестройках, для определения генов, которые в них локализованы и вовлекаются в процессы имортализации и ОТ клеток.

Постоянные клеточные линии широко используются для исследования механизмов канцерогенеза. Для этой цели целесообразнее использовать трансформированные клеточные линии, полученные из нормальных клеток в результате воздействия на них *in vitro* различными агентами (канцерогенами, онкогенами и вирусными генами), а также клеточные линии, полученные при спонтанной трансформации ЭФ в процессе длительного культивирования. Такие клеточные линии можно исследовать на разных стадиях трансформации начиная со стадии имортализации. Клетки человека наиболее устойчивы к трансформации, особенно спонтанной (Kuroki, Huh, 1993), поэтому для изучения механизмов трансформации *in vitro* используют клетки грызунов. ЭФ крысы являются наиболее удобным объектом для цитогенетического анализа, поскольку клетки крысы имеют довольно стабильный геном и трансформация клеток сопровождается не очень значительным числом ХП.

Результаты исследований характера структурных ХП, возникающих при трансформации клеток крысы различными агентами, свидетельствуют о том, что наряду с транслокациями хромосом наблюдаются как нехватки генетического материала — делеции, так и добавки — экстракопирование хромосом и их локусов. В перестройки вовлекаются разные хромосомы, но чаще хромосомы 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 14 и 15 (Wienar et al., 1982; Федорцева и др., 1983; Kato et al., 1992; Пуговкина и др., 1996; Yartseva et al., 1997; Sjolting et al., 2001; Мамаева, 2002, и др.). Во многих исследованиях цитогенетический анализ проводился однократно, либо на ранних этапах трансформации (при получении клеточной линии), либо на поздних стадиях трансформации, когда клетки уже имели значительное число ХП, и определить, в какой последовательности хромосомы вовлекались в перестройки на каждом этапе, не представлялось возможным.

Для того чтобы выявить закономерности ХП в процессе трансформации клеток, нами было получено 7 СИ клеточных линий (LRec1-7) из ЭФ крысы (Арцыбашева,

Игнатова, 1989) и проведен кариологический анализ этих линий на первой стадии трансформации — имортализации. Анализ показал вовлечение в перестройки хромосомы 7: ее трисомию, ИД ее длинного плеча и транслокацию хромосомы 7 на хромосому 19 (Ярцева и др., 1994).

Целью настоящей работы был анализ характера хромосомных перестроек в клетках СИ клеточных линий крысы (LRec-1, 3) на разных стадиях трансформации клеток, в том числе на стадии ОТ, когда появляется способность прививаться изогенным животным, а также в клетках сывороточно-независимой линии LRec-1sf. Кроме того, в задачу работы входило сопоставление точек разрывов хромосом с генами, которые локализованы в этих локусах в соответствии с Базой данных генома крысы RATMAP (server <http://ratmap.gen.gu.se>).

Материал и методика

Клеточные культуры. Работа выполнена на клеточных линиях LRec-1, 3, полученных из ЭФ белых беспородных крыс И. В. Арцыбашевой в Институте цитологии РАН способом 2Т7: пересев клеток осуществляли через 2 сут по $7 \cdot 10^5$ клеток на 1 флакон (названный так аналогично способу 3Т3). Линия LRec-1 моноклонального происхождения, линия LRec-3 — поликлональная. Клетки выращивали на среде ДМЕМ с 10 % эмбриональной сыворотки. Культуры клеток монослойные, характеризуются фибробластоподобным типом роста. На ранних пассажах культивирования (12-й и 15-й соответственно) обе линии были имортализованными, а с 30-го и 45-го пассажей соответственно линии LRec-1, 3 стали злокачественными. Также были проанализированы клетки клона LRec-1к линии LRec-1, выращенного на среде, содержащей 0.5 % сыворотки. Линия LRec-1sf, клетки которой растут в среде без добавления сыворотки, получена из клеток линии LRec-1, взятых на 15-м пассаже, путем трехступенчатого понижения концентрации сыворотки в среде (1.0—0.1—0 %). Культура этих клеток имеет полусуспензионный тип роста. Клетки линии LRec-1sf образовывали опухоли уже на 10-м пассаже при эксплантации 1—2-суточным крысятам, а на 35-м пассаже — взрослым изогенным животным (Арцыбашева, Игнатова, 1989).

Получение препаратов хромосом. Для получения метафазных хромосом в клеточные культуры вводили раствор колхицина в конечной концентрации 0.06 мкг/мл на 2.0—2.5 ч. Гипотонию клеток проводили 0.55 %-ным раствором KCl при 20 °C в течение 30—40 мин, затем клетки трижды по 15 мин фиксировали смесью метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1), суспензию зафиксированных клеток наносили на сухие предметные стекла, раскапывая с определенной высоты во влажной атмосфере над водяной баней при 45—52 °C; препараты держали до полного высушивания.

Окрашивание препаратов хромосом. Препараты хромосом окрашивали на G-диски модифицированным методом (Seabright, 1971), препараты обрабатывали 2—3 мин 0.02 %-ным раствором трипсина, pH 7, и затем окрашивали 3—5 мин 2 %-ным красителем Гимза на фосфатном буферном растворе, pH 6.8.

Анализ препаратов хромосом. Клетки линии LRec-1 анализировали на ранних (12—21-й), среднем (35-й) и поздних (54—70-й) пассажах культивирования,

клетки линии LRec-1sf — на 14-м и 62-м пассажах, а линии LRec-3 исследовали на 15-м и 47-м пассажах. Для определения модального числа хромосом (МЧХ) анализировали не менее 100 метафазных пластинок, строго отбирая пластинки округлой формы, чтобы избежать механического разброса хромосом. Долю полиплоидных клеток определяли на 500—1000 митотических клеток, кариотипировали 10—15 метафазных пластинок. Клональными считали перестройки, выявленные не менее чем в 3 клетках. Хромосомы идентифицировали по номенклатуре G-окрашенных хромосом *Rattus norvegicus* (Satoh et al., 1989). Описание кариотипа и структуры перестроенных хромосом проводили согласно Интернациональной системе номенклатуры по цитогенетике человека (ISCN, 1995).

Используемые реактивы: среда для культивирования клеток — ДМЕМ (Flow, Англия), эмбриональная сыворотка (Gibco, США), колхицин (Sigma, Германия), краситель Гимза (Merck, США) и трипсин (Difco, США).

Результаты

Анализ кариотипа клеточной линии LRec-1 в процессе культивирования. Кариотип клеток линии LRec-1 был исследован 5 раз на разных пассажах.

Анализ числа хромосом показал, что клетки были псевдодиплоидными до 70-го пассажа включительно, но доля клеток модального класса с 42 хромосомами уменьшилась от 100 % (12-й пассаж) до 70 и 60 % (54-й и 35-й пассажи соответственно). На 70-м пассаже модальный класс по числу хромосом не был четко выражен, число хромосом варьировало от 40 до 43 с преобладанием двух субпопуляций клеток с числами хромосом 41 и 42 (38 и 44 % соответственно). Доля полиплоидных клеток в процессе культивирования с 12-го до 70-го пассажа увеличилась с 1.3 до 11.0 % соответственно.

Кариотип клеток линии LRec-1 по сравнению с другими линиями LRec имел свои особенности. На 12-м пассаже была обнаружена только одна клональная перестройка хромосомы 7 — $t(7;19)(q11.1;q12)$, а также выявлены еще два ее нормальных гомолога. Другая клональная перестройка — $del(7)(q11.2q22.1)$ — ИД, которая образовалась из ее нормального гомолога, была обнаружена только на 21-м пассаже. Эти две клональные ХП наблюдались во всех исследованных клетках (Ярцева и др., 1994). Обе специфические для линий LRec структурно измененные хромосомы сохранились в кариотипе клеток линии LRec-1 на всех исследованных пассажах. На 35-м пассаже новых клональных ХП не было выявлено, наблюдались лишь отдельные неклональные aberrантные хромосомы (рис. 1).

