

ХАРАКТЕРИСТИКА СПОНТАННО ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА ECV304

I. МНОЖЕСТВЕННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

© Н. М. Ярцева,¹ Р. Ф. Федорцева²

¹ Институт цитологии РАН и ² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург;

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

С помощью метода окрашивания хромосом на G-диски исследован кариотип клеток эндотелиальной линии ECV304, полученной из эндотелиоцитов пуповинной вены человека. Показано, что клетки имеют полиплоидный кариотип с числом хромосом 96—112 и множественными численными и структурными клonalными перестройками хромосом. В структурные перестройки вовлекаются почти все хромосомы кариотипа. Выявлены несколько парных хромосомных перестроек, в том числе del(9)(p21), а также два деривата хромосомы 3 с точкой разрыва в локусе p25 — der(3)t(3;12)(p25;q11~12del(12)q24.21) и der(3)t(3;?)(3p25). Обсуждается роль этих перестроек в иммортализации эндотелиоцитов. Сравнение кариотипов линии ECV304 и линии рака мочевого пузыря T24 показало, что кариотипы различаются по всем основным цитогенетическим характеристикам. Не обнаружено идентичных структурных хромосомных перестроек, а также перестроек, характерных для клеток рака мочевого пузыря. Исследованная нами эндотелиальная линия ECV304 не идентична клеточной линии T24.

Ключевые слова: клеточные линии, линия T24, эндотелиоциты, кариотип, хромосомные перестройки, гены *p16INK4A/p14AR* и *pVNL*.

Принятые сокращения: ХП — хромосомные перестройки, ЭК — эндотелиальные клетки, ЭПВЧ — эндотелиоциты пуповинной вены человека.

Эндотелий играет важную роль в ряде физиологических и патофизиологических процессов, таких как лейкоцитарный поток, воспаление, заживление ран, метастазирование опухолей и ангиогенез. В настоящее время уделяется большое внимание изучению функций эндотелиоцитов и их реакций на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды, особенно радиации. Эндотелиальные клетки (ЭК) очень чувствительны к действию радиации, несмотря на то что являются медленно обновляющейся популяцией клеток.

Информация о свойствах и функциях сосудистого эндотелия в основном получена на первичных культурах ЭК, которые имеют ряд недостатков для исследований: низкий пролиферативный пул, длинный период удвоения популяции и ограниченный жизненный срок. Кроме того, их культивирование часто требует специальных субстратов, ростовых факторов, кофакторов и большую концентрацию сыворотки.

Это определило необходимость создания постоянных эндотелиальных клеточных линий, представляющих собой уникальную клеточную модель для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе нормальной и неопластической пролиферации и миграции ЭК. Кроме того, эти линии используются для разработок фармакологической и генной терапии тромбозов, кардиоваскулярной патологии и новообразований (Takahashi et al., 1990; Hughes, 1996; Rhim et al., 1998; Cajero-Juarez et al., 2002). На-

ряду с этим эндотелиальные клеточные линии необходимы для разработки средств и методов антиangiогенной терапии, заключающейся в предотвращении образования кровеносных сосудов в опухолях с целью лишения опухолевых клеток питательных веществ и кислорода, необходимых для их роста и метастазирования (Горбунова, 2003).

Эндотелиальные клеточные линии получают из ЭК сосудов. Как правило, иммортализация ЭК человека достигается трансфекцией вирусом SV-40, вирусными генами *E6* или *E7* вируса папилломы человека типа 16 (HPV16) (Ide et al., 1988) или онкогенами *v-myc*, *v-mos* и др. Тем не менее были получены спонтанно трансформированные клеточные линии из эндотелиоцитов пуповинной вены человека (ЭПВЧ) ECV304 (Takahashi et al., 1990) и C11STH (Cockerill et al., 1994).