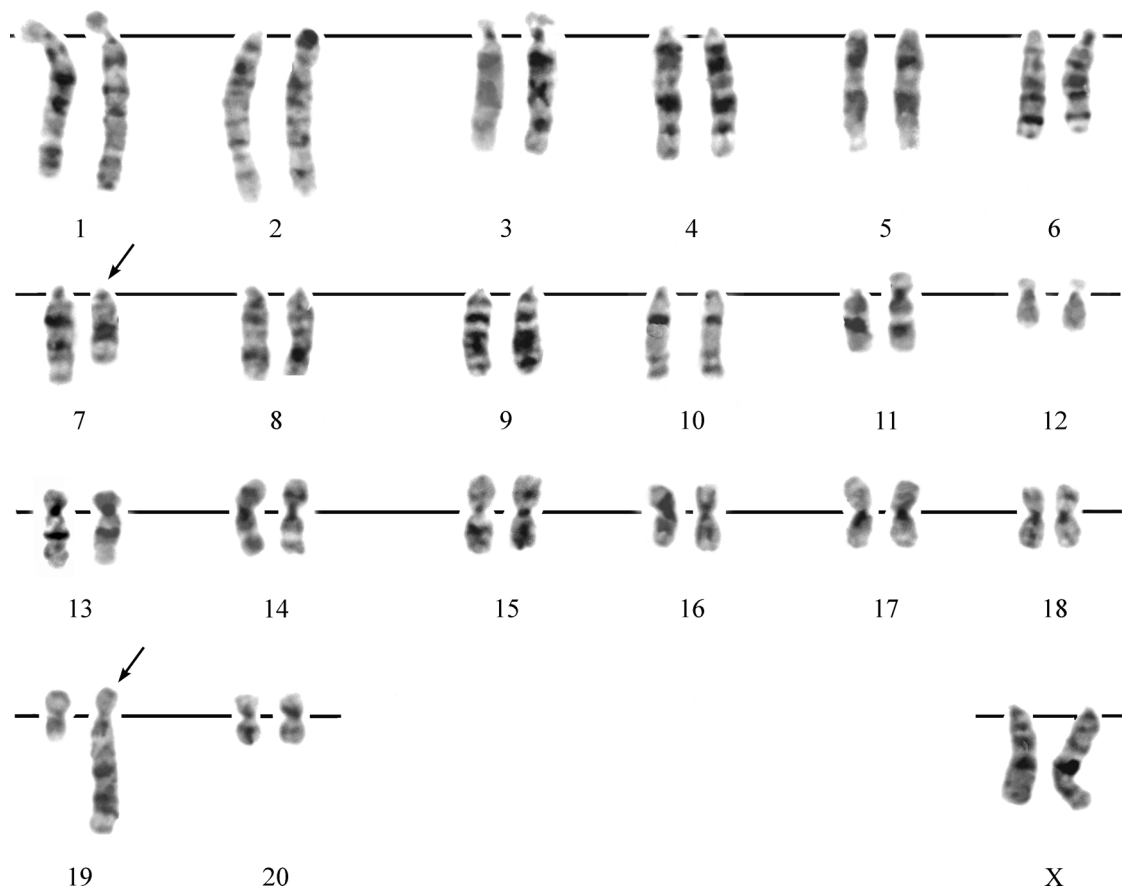


Рис. 1. Модальный кариотип клеток спонтанно трансформированной линии LRec-3 на 47-м пассаже культивирования (кариотип линии аналогичен модальному кариотипу клеток линии LRec-1 на 21—35-м пассажах).

42,XX,del(7)(cen→q11.2::q22.1→qter), der(19)t(7;19)(19pter→19q12::7q11.1→7qter). Идентификация хромосом проведена согласно номенклатуре хромосом *Rattus norvegicus* (Satoh et al., 1989), а описание кариотипа — согласно Интернациональной системе номенклатуры по цитогенетике человека (ISCN, 1995). Стрелка указывает на структурно перестроенную хромосому. Цифры — номера хромосом. del — deletion, der — derivat, cen — centromere, t — translocation, ter — terminal.

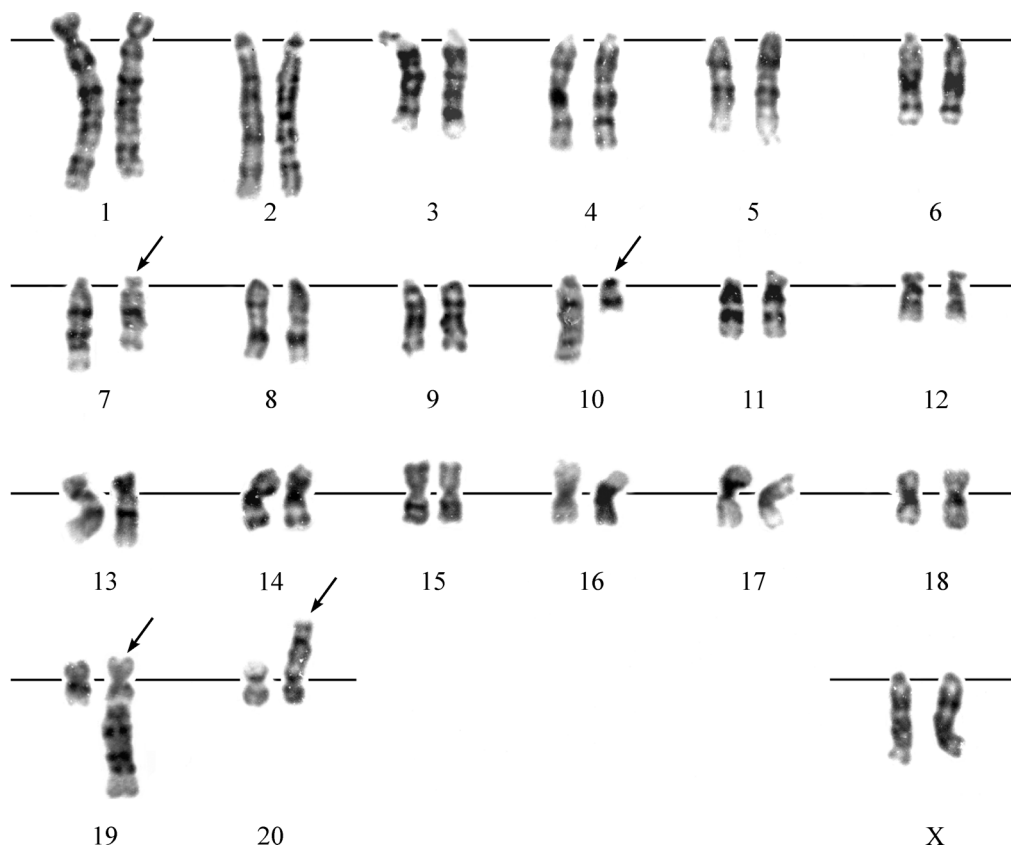


Рис. 2. Модальный кариотип клеток спонтанно трансформированной линии LRec-1 на 70-м пассаже культивирования. 42,XX,del(7)(cen→q11.2::q22.1→qter),del(10)(cen→q22:),der(19)t(7;19)(19pter→19q12::7q11.1→7qter),der(20)(10qter→10q22::20p12→20qter). Обозначения те же, что и на рис. 1.

На 54-м пассаже культивирования линии LRec-1 были обнаружены две субпопуляции клеток, в которых выявлялись как специфические, так и новые клональные ХП. Всего было кариотипировано 11 клеток. В 4 из них не было выявлено новых клональных ХП, наблюдались только неклональные хромосомные aberrации. В 3 клетках были обнаружены две новые клональные ХП — первая, по-видимому, транслокация между коротким плечом хромосомы 16 и хромосомой 7 с ИД, причем разрыв происходит в локусе 7q11. В результате образовалась вторая ХП — маленькая акроцентрическая хромосома — del(7)(cen→q11). В 4 клетках выявлены делеция короткого плеча хромосомы 12 — del(12)(p11) — и перцентрическая инверсия хромосомы 15 — inv(15):(q12→p15::q12→qter).

На 70-м пассаже анализ кариотипа клеток линии LRec-1 показал, что специфические перестройки хромосом 7 и 19 сохранились, но были выявлены две новые клональные перестройки, а перестройки хромосом, появившиеся на 54-м пассаже, исчезли. Популяция клеток на 70-м пассаже отличалась гетерогенностью по сравнению с более ранними пассажами, отсутствовало четко выраженное МЧХ. Наблюдались две выраженные субпопуляции клеток с числами хромосом 41 и 42, в клетках с 41 хромосомой число хромосом уменьшилось в результате появления различных неклональных перестроек, включающих в себя транслокации, изохромосомы и дидцентрики. В 7 из 11 кариотипированных клеток как с 42, так и с 41 хромосомой наблюдались две новые клональные ХП. Первая перестройка образовалась в результате

транслокации между 10-й и 20-й хромосомами — t(10;20)(q22;p12.1), вторая перестройка — делеция 10-й хромосомы — del(10)(q22) (рис. 2). Не исключено, что эти две ХП — результат сбалансированной реципрокной транслокации между хромосомами 10 и 20.

Таким образом, клетки линии LRec-1 отличались на ранних пассажах стабильным кариотипом, неклональные ХП наблюдались в кариотипе начиная с 35-го пассажа, новые клональные ХП были выявлены только на 54-м пассаже. В процессе культивирования клеток линии LRec-1 на 70-м пассаже была вновь выявлена эволюция кариотипа, которая выражалась в изменении числа и структуры хромосом. Четко выраженный модальный класс с числом хромосом 42 и двумя специфическими клональными перестройками хромосом 7 и 19, выявленными на 12-м и 21-м пассажах, сохранялся до 70-го пассажа, на котором сменился субпопуляциями клеток с числами хромосом 41 и 42 и двумя новыми клональными ХП при сохранении специфических.

Были также кариотипированы клетки клона LRec-1k линии LRec-1, выращенного на среде, содержащей 0.5 % сыворотки. Число хромосом варьировало незначительно (40—43), МЧХ по сравнению с родительской линией не изменилось, наблюдалась трисомия хромосомы 7. Количество и состав структурных ХП также не изменились, выявлены обе характерные для линий LRec аномальные хромосомы — del(7) и t(7;19).

Анализ клеток не зависимой от сыворотки линии LRec-1sf. Клетки линии LRec-1sf были получены при постепенном уменьшении сыворотки в культу-

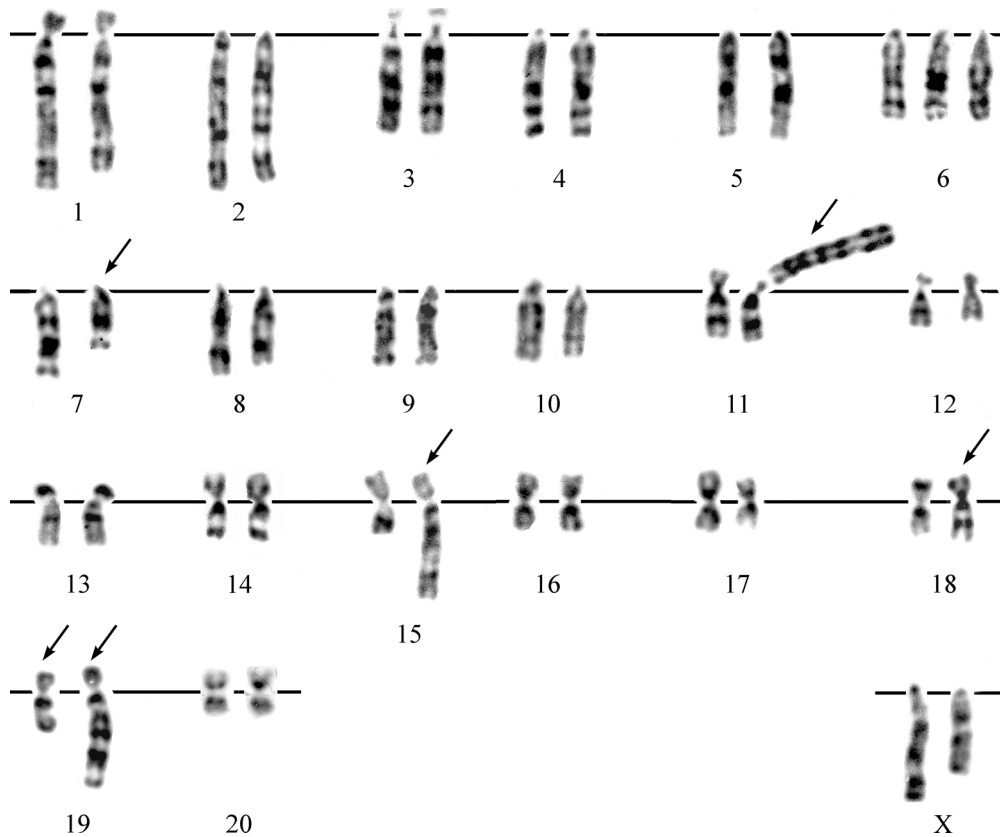


Рис. 3. Модальный кариотип клеток спонтанно трансформированной линии LRec-1sf на 14-м пассаже культивирования. 43,XX,+6,del(7)(cen→q11.2::q22.1→qter), der(11)t(2;11)(2qter→2q14::11p12→11qter), der(15)t(1;15)(15pter→15q12::1g22→1qter), der(18)(18q12.1~12.2;?), der(19)t(7;19)(19pter→10q12::7q11.1→7qter), der(19)(19q12;?). Обозначения те же, что и на рис. 1.

ральной среде до нуля с целью выяснить, смогут ли эти клетки приобрести способность к аутокринной регуляции пролиферации, появятся ли в кариотипе этих клеток новые хромосомные перестройки, а также будут ли гены локализованные в точках разрыва хромосом, иметь отношение к регуляции пролиферации.

Были исследованы клетки линии LRec-1sf на раннем (14-м) и позднем (62-м) пассажах. Число хромосом в клетках этой линии варьировало незначительно (42—45) на всех пассажах, но были выявлены изменения МЧХ, а также новые структурные ХП по сравнению с родительской линией. На 14-м пассаже МЧХ стало равным 43 в результате появления третьей нормальной копии хромосомы 6 (рис. 3), на 62-м пассаже кроме этой популяции была обнаружена субпопуляция клеток с числом хромосом 44, в клетках которой была выявлена кроме трисомии хромосомы 6 трисомия хромосомы 14. Более значительные изменения в кариотипе клеток линии LRec-1sf были выявлены среди структурных ХП: так, на 14-м пассаже наряду со специфическими для линий LRec изменениями хромосом 7 и 19 наблюдались еще 4 новые клональные ХП, в которые вовлекались хромосомы 1, 2, 11, 15, 18 и 19 (рис. 3). Были обнаружены две большие перестроенные субметоцентрические хромосомы — первая хромосома образована транслокацией между хромосомами 1 и 15 — t(1;15)(q22;q12), вторая между хромосомами 2 и 11 — t(2;11)(q14;p12). При окрашивании хромосом азотнокислым серебром в районе 11p12 наблюдался большой блок AgNO₃ (данные не приведены). Кроме того, наблюдались еще две нормальные копии хромосом 1

и 2; таким образом, были выявлены трисомии частей длинных плеч хромосомы 1 (1q22qter) и хромосомы 2 (2q14qter). Третья перестройка — хромосома 18 с дополнительным неидентифицированным хромосомным материалом в терминальном районе 18q12.1~2. Четвертая перестройка — дериват хромосомы 19, к терминальному концу ее длинного плеча присоединился дополнительный, также неидентифицированный генетический материал. На 62-м пассаже сохранились клональные ХП, характерные для кариотипа клеток линии LRec-1 sf, а также специфические перестройки хромосом 7 и 19, но были выявлены две копии делетированной хромосомы 7 — del(7)(q11.2;q22.1). В то же время кариотип ее клеток стал менее стабильным, в каждой кариотипированной клетке наблюдались различные неклональные ХП, в основном транслокации, в которые вовлекались как нормальные, так и перестроенные хромосомы — t(1;15) и der(18).

Таким образом, в кариотипе линии LRec-1sf, исследованной в процессе культивирования без сыворотки на разных пассажах, были выявлены изменения числа хромосом и состава клональных структурных ХП по сравнению с родительской линией. Наряду с сохранением двух специфических для линий LRec перестроенных хромосом 7 и 19 в кариотипе клеток линии LRec-1 sf на 14-м пассаже наблюдались новые клональные ХП, характерные для клеток этой линии, которые сохранились вплоть до 62-го пассажа.