Многочисленные морфологические, иммунохимические и биохимические исследования показали, что клетки ECV304 могут быть использованы в качестве эндотелиальной клеточной модели (Hughes, 1996; Lopez-Pedrera et al., 1997; Suda et al., 2001). Они сохраняют типичную морфологию ЭК в отсутствие ростовых факторов, а также способность к ангиогенезу и другие функциональные особенности ЭК (Takahashi et al., 1990; Hughes, 1996). Тем не менее ряд авторов ставит под сомнение правомерность использования линии ECV304 в качестве модельной системы для исследования сосудистого эндотелия (Drexler et

al., 2002). Показано, что клетки этой линии в отличие от клеток нормального эндотелия не синтезируют маркера ЭК — фактор Виллибранда, при этом также наблюдается экспрессия ряда маркеров ЭК — цитокератинов 6, 8, 10, 17, 18 и 19. Методом фингерпринтинга была выявлена полная идентичность клеток линии ECV304 клетками линии T24, полученной из опухолевых клеток рака мочевого пузыря (Brown et al., 2000). Кариотип клеток линии T24 был исследован современными методами цитогенетического анализа — спектральным кариотипированием (SKY) и методом сравнительной геномной гибридизации (CGH); дана полная кариотипическая характеристика клеток T24 (Harding et al., 2002). В то же время отсутствуют сведения о кариотипе клеток линии ECV304, кроме сообщения автора линии о гипертриплоидном числе хромосом (80) (Takahashi et al., 1990).

Клетки исследуемой нами линии ECV304 имеют типичную для эндотелиоцитов морфологию, характерный тип роста, образуют монослой в виде коблестонов в клеточной культуре. Помимо этого, эти клетки были успешно использованы в экспериментах по эндотелиализации (формирование монослоя, типичного для эндотелиального слоя сосудов) *in vitro* сосудистых протезов «Витафон» (Седов и др., 2000). Поэтому мы предполагаем, что линию ECV304 можно использовать как модель ЭК в культуре, несмотря на противоречивость результатов, полученных при исследовании клеток этой линии в разных лабораториях.

Целью нашей работы было подтвердить это предположение исследованием кариотипа клеток линии ECV304, включая определение модального числа хромосом, количества численных и структурных хромосомных перестроек (ХП), а также идентификацию ХП. Кроме того, в нашу задачу входило сравнение кариотипов клеток линии T24 (рака мочевого пузыря) с клетками нашей линии ECV304, чтобы установить идентичность или различие этих линий.

Материал и методика

Линия ECV304 предоставлена Е. Г. Семеновой (Институт цитологии РАН). ЭК культивировали в чашках Петри на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин.

Получение препаратов хромосом и их окрашивание. Для получения метафазных хромосом в клеточную культуру вводили раствор колхицина в конечной концентрации 0.06 мкг/мл на 2.0—2.5 ч. Гипотоническую обработку клеток проводили смесью растворов 0.55%-ного KCl и 1 %-ного цитрата натрия (1 : 1) при 20 °C в течение 20 мин, затем центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Осадок фиксировали трижды по 15 мин смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Суспензию зафиксированных клеток наносили на сухие предметные стекла, раскапывая с высоты над водяной банией при 55 °C. Для идентификации хромосом использовали модифицированный метод окрашивания на G-диски (Seabright, 1971). Препараты хромосом обрабатывали 40—60 с 0.02%-ным раствором трипсина при 25 °C, затем окрашивали 3—5 мин 2%-ным красителем Гимза на фосfatном буферном растворе (pH 6.8).

Анализ кариотипа. Для определения модального числа хромосом проанализировано 70 метафазных плас-

тинок, при этом строго отбирали пластинки округлой формы, но с максимальным разбросом хромосом, для того чтобы избежать механической потери хромосом. Было кариотипировано 8 метафазных пластинок. Идентификацию хромосом и описание кариотипа проводили согласно наменклатуре G-окрашенных хромосом человека при уровне разрешения 400 дисков на гаплоидный набор хромосом (ISCN, 2005). Структурные ХП, которые встречались хотя бы в двух клетках, определяли как клональные; перестройки, встречающиеся только в одной клетке, — как неклональные. Клональные перестройки, обнаруженные во всех проанализированных клетках, определяли как постоянные, а в нескольких клетках — как субклональные.