Характеристика кариотипа клеточной линии LRec-3. Эта линия была взята для повторного ис-

следования на 47-м пассаже, поскольку она в отличие от линии LRec-1 поликлонального происхождения и на 15-м пассаже имела два клон клеток. Первый клон с женским кариотипом, второй — с мужским. Кроме того, кариотип был менее стабильным по сравнению с клетками LRec-1: число хромосом варьировало в пределах 38—45, наблюдались неклональные структурные ХП. Оба клеточных клон линии LRec-3 имели модальный кариотип, идентичный кариотипу клеток линии LRec-1 на 21-м пассаже как по числу хромосом (42), так и по составу клональных ХП. Эти перестройки — частичная трисомия хромосомы 7, исключая делетированный район 7q11.2q22.1, а также del(7) и der(19) — являются специфическими для клеточных линий LRec (Ярцева и др., 1994). Анализ кариотипа клеток этой линии на 47-м пассаже культивирования показал, что остался только клеточный клон с женским кариотипом, который был идентичен модальному кариотипу клеток на 15-м пассаже. МЧХ сохранилось (42), присутствовали перестройки хромосом 7 и 19, других численных и структурных клональных ХП не обнаружено (рис. 1).

Обсуждение

Способ 2Т7 получения спонтанно трансформированных клеточных линий крысы LRec основан на быстром старении клеток (через 3—8 пассажей) и быстром достижении культурой клеток состояния кризиса. Линии LRec-1, 3 на ранних пассажах (12-м и 15-м соответственно) были иммортализованными (Арцыбашева, Игнатова, 1989). Все исследованные клетки этих линий, как и других линий LRec, имели на ранних пассажах клональные перестройки хромосом 7 и 19: трисомию и ИД 7-й хромосомы — del(7)(7q11.2q22.1), а также транслокацию хромосомы 7 на 19-ю хромосому — t(7;19)(q11.1;q12) (Ярцева и др., 1994).

Немногочисленные данные кариологических исследований клеточных линий крысы при СИ и трансформации *in vitro*, выполненных до настоящего времени, не позволяют выявить преимущественное вовлечение каких-либо определенных хромосом в численные и структурные перестройки.

Так, моносомия или ИД хромосомы 5 — del(5)(q21.3q24) — была обнаружена в клетках трех линий, полученных из поверхностного эпителия яичника крысы при их СИ и ОТ. На более поздних пассажах (23, 30 и 34-м), при сохранении del(5) в кариотипе, клетки всех линий потеряли зависимость роста от субстрата и стали прививаться бестимусным мышам, в то же время появились новые перестройки хромосом 1, 5 и 12 (Godwin et al., 1992). Авторы указывают наличие в районе 5q21.3-q24 генов интерферонов α , β , *c-jun* и гена *Sai 1* — предполагаемого гена супрессора независимости роста от субстрата. Дальнейшие исследования подтвердили его локализацию в этом районе (Lu et al., 1997; Helou et al., 2000). Отмечается также отсутствие обоих аллелей гена интерферона α в клетках линии с моносомией хромосомы 5.

Кришнавини и Гош (Krishnaveni, Ghosh, 1996) обнаружили неслучайные, как считают авторы, перестройки хромосомы 2 — t(2;3), наблюдавшиеся в клетках спонтанно иммортализованной линии крысы Rat-2, и транслокации t(2;7) и t(8;11), появившиеся в клетках этой линии при их СТ.

Трисомия хромосомы 7 обнаружена в спонтанно трансформированных миофибробластах крысы (Brett et al., 1986). Полная или частичная трисомия хромосомы 1 была выявлена в мезотелиальных клетках при СИ на ранних пассажах и ее транслокации на другие хромосомы — 2-ю и 3-ю — на поздних пассажах. Авторы рассматривают перестройки хромосомы 1 как неслучайные и характерные для иммортализации мезотелиальных клеток (Furukawa et al., 1991).

Несмотря на разнообразие ХП, наблюдаемых при СИ клеток, можно выделить некоторые закономерности ХП — появление на ранних стадиях трисомии по 1-й или 7-й хромосоме и затем вовлечение одной из копий этих хромосом в транслокации и делеции. Трисомия хромосомы 7 имеет, на наш взгляд, важное значение в иммортализации ЭФ крысы, поскольку в ней локализованы гены, регулирующие пролиферацию клеток: *c-myc*, *Pdgfb* (*c-sis*), *Igf1*, *Ifny*, *Wnt 7b*. В наших линиях, возможно вначале, появилась трисомия хромосомы 7, а затем транслокация одной из ее копий на хромосому 19.

Мы предполагаем, что в нашем исследовании в условиях быстрого старения клеток *in vitro* транслокация t(7;19) играет основную роль в иммортализации ЭФ крысы. Она позволила клеткам избежать кризиса, преодолеть «лимит Хейфлика» и стать иммортализованными клетками-прародительницами клеточных линий LRec. Это предположение основано на том, что в клетках LRec-1 на 12-м пассаже был обнаружен только der (19), вторая же делетированная хромосома 7 наблюдалась в клетках этой линии с 21-го пассажа. Разрыв в районе 7q11 происходит не случайно, так как в этом локусе выявлен фрагильный сайт (Robinson, Elder, 1987).

При сопоставлении точек разрывов в хромосоме 7 локусы 7q11.1 и 7q11-13 с данными по локализации генов в геноме крысы (RATMAP) оказалось, что в этих районах находятся гены, имеющие отношение к контролю клеточного деления и иммортализации клеток (см. таблицу). В хромосоме 19 локус 19q11-12 картированы онкогены *Junb*, *Maf*, *Lyl 1*, *Rab-4a*, транскрипционные факторы, гены, регулирующие пролиферацию клеток.

Мы предполагаем, что при слиянии разорванных концов хромосом 7 и 19 образовался гибридный ген, партнерами которого могут быть какие-либо два гена из вышеперечисленных. Новый гибридный ген, возможно, экспрессирует белок, обладающий функциями подавления программы старения клеток, и является иммортализирующим геном.

Как известно, гибридные гены выявлены в опухолевых клетках, в том числе гемопозитических, со специфическими транслокациями у больных различными формами лейкозов. Функции многих из них, а также их генов-партнеров достаточно хорошо изучены, например *RUNX1*(*AML1*) — ген-партнер гибридного гена *RUNX1*(*AML1*)/*ETO*, который экспрессируется в миелоидных клетках у больных острым миелобластным лейкозом с транслокацией t(8;21). Этот ген является транскрипционным фактором, стимулирующим дифференцировку гранулоцитарных миелоидных клеток, регулирующим пролиферацию и апоптоз. Другой его ген-партнер — *ETO* — корепрессор, действующий в комплексе с другими репрессорными генами. Продукт гибридного гена *RUNX1*/*ETO* в отличие от *RUNX1* становится репрессором и блокирует экспрессию генов-мишеней *RUNX1*, в частности опухоль-супрессорного гена *p14^{ARF}*. Появление у гена

Гены, локализованные в точках разрывов хромосом 1, 7 и 10, перестроенных в клетках линий LRec-1, LRec-1sf и LRec-3

Локусы	Гены	Соответствующие белки
1q22-36	<i>Eif4g2</i>	Эукариотический фактор инициации трансляции 4,γ2
	<i>Ris 1</i>	Ретровирусный интеграционный сайт 1
	<i>Mrvi 1</i>	MRV интеграционный сайт 1
7q11	<i>yes-2s</i>	Онкоген
	<i>Shc2</i>	Домен 2, гомологичный src, содержащий трансформирующий белок C2
	<i>Nfic</i>	Ядерный транскрипционный фактор I/C (связывающий ССААТ)
	<i>Map2k2</i>	Киназа 2 митогенактивируемой протеинкиназы 2 (mitogen-activated protein kinase 2)
	<i>Matk</i>	Мегакариоцитарная (megakaryocyte associated) нерецепторная тирозинкиназа
	<i>Gna 11</i>	Альфа-субъединица G-белка (активатор фосфолипазы C)
	<i>Ppap 2 c</i>	Фосфатаза (phosphatidic acid phosphatase, type 2C)
7q11-13	<i>Nfib</i>	Ядерный транскрипционный фактор Yβ
	<i>Tefe2a</i>	Транскрипционный фактор E2a, так называемый мастер-ген, и другие гены
7q11.2q22.1	<i>Igfbp3q2</i>	IGF-ВР3 (QTL 2), белок-ингибитор инсулиноподобного фактора роста
	<i>Cish 2</i>	Негативный регулятор 2 передачи сигналов цитокинов
	<i>Tra 1</i>	Антиген отторжения опухолей gp 96
	<i>Apa1</i>	Фактор 1, активирующий апоптотические протеазы
	<i>Tdg</i>	Тимин ДНК гликозилаза (энзим репарации ДНК)
7q12-13	<i>Igf 1</i>	Инсулиноподобный фактор роста
	<i>Insq 4</i>	Инсулин (QTL 4)
	<i>Kitl</i>	kit-лиганд (stem cell factor)
10q22	<i>Csf 2</i>	Фактор 2, стимулирующий гранулоцитарные и макрофагальные колонии
	<i>Il 3-5, 12b, 13</i>	Интерлейкины 3—5, 12b, 13
	<i>Tcf7</i>	Транскрипционный фактор 7 (специфичность для Т-клеток)
	<i>Itk</i>	Индукцибельная интерлейкином 2 Т-клеточная киназа
	<i>Irf 1</i>	Фактор регуляции интерферона 1
	<i>Gdf 9</i>	Фактор роста и дифференцировки 9
	<i>Hes 7</i>	Репрессор транскрипции

RUNX1/ETO репрессорных функций приводит к активации пролиферации и подавлению дифференцировки миелоидных клеток (Westendorf et al., 1998; Linggi et al., 2002; Davis et al., 2003; Peterson, Zhang, 2004).

Возможен другой механизм, аналогичный известному механизму активации гена *c-myc* в клетках лимфомы Беркета, когда *c-myc* попадает к энхансеру активного гена тяжелых иммуноглобулинов в результате транслокации — t(8;14) (Klein, Lenoir, 1982). Непосредственно в районе 19q12 локализован ген *Ier 2* — ген раннего ответа 2, поэтому при t(7;19) этот ген, перемещаясь, например, к активному гену тирозинкиназы в локусе 7q11, может активироваться и привести к запуску клеточного деления.

Кроме того, районы 7q10q11.1 и 19q12.2qter, не выявленные при окрашивании хромосом на G-диски, возможно, теряются при образовании несбалансированной транслокации — t(7;19)(q11.1;q12). В районе 19q12 локализован опухоль-супрессорный ген *pRb2*, который может быть потерян, и его отсутствие способствует активации пролиферации клеток. Таким образом, выявленные хромосомные мутации могут приводить к иммортализации ЭФ крысы.

Вторая специфическая для клеточных линий LRec ХП — del(7)(q11.2q22.1) — образована в результате ИД, которая привела к потере локуса 7q11.2q22.1 и вследствие этого к утрате множества различных генов. В этом локусе выявлен ряд супрессорных генов (см. таблицу), которые отсутствуют в перестроенной хромосоме, а также гены транскрипционных и ростовых факторов и другие гены.

Следует также отметить, что делеция в середине плеча хромосомы 7 в результате образования двух точек разрыва может привести к образованию еще одного гибридного гена. Вероятно, ИД хромосомы 7 имеет определяющее значение для ОТ клеток линий LRec. Так, клетки линий LRec-1, 3 стали опухолевыми на 30-м и 45-м пассажах соответственно, и при этом в кариотипе наблюдалась только одна копия del(7) и ни одной новой клональной ХП. В то же время клетки линий LRec-4, 7 стали злокачественными уже на ранних пассажах культивирования (10-м и 8-м соответственно), причем их кариотип содержал две копии del(7) (Арцыбашева, Игнатова, 1989; Ярцева и др., 1994).

Таким образом, можно заключить, что клональные перестройки хромосом 7 и 19 являются неслучайными и специфическими для клеток линий LRec, так как не толь-

ко неоднократно возникали в ЭФ крысы *in vitro* (7 линий LRec), но и способствовали их выживанию в состоянии кризиса культуры, приобретению иммортализованного, а затем и трансформированного фенотипа.

В нашем исследовании клетки стали иммортализованными при быстром старении культуры (3—8-й пассажи при пересеве через 2 сут) и быстром переходе культуры клеток в состояние кризиса (Арцыбашева, Игнатова, 1989). В работах других авторов иммортализация клеток происходила в процессе длительного культивирования при их постепенном старении. Вероятно, вовлечение определенных хромосом в перестройки при СИ зависит не только от генома индивидуальной клетки и ее тканевой принадлежности, но и от способа получения линий. В разных условиях культивирования в результате отбора остаются клетки с определенными ХП, «включающими» соответствующие пути передачи сигнала к генам, регулирующим пролиферацию клеток.

Цитогенетический анализ клеток линии LRec-1 в процессе культивирования. Анализ клеток линии LRec-1 на разных пассажах (с 12-го по 70-й) выявил изменения ее кариотипа. Появление новых ХП связано, как нам кажется, с некоторыми новыми фенотипическими характеристиками клеток линии LRec-1. Так, на начальных этапах культивирования в отличие от других линий кариотип клеток LRec-1 имел только одну ХП — $der(19)t(7;19)$ — и две нормальные копии хромосомы 7. Клетки образовывали клоны на твердом субстрате при низком содержании сыворотки в среде (до 0.5 %) с эффективностью 50—60 %. Однако клоногенная способность клеток на 30—40-м пассажах резко снизилась до 1 %. Снижение клоногенности клеток линии LRec-1 коррелирует с появлением делеции $q11.2q22.1$, выявленной на 21-м пассаже и сохранившейся до 70-го пассажа. В этом районе ($7q12—13$) картированы гены факторов роста (см. таблицу). Кроме того, клетки этой линии на 15-м пассаже легко были переведены при постепенном снижении сыворотки в среде на культивирование без сыворотки (Арцыбашева, Игнатова, 1989). По-видимому, наличие в трех копиях нескольких генов цитокинов в клетках линии LRec-1 до 21-го пассажа обусловило способность этих клеток выжить при низком содержании сыворотки.

На 54-м пассаже наблюдались четыре новые клональные ХП, в которые вовлекались хромосомы 12, 15, 16 и $del(7)$, клетки с такими ХП составляли небольшие субпопуляции. Эти ХП не были обнаружены при исследовании на 70-м пассаже; скорее всего, они характерны только для 54-го пассажа и появились вследствие изменения условий культивирования.

На 70-м пассаже выявлены две преобладающие популяции клеток с числами хромосом 41 и 42 с двумя другими структурными клональными ХП — $t(10;20)(q22;q12.1)$ и $del(10)(q22)$, которые наблюдались в 7 из 11 исследованных клетках при сохранении специфических перестроек. Новые аномальные хромосомы, скорее всего, коррелируют с приобретением клетками LRec-1 новых черт злокачественного фенотипа. Срок образования опухоли при прививке клеток 1—2-суточным крысам уменьшился с 4 мес на 30-м пассаже до 1.5 мес на 70-м пассаже; кроме того, клетки стали прививаться взрослым животным (в возрасте 6 мес) (Арцыбашева, Игнатова, 1989).

Сопоставление точек разрывов хромосом 10 и 20 с локализацией генов в этих точках показало, что в районе $10q22$ локализованы гены, имеющие отношение к регуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтиче-

ских клеток (см. таблицу). В районе $20p12$ локализованы гены $RT1@/MHC1$ молекул класса 1 локуса главного комплекса гистостовместимости (ГКГ), а также и другие гены этого локуса (RATMAP). Молекулы класса 1 — комплекс генов, продукты которых представляют собой белки, служащие посредниками для представления эндогенных клеточных антигенов Т-лимфоцитам с цитотоксической активностью. Было показано, что экспрессия молекул первого класса снижена при раке легких (Kokkoloroulou et al., 1996) и бронхов (Redondo et al., 1991), также в этих молекулах выявлены мутации (Chen et al., 1996). Нарушения генов молекул класса 1 могут определять механизмы, с помощью которых опухолевые клетки выходят из-под контроля иммунной системы организма (Sekido et al., 1998). Поскольку клетки LRec-1 на 65—70-м пассажах обладали способностью прививаться взрослым животным с хорошо развитой иммунной системой (Арцыбашева, Игнатова, 1989), можно полагать, что в результате транслокации $t(10;20)(q22;p12)$ изменяется экспрессия или структура (образование гибридного гена) одного из генов молекул класса 1 локуса ГКГ. В то же время в кариотипе клеток линии LRec-3 на 47-м пассаже не выявлено ни транслокации $t(10;20)$, ни новых перестроек хромосом, однако клетки этой линии также прививались взрослым изогенным животным (Арцыбашева, Игнатова, 1989). Возможно, эту способность клетки LRec-3 приобрели в результате транслокации минимального генетического материала, не выявляющегося на хромосомном уровне, но приводящего к образованию аналогичного гибридного гена. Такой феномен наблюдается у больных хроническим миелоидным лейкозом без транслокации $t(9;22)$ — гибридный ген abl/bcr выявляется PCR-анализом (Heim, Mitelman, 1995). Инактивация генов локуса ГКГ в клетках LRec-3 возможна также в результате эпигеномных изменений.