Результаты

Цитогенетический анализ линии ECV304 показал, что популяция клеток гипопентаплоидная, число хромосом варьирует от 96 до 112, наиболее представительны два класса клеток с числами хромосом 109 и 110. Клеток с диплоидным кариотипом не обнаружено. С помощью метода дифференциального окрашивания на G-диски показано, что число гомологов нормальных хромосом во всех кариотипированных клетках линии ECV304 варьирует от 1 до 2 гомологов у хромосом 13, 15 и X и от 1 до 5 гомологов у других хромосом. Во всех проанализированных клетках в кариотипе наблюдаются 1 нормальный гомолог у хромосом 9 и 10 и 3 и 5 гомологов — у хромосом 18 и 20 (табл. 1).

Обнаружено, что число множественных структурных ХП почти в каждой клетке больше 40 и варьирует от клетки к клетке. Выявленные перестройки носят как стабильный характер — транслокации и делеции, так и нестабильный — дицентрические хромосомы (13 %), причем двойных фрагментов, которые, как правило, наблюдаются при наличии дицентриков, не обнаружено. Идентифицировать полностью все ХП, используя только метод окрашивания на G-диски, не удалось. Однако установлено, что выявленные ХП являются клональными и неклональными. Среди клональных ХП выявлены постоянные перестройки, встречающиеся в каждой исследованной клетке, и варьирующие, обнаруженные только в некоторых клетках. Постоянные ХП в различных сочетаниях с варьирующими перестройками образуют клоны, и, таким образом, популяция клеток линии ECV304 является поликлональной. В образовании этих хромосомных нарушений принимают участие почти все хромосомы кариотипа, кроме хромосомы 6 (табл. 1, 2). Среди постоянных ХП выявлено 6 парных, из них 2 присутствуют во всех клетках кариотипа — del(9)(p21) и add(17)(pter→q10::?). Кроме того, во всех клетках также выявлены 3 или 4 метацентрические микрохромосомы (см. рисунок).

Интересно отметить, что в 12 идентифицированных ХП точки разрывов хромосом приходятся на центромерные районы add(1)(p10;?), add(5)(q10;?), der(7)(7q10; 8q10), der(11)(10q10:11q10) и add(17)(q10;?) или окколоцентромерные районы — del(4), der(7) и др. (табл. 1, 2). Также показано, что два гомолога хромосомы 3 образуют две перестройки с разрывами в одном и том же локусе 3p25 — der(3)t(3;12)(p25;q11~12)del(12)(q21~q24.?) и add(3)t(p25;?). Второй перестроенный гомолог хромосомы 3 образован за счет транслокации неидентифицированного хромосомного материала на его короткое плечо (табл. 1).

Таблица 1

Клональные структурные хромосомные перестройки в клетках эндотелиальной линии ECV304

Хромосома	Число нормальных гомологов хромосом	Перестроенные хромосомы
1	1—3	add(1)(p10)
1	1—3	der(2)(?7qter → ?7q12::2p25 → 2qter); der(2)t(2;3)(3pter → 3p21 → ::2p23~24 → 2qter)
3	1	del(3)(q25~26.2); der(3)(1:12q24.1 → 12q11~12::3p25 → 3qter) add(3)(p25;?)
4	1—2	der(4)(1qter → 1q?23::4p15.2 → 4q12::?:4q13~21 → 4qter); del(4)(q12":) · 2 ^a
5	2—5	der(5)(5pter → 5cen::5p13 → 5pter) or add(5)cen · 2 ^a
6	2—4	Нет
7	1—2	der(7)(7pter → 7q21::? → ::5q15 → 5qter); der(7)(8)(8pter → 8p10::7q10 → 7qter)
8	1—2	add(8)(q22,); der(8)(18qter → 18q11.2::8 p11 → 8q?11::?)
9	1	del(9)(p21) · 2
10	1	der(16)(10qter → 10q11.2::16p?11.2 → 16qter) der(10;11)(10qter → 10q10::11q10 → 11qter)
11	1—2	der(10;11)(10qter → 10q10::11q10 → 11qter)
12	3—4	der(3)(:12q24.1 → 12q11~12::3p25 → 3qter)
16	2—5	der(16)(10qter → 10q11.2::16p?11.2 → 16qter)
17	1—3	?del(17)(pter → q21::q21 → qter); ins(17;?)(pter → 23::?:q23 → qter) add(17)(pter → cen::?) · 2
18	2—3	der(8)(18qter → 18 q11.2::8 p11 → 8q?11::?)
19	1—3	der(19)(19pter → 19q13.1::?20q11 → 20qter) · 2 ^a

^a В некоторых клетках наблюдается одна такая перестройка.