Таким образом, две структурно измененных хромосомы 7 и хромосома 19 с точками разрыва в районах $7q11.1$, $7q11.2$, $7q22.1$ и $19q12$ необходимы и достаточны для иммортализации и постепенного (к 30—45-му пассажу) развития опухолевой трансформации ЭФ крысы *in vitro*. Две новые перестройки хромосом 10 и 20 с точками разрыва в локусах $10q22$ и $20p12$, наблюдаемые в линии LRec-1 на 70-м пассаже, по-видимому, способствовали опухолевой прогрессии клеток этой линии *in vitro*. Клетки линии LRec-3, не имея новых структурных клональных ХП, уже на 45-м пассаже обладали теми же свойствами, что и клетки LRec-1 на 70-м пассаже, возможно в результате генных мутаций или эпигеномных изменений.

Клеточные линии LRec-1, 3 представляют собой интересные клеточные модели для исследования трансформации клеток *in vitro*, по-видимому, с разными механизмами опухолевой прогрессии.

Анализ независимой от сыворотки линии LRec-1sf. Клетки этой линии способны к неограниченному размножению в среде без добавления сыворотки крови и других экзогенных факторов роста. Исследования кондиционированной среды показали, что клетки линии LRec-1sf способны секретировать активные белки, стимулирующие рост клеток мышинных гибридом и клеток линии NIH3T3, а также клеток костного мозга крысы *in vitro* (Арцыбашева, Игнатова, 1989; Гойло и др., 1991; Плескач и др., 1994, 1996). Авторы предположили, что одним из таких белков может быть основной фактор роста фибробластов, а также факторы роста гемопоэтических клеток, и возможно, интерлейкины.

Действительно, было показано, что опухолевые клеточные линии человека и животных, способные расти в среде без сыворотки, секретируют сами некоторые клеточные факторы роста: IgF-1, IgF-1r, EgFr, TgFa и EgF (Yee et al., 1990; Ruck, Paulie, 1998; Pozzi et al., 2004), II-1 α и II-1 β (Yamada et al., 1998; Tateyama et al., 2001), FgFf и FgFr (Otsuki et al., 1999) и др., т. е. обладают способностью к аутокринной регуляции пролиферации. Всего в нескольких сообщениях приводятся результаты цитогенетического анализа клеток опухолевых линий человека, способных расти в среде без сыворотки, но почти нигде не рассматривается взаимосвязь хромосомных перестроек и экспрессии ростовых факторов (Sundqvist et al., 1991; Yanagihara et al., 1993). Только в двух исследованиях отмечается, что клетки, обладающие аутокринной регуляцией пролиферации, имеют хромосомные транслокации. Только в одной нейроэктодермальной опухолевой линии с транслокацией t(11;22) клетки экспрессируют белок Igf-1 (Yee et al., 1990). В другой работе сообщается, что в двух клеточных линиях KMS-11 и KMS-18 множественной миеломы человека клетки с кариотипом, содержащим транслокацию t(4;14)(p16.3;q32.3), экспрессируют FGF и его рецептор FGFR3 (Otsuki et al., 1999). В результате этой транслокации образуется гибридный ген *IgH/MMSET*. Его ген-партнер *MMSET* локализован в районе 4p16.3 рядом с геном *FgFr3*, и они вместе переносятся на 14-ю хромосому в локус 14q32.3 к гену *IgH* (Richelda et al., 1997; Chesi et al., 1998), что, по-видимому, определяет его повышенную экспрессию.

Имеющейся информации недостаточно, чтобы ответить на вопрос о том, сопровождается ли способность опухолевых клеток к аутокринной регуляции пролиферации *in vitro* вовлечением определенных хромосом и их локусов в перестройки или она определяется генными мутациями.

Мы провели цитогенетический анализ клеток LRec-1sf, который показал наличие четырех новых транслокаций с участием в них других хромосом (1, 2, 11, 15, 18 и 19) в отличие от клеток клона, выращенного в среде, содержащей 0.5 % сыворотки. Сопоставление точек разрывов хромосом 2 и 11, участвующих в транслокации t(2;11)(q14;p12), с локализованными в них генами показало, что в локусе 2q11—16 картированы гены интерлейкина *Hilda* — human interleukin in DA cells (мышинские лейкоцитарные клетки) и интерлейкина 14 — *Il 14-rs* (RATMAP). Разрыв в хромосоме 2 происходит в локусе 2q14, и если, например, гены интерлейкинов *Hilda* или *Il 14-rs* при транслокации переносятся на хромосому 11 в район 11p12, то они, попадая к активным рибосомным генам, могут активироваться и экспрессировать интерлейкин — фактор роста гемопоэтических клеток. При окрашивании хромосом азотнокислым серебром в этом районе наблюдался большой блок AgNO₃, что свидетельствует об активности рибосомных дистронов. В локусе 15q12-22 — t(1;15)(q22;q12) — картированы гены: *FgF 14* — фактор роста фибробластов 14 и *TgF β 1 i4* — трансформирующий фактор роста β 1 (induced transcript 4), а в локусе 1q22-36 — гены фактора инициации трансляции и вирусные сайты (RATMAP; см. таблицу). Следовательно, если разрывы хромосом при транслокации происходят по этим генам, то гены *FgF 14* или *TgF β 1 i4*, перемещаясь в локус 1q22 и попадая к гену фактора инициации трансляции или вирусным сайтам, могут быть активированы.

Кроме того, в кариотипе клеток LRec-1sf обнаружен дополнительный хромосомный материал на хромосоме 18 в терминальном районе q12.1~2. Согласно RATMAP,

в районе 18q12.1-12.3 находятся гены *Mbd1* и *Mbd2*, которые кодируют метил-СрG-связывающие белки 1 и 2 с метил-СрG-связывающим доменом и относятся к семейству MBD-белков. Эти белки способны взаимодействовать с метилированными промоторами генов-мишеней и репрессировать их. Белок MBD2 является негативным регулятором экспрессии интерлейкина 4 (Meehan et al., 1989; Hutchins et al., 2002; Саложин и др., 2005), поэтому если ген *Mbd2* инактивируется в клетках LRec-1sf в результате перестройки хромосомы 18, то клетки могут экспрессировать также интерлейкин 4.

Таким образом, информация, полученная Плескач с сотрудниками (Плескач и др., 1994, 1996), и наши данные о локусах хромосом, вовлеченных в перестройки, в совокупности с локализацией генов согласно RATMAP свидетельствуют о том, что клетки LRec-1sf действительно могут секретировать фактор роста фибробластов, интерлейкины и, возможно, другие цитокины. Поэтому можно полагать, что появление в клетках LRec-1sf новых транслокаций с участием хромосом 1, 2, 11, 15 и 18 способствовало переключению этих клеток на аутокринный способ регуляции пролиферации при культивировании в среде без сыворотки.

Клетки линии LRec-1 sf на 14-м пассаже в отличие от клеток линии LRec характеризуются полусуспензионным типом роста. Известно, что в опухолевых клетках происходит перестройка цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также уменьшение зависимости роста клеток от субстрата. Локус 2q11-16 содержит также ген *Pik3r1* — регуляторную субъединицу (p85 γ) фосфатидилинозит-3-киназы (PI-3K1) (полипептид 1), которая помимо трансформирующего действия на клетки обладает функцией подавления апоптоза и увеличения выживаемости клеток, а также играет важную роль в реорганизации актинового цитоскелета (Красильников, 2000). Активация этого гена, если он находится в точке разрыва 2q14 при образовании t(2;11)(q14;p12), может способствовать уменьшению зависимости клеток LRec-1 sf от субстрата и выживанию в среде без сыворотки.