Таблица 2

Субклональные структурные хромосомные перестройки в клетках эндотелиальной линии ECV304

Хромосома	Число нормальных гомологов хромосом	Перестроенные хромосомы
1	1—3	add(1)(q22)
2	1—3	add(2)(p13)
5	2—5	del(5)(11)
6	2—4	Нет
8	1—2	add(8)(?:p21 → q11.2~11.3::?); der(8)(Xqter → Xq12~13::8p21 → 8qter)
9	1	add (9)(q12~13)
11	1—2	der(11)(?:?hsr::11p15 → 11qter); add(11)(q113)

Таблица 2 (продолжение)

Хромосома	Число нормальных гомологов хромосом	Перестроенные хромосомы
13	1—2	del(13)(q22)
14	1—2	add(14)(q?32)
15	0—1	dep(15)(15pter → 15q15::?:15q22~24::?); del(15)(:p11.2 → cen::q14 → q2?6:)
19	1—3	del(19)(q13.1)
20	5—6	del(20)(q13.1)
X	1—2	der(8)(Xqter → Xq12~13::8p21 → 8qter); del(X)(q12~13);add(X)(p12)

Таким образом, цитогенетический анализ спонтанно трансформированной линии эндотелиальных клеток ECV304 показал, что делящиеся клетки популяции имеют гипопентапloidный кариотип с множественными численными и структурными ХП. В перестройки вовлекаются почти все хромосомы кариотипа, за исключением, возможно, только 6-й хромосомы. Делящихся клеток с диплоидным кариотипом не обнаружено.

Обсуждение

Как следует из сообщения автора линии ECV304 (Takahashi et al., 1990), модальное число хромосом в клетках было гипертриплоидным — 80. К сожалению, автор не сообщает о структурных ХП в этой линии. Мы также не обнаружили другой информации о кариотипе клеток линии ECV304.