Не случайны также трисомия хромосомы 6 и частичная трисомия хромосомы 2 по району 2q14qter в клетках LRec-1sf на 14-м пассаже. Согласно RATMAP, в локусе 2q16—21 находится ген интегрин 1 α — *Igal1*; в 6-й хромосоме гены: тубулина 4 β — *Tub β 4* и ламинина 1 α — *Lamal1*, следовательно, гены, имеющие отношение к цитоскелету и внеклеточному матриксу. Эти гены находятся в геноме клеток LRec-1sf в трех копиях в результате трисомий соответствующих хромосом. Возможно, что вышеупомянутые гены могут быть перестроены и экстракопируются хромосомы с мутантными аллелями этих генов (Godwin et al., 1992). Их нарушения могут приводить к уменьшению зависимости роста клеток от субстрата.

Таким образом, сопоставление вовлеченных в перестройки хромосомных районов в линиях LRec-1sf и LRec с локализованными в них генами выявило неслучайный характер перестроек хромосом, возникающих на разных стадиях спонтанной трансформации эмбриональных фибробластов крысы *in vitro*. Анализ этих генов показал, что они представляют собой онкогены, гены опухолевых супрессоров, транскрипционных факторов, тирозинкиназ, ростовых факторов, генов, регулирующих апоптоз, клеточную адгезию и другие важнейшие клеточные процессы.

Несмотря на то что у нас нет данных о перестройках конкретных генов, нам представляется важным рассмотреть различные возможности активации генов, локализо-

ванных в точках разрывов хромосом, вовлеченных в перестройки на разных стадиях трансформации клеток, в сопоставлении с их фенотипическими характеристиками. Линии LRes являются интересным материалом для исследований молекулярных процессов, происходящих в этих клетках на разных стадиях трансформации *in vitro*.

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику Института цитологии РАН к. б. н. Т. В. Поспеловой за проявленный интерес и внимание при обсуждении полученных результатов.

Список литературы

- Арцыбашева И. В., Игнатова Т. Н. 1989. Новые линии спонтанно трансформированных клеток, полученные из «предкризисных» культур эмбриональных клеток крысы. Цитология. 31 (12) : 1466—1477.
- Вазури Х. 1997. Критическое укорачивание теломер, регулируемое АТМ, служит сигналом повреждения ДНК, ведущим к активации белка p 53 и ограничению продолжительности жизни диплоидных фибробластов человека. Биохимия. 62 (11) : 1528—1533.
- Гойло Т. А., Костроминова Т. Ю., Турилова В. И., Плескач В. А. 1991. Аутокринная регуляция пролиферации в культурах клеток I. Исследование гепаринсвязывающих факторов с росто-стимулирующей активностью, содержащейся в средах, кондиционированных трансформированными фибробластами крысы. Цитология. 33 (1) : 57—63.
- Дункан Э. Л., Редел Р. Р. 1997. Генетические изменения, связанные с иммортализацией. Биохимия. 62 (11) : 1477—1490.
- Красильников М. А. 2000. Сигнальные пути, регулируемые фосфатидилинозит-3-киназой и их значение для роста, выживаемости и злокачественной трансформации клеток. Биохимия. 65 (1) : 68—78.
- Мамаева С. Е. 2002. Хромосомы нормального кариотипа и постоянных клеточных линий крысы (*Rattus norvegicus*). В кн.: Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М.: Научный мир. 166—191.
- Плескач В. А., Кожухарова И. В., Арцыбашева И. В., Гойло Т. А., Тарунина М. В., Филатова Н. А. 1994. Особенности культивирования, характеристики роста и онкогенность «бессывороточных» популяций трансформированных фибробластов. Цитология. 36 (8) : 806—815.
- Плескач В. А., Филатова Н. А., Кожухарова И. В., Арцыбашева И. В., Тарунина М. В. 1996. Ростстимулирующая и иммуномодулирующая активность культуральных сред, кондиционированных трансформированными фибробластами бессывороточных линий. Цитология. 38 (6) : 616—629.
- Пуговкин Н. А., Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф., Игнатова Т. Н. 1996. Новые линии иммортализованных клеток из трансгенных эмбрионов крысы I. Получение и характеристика линий клеток из эмбрионов крысы с инъектированным онкогенном *v-mos* одновременно с геном устойчивости к генецитину или без него. Цитология. 38 (4/5) : 530—541.
- Саложин С. В., Прохорчук Е. Б., Георгиев Г. П. 2005. Метилирование ДНК как один из основных генетических маркеров. Биохимия. 70 (5) : 641—650.
- Федорцева Р. Ф., Ярцева Н. М., Фридлянская И. И. 1983. Кариологическая характеристика перевиваемой крысиной миогенной клеточной линии L6J1. Цитология. 25 (9) : 1096—1097.
- Хейфлик Л. 1997. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. Биохимия. 62 (11) : 1380—1393.
- Ярцева Н. М., Арцыбашева И. В., Федорцева Р. Ф., Игнатова Т. Н. 1994. Цитогенетический анализ клеток спонтанно трансформированных линий крыс LRes. I. Перестройки хромосом, выявляемые на ранних стадиях трансформации эмбриональных клеток крыс *in vitro*. Цитология. 36 (12) : 1213—1224.
- Brett J. G., Godman G. C., Miller D. F. 1986. Phenotypic and karyotypic transitions in the spontaneous transformation of a rat cell line. Tissue and Cell. 18 : 27—49.
- Chen H. L., Gabrilovich D., Virmani A., Rathani L., Giris K. R., Nadaf-Rahrov S., Fernandez-Vina M., Carbon D. P. 1996. Structural and functional analysis of 2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. Int. J. Cancer. 67 : 756—763.
- Chesi M., Nardini E., Lim R. S., Smith K. D., Kuehl W. M., Bergsagel P. L. 1998. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. Blood. 92 : 3025—3034.
- Coleman M. L., Marshall C. J., Olson M. F. 2004. RAS and RHO GTPases in G₁-phase cell-cycle regulation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5 : 355—366.
- Davis J. N., McGhee L., Meyers S. 2003. The ETO (MTG8) gene family. Gene. 303 : 1—10.
- Fink S. P., Mikkola D., Markowitz S. 2003. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. Oncogene. 22 : 1317—1323.
- Funaki K., Everitt J., Bermudez E., Walker C. 1991. Trisomy of rat chromosome 1 associated with mesothelial cell transformation. Cancer Res. 51 : 4059—4066.
- Godwin A. K., Testa J. R., Handel L. M., Liu Z., Vanderver L. A., Tracey P. A., Hamilton T. C. 1992. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. J. Nat. Cancer Inst. 84 : 592—601.
- Harley C. B., Futcher A. B., Greider C. W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature. 345 : 458—460.
- Hayflick L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37 : 614—636.
- Heim S., Mitelman F. 1995. Chronic myeloid leukemia. In: Cancer cytogenetics. New York: Wiley-Liss Press. 33—68.
- Helou K., Lu X. C., Montelius-Alatalo L., Stahl F., Klinga-Levan K., Levan G., Rohme D. 2000. A dual-color FISH framework map for the characterization of the Sai 1 tumor suppression region on rat chromosome 5. Genes Chromosomes Cancer. 27 : 362—372.
- Hutchins A. S., Mullen A. C., Lee H. W., Sykes K. J., High F. A., Hendrich B. D., Bird A. P., Reiner S. L. 2002. Gene silencing quantitatively control the function of a developmental trans-activator. Mol. Cell. 10 : 81—91.
- ISCH. 1995. An International system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman F. (Ed.). Basel: S. Karger.
- Kato H., Nishida J., Honda A., Miyamoto K., Fugihuda K., Wake N. 1992. Chromosome alterations contribute neoplastic progression of transformed rat fibroblasts. Cancer Genet. Cytogenet. 58 : 39—47.
- Klein G., Lenoir G. 1982. Translocations involving Ig locus-carrying chromosomes: a model for genetic transpositions in carcinogenesis. Adv. Cancer Res. 37 : 381—387.
- Knudson A. G. 1993. Antioncogenes and human cancer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 10 914—10 921.
- Korkolopoulou P., Kaklamanis L., Pezzella F., Harris A. L., Gatter K. C. 1996. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. Br. J. Cancer. 73 : 148—153.
- Krishnaveni L., Ghosh S. N. 1996. Implication of involvement of rat chromosome 2 in spontaneous transformation of the Rat-2 cell line. Cell Biol. Int. 20 : 331—333.
- Kuroki T., Huh N-ho. 1993. Why are human cells resistant to malignant transformation *in vitro*? Jap. J. Cancer Res. 84 : 1091—1100.
- Linggi B., Muller-Tidow C., van de Locht L., Hu M., Nip J., Serve H., Berdel W. E., van der Reijden B., Quelle D. E., Rowley J. D., Cleveland J., Jansen J. H., Pandolfi P. P., Hiebert S. W. 2002. The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the p14^{ARF} tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Nat. Med. 8 : 743—750.
- Lu X. C., Montelius-Alatalo K., Helou K., Klinga-Levan K., Islam Q., Levan G., Rohme D. 1997. Isolation of DNA markers for the rat Sai 1 gene for suppression of anchorage independence by using representation difference analysis. Somat. Cell Mol. Genet. 23 : 63—74.