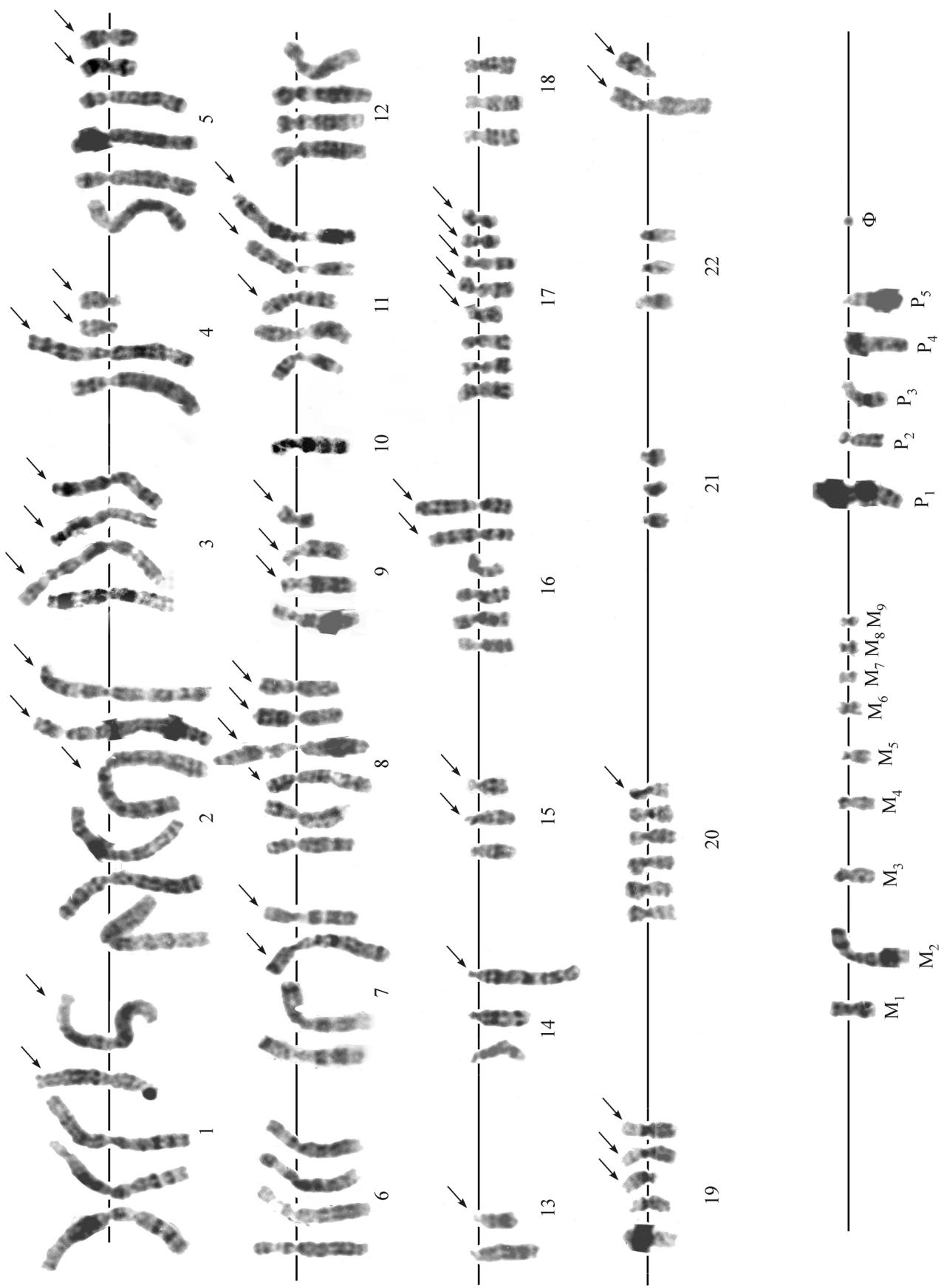
Известно, что необычно большие мультиядерные ЭК довольно часто встречаются в аорте человека, кроме типичных эндотелиоцитов. Методом FISH показано, что ЭК, полученные от молодых доноров, имеют диплоидный набор хромосом. С возрастом увеличиваются анеупloidия и количество мультиядерных клеток (Tokunaga et al., 1998). Частота анеупloidных клеток в эндотелии имеет прямую зависимость от возраста донора, а длина теломеры — обратную зависимость от возраста (Aviv et al., 2001). В то же время полиплоидизация эндотелиоцитов в культуре характерна скорее для ЭПВЧ, чем для клеток сосудов взрослого организма. Кроме того, показаны делеция хромосомы 13 в локусе q14 в ЭК абдоминальной аорты (Nichols et al., 1987), а также потеря хромосомы 13 и полиплоидизация клеток 5 штаммов ЭПВЧ из 8. Параллельно исследовали репликативное старение клеток, которое выявлялось по экспрессии β -галактозидазы. В этих 5 штаммах наблюдали относительно низкий уровень экспрессии этого фермента (β -галактозидазы). Предполагается, что потеря хромосомы 13 — уникальный тип анеупloidии для этих клеток, способствующий появлению клонов ЭК с повышенной выживаемостью (Zhang et al., 2000). По-видимому, не случайна также трисомия хромосомы 11, которая была выявлена как в эндотелиоцитах сосудов взрослых людей, так и в ЭПВЧ (Nichols et al., 1987; Johnson et al., 1992), а также в клетках линии C11STH, полученной в результате спонтанной иммортализации ЭПВЧ *in vitro* (Cockerill et al., 1994).

Цитогенетический анализ клеток нашей линии ECV304 показал, что популяция клеток не имеет четко выраженного модального класса по числу хромосом. Кроме того, по сравнению с данными автора линии (Takahashi et al., 1990) в нашей линии наблюдалось увеличение числа хромосом до 109—110. В кариотипе клеток ECV304 были выявлены всего 1—2 нормальных гомолога, тогда как в пентаплоидном кариотипе должно быть 5 нормальных гомологов хромосом. Важно отметить, что в локусе 13q14 картирован ген *Rb1* — опухолевый супрессор, и утрата его нормального аллеля при наличии мутации во втором аллеле может иметь отношение к иммортализации. В то же время не исключено, что гомологи хромосомы 13 могут участвовать в других структурных ХП, поскольку они не всеми идентифицированы.