- Macleod K. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 10 : 81—93.
- Meehan R. R., Lewis J. D., McKay S., Kleiner E. L., Bird A. P. 1989. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell.* 58 : 499—507.
- Mitelman F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat. Res./Rev. in Mutat. Res.* 462, Issues 2—3 : 247—253.
- Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2004. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations. *Nat. Genet.* 36 : 331—334.
- Otsuki T., Yamada O., Yata K., Sakaguchi H., Kurebayashi J., Nakazawa N., Taniwaki M., Yamata Y., Ueki A. 1999. Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(p16.3;q32.3) and FGFR3 translocation. *Int. J. Oncol.* 15 : 1205—1212.
- Peterson L. F., Zhang D. E. 2004. The 8;21 translocation in leukemia. *Oncogene.* 23 : 4255—4262.
- Pozzi G., Guidi M., Laudicina F., Marazzi M., Falcone L., Betti R., Crosti C., Muller E. E., DiMattia G. E., Locatelli V., Torsello A. 2004. IGF-1 stimulates proliferation of spontaneously immortalized human keratinocytes (HACAT) by autocrine/paracrine mechanisms. *J. Endocrinol. Invest.* 27 : 142—149.
- Rabbitts T. H. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature.* 372 : 143—149.
- Redondo M., Concha A., Oldiviela R., Cueto A., Gozalez A., Garrido F., Ruiz-Cabello F. 1991. Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer Res.* 51 : 4948—4954.
- Richelda R., Ronchetti D., Baldini L., Cro L., Viggiano L., Marzella R., Rocchi M., Otsuki T., Lombardi L., Maiolo A. T., Neri A. 1997. A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood.* 90 : 4062—4070.
- Robinson J., Elder F. F. B. 1987. Multiple common fragile sites are expressed in genome of the laboratory rat. *Chromosome.* 96 : 45—49.
- Ruck A., Paulie S. 1998. EGF, TGF alpha, AR and HB-EGF are autocrine growth factors for human bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 18 (3A) : 1447—1452.
- Sato H., Yoshida M. C., Sasaki M. 1989. High resolution chromosome banding in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 50 : 151—154.
- Seabright M. A. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 65 : 101—109.
- Sekido Y., Fong K. M., Minna J. D. 1998. Progress in understanding the molecular pathogenesis lung cancer. *Biochim. biophys. acta.* 1378 : F22—F59.
- Sherwood S. V., Rush D., Ellsworth J. L., Schimke R. T. 1989. Defining cellular senescence in IMR-9 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 9086—9090.
- Sjoling A., Lindholm H., Samuelson E., Yamasaki Y., Watanabe T. K., Tanigami A., Levan G. 2001. Analysis of chromosomal aberrations involving chromosome 1q31—q53 in DMBA-induced rat fibrosarcoma cell line: amplification and over expression of Jak2. *Cytogenet. Cell Genet.* 95 : 202—209.
- Sundqvist K., Kulkarni P., Hybbinette S. S., Bertolero F., Liu Y., Grafstrom R. C. 1991. Serum-free growth and karyotype analyses of cultured normal and tumorous (SqCC/Y1) human buccal epithelial cells. *Cancer Commun.* 3 : 331—340.
- Tateyama F., Yamabe H., Osawa H., Kaisuka M., Shirato K., Okumura K. 2001. Interleukin-1 beta in an autocrine growth factor of rat glomerular epithelial cells in culture. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 : 1149—1155.
- Westendorf J. J., Yamamoto C. M., Lenny N., Downing J. R., Selsted M. E., Hiebert S. W. 1998. The t(8;21) fusion product, AML1-ETO, associates with C/EBP- α , inhibits C/EBP- α -dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 322—333.
- Wiener F., Badonits M., Spira J., Klein G., Bazin H. 1982. Nonrandom chromosomal changes involving chromosome 6 and 7 in spontaneous rat immunocytomas. *Int. J. Cancer.* 29 : 431—437.
- Yamada T., Okajima F., Adachi M., Ohwada S., Kondo Y. 1998. Growth dependency of a new human pancreatic cancer cell line, YAPC, on autocrine interleukin-1 alpha stimulation. *Int. J. Cancer.* 76 : 141—147.
- Yanagihara K., Kamada N., Tsumuraya M., Amano F. 1993. Establishment and characterization of a human gastric scirrhus carcinoma cell line in serum-free chemically defined medium. *Int. J. Cancer.* 54 : 200—207.
- Yartseva N., Komissarova E., Zhurbitskaya V., Kissel'jova N., Pavlova L., Fedortseva R., Kissel'jov F. 1997. Cytogenetic analysis of rat cells, transformed by human papillomavirus genes. *Oncology Reports.* 4 : 629—635.
- Yee D., Favoni R. E., Lebovic G. S., Lambana F., Powell D. R., Reynolds C. P., Rosen N. 1990. Insulin-like growth factor I expression by tumor of neuroectodermal origin with the t(11;22) chromosomal translocation. A potential autocrine growth factor. *J. Clin. Invest.* 86 : 1806—1814.

Поступила 23 XI 2006

CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS AND THEIR EFFECTS IN SPONTANEOUS IMMORTALIZATION AND TRANSFORMATION OF RAT EMBRYO CELLS *IN VITRO*

N. M. Yartseva,¹ R. F. Fedortseva,² I. V. Artsybasheva¹

¹ Institute of Cytology RAS, and ² All-Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, Emercom of Russia, St. Petersburg; ¹ e-mail: Yartseva@mail.cytspb.rssi.ru

G-banding analysis of LRec-1 and LRec-3, spontaneously immortalized cell lines from rat embryo fibroblast, revealed diploid karyotypes with specific clonal structural rearrangements of chromosomes 7 and 19 — del(7)(q11.2q22.1), t(7;19)(q11.1;q12) in malignant stage. Both clonal abnormalities of chromosomes 7 and 19 were also revealed in LRec-1 k clone and LRec-1 sf cell line. Previous study of LRec-1 and LRec-3 cells showed the presence of karyotypes with pseudodiploid modal chromosome number, partial trisomy of chromosome 7 and same clonal structural rearrangements of chromosomes 7 and 19 in immortalized stage. In malignant stage, the trisomy 6 and new clonal structural rearrangements of chromosomes 1, 2, 11, 15, 18, 19 and of chromosomes 10, 20 were also found in LRec-1 sf and LRec-1 cells, accordingly. There were no new clonal structural chromosome rearrangements in LRec-1 k and LRec-3 cells. We compared loci of chromosomes involved in rearrangements with mapped genes on these chromosomes according to RATMAP. Supposedly these genes are involved in spontaneous immortalization of rat embryo fibroblast and malignant transformation of LRec-1 and LRec-3 cells and rearrangements of chromosomes 1, 2, 11, 15 and 18 facilitate expression of growth factors of LRec-1 sf cells.