Мы наблюдали также значительное число дицентрических хромосом (13 %), но без парных фрагментов, как правило, появляющихся при образовании дицентрических хромосом. Этот факт может указывать на образование дицентриков за счет теломерных ассоциаций, возникающих в результате укорачивания теломерных повторов при старении клеток (Pandita et al., 1995; Filatov et al., 1998; Mukhopadhyay et al., 1998). В то же время такое же количество спонтанных aberrаций (12.9 %) в виде мостов и фрагментов, которые указывают на присутствие в этих клетках дицентрических и кольцевых хромосом, наблюдалось при исследовании этой линии анафазным методом подсчета хромосомных aberrаций (Гильяно и др., 2005). Возможно, теломераза в клетках линии ECV304 не экспрессируется, несмотря на то что в иммортализованных и трансформированных клетках в большинстве случаев наблюдается экспрессия этого фермента.

Множественные структурные ХП, обнаруженные в полиплоидном кариотипе клеток линии ECV304, могут свидетельствовать также о нарушении контрольных точек клеточного цикла — G_1/S , S и G_2/M (Hartwell, Kastan, 1994; Filatov et al., 1998, и др.). В линии ECV304 после γ -облучения ^{137}Cs не было обнаружено накопления клеток в фазе G_1 (Гильяно и др., 2005), следовательно, контрольная точка G_1/S , в результате которой происходит репарация ДНК, в клетках ECV304 не осуществляется в отличие от нормальных клеток.

В кариотипе клеток линии ECV304 были выявлены две парные постоянные ХП: del(9)(p21) и add(17) (17q10:?). Наличие парных ХП, возможно, свидетельствует о том, что они появились еще в диплоидных клетках



Кариотип клетки спонтанно трансформированной эндотелиальной линии ЕСВ304 с числом хромосом 111.

Цифры — номера нормальных хромосом согласно номенклатуре G-окрашенных хромосом человека (Yunis et al., 1978). Стрелки указывают на структурно перестроенные хромосомы, идентифицированные полностью или частично, или те, у которых определена принадлежность хотя бы центромера. M₁—M₆ — маркерные хромосомы — неидентифицированные структурно перестроенные хромосомы, выявленные только в одной клетке; Φ — фрагмент.

до полиплоидизации генома и имеют значение для возникновения трансформированного фенотипа. Делеция *del(9)(p21)* может играть важную роль в иммортализации ЭК. В локусе 9p21 находится супрессорные гены *INK4A/ARF*. Продукт гена *INK4A* белок p16^{INK4A} относится к семейству опухолевых супрессорных белков *INK4*. Этот белок связывается с циклинзависимыми киназами *Cdk4* и *Cdk6*, тем самым препятствуя образованию комплексов с циклинами D и переходу клеток из G₁- в S-фазу.

Продукт второго гена *INK4A/ARF* — супрессорный белок p14^{INK4F} (продукт альтернативной рамки считывания), связываясь с белком *Mdm2*, препятствует образованию комплекса этого белка с белком *p53* и таким образом предотвращает деградацию *p53* (Sherr, 1998; Roussel, 1999). Делеции и точечные мутации в этих генах вызывают одновременно инактивацию двух супрессорных белков и наблюдаются в клетках карцином, наследственных меланомах и других опухолевых (Копнин, 2000; Rocco, Sidransky, 2001). Показано, что во многих опухолях происходит гомозиготная потеря гена *p16^{INK4A}* на ранних стадиях трансформации клеток и что это критическое событие в опухолевой прогрессии (Kamb et al., 1994; Nobori et al., 1994; Spruck, 1994; Rocco, Sidransky, 2001). Скорее всего, в клетках линии ECV304 гены *INK4A/ARF* утрачиваются при образовании делецированной хромосомы *del(9)(p21)*, а нормальная хромосома 9 имеет мутацию в гене *INK4A/ARF* или он также отсутствует. В этом случае утрачивается супрессорная функция белков p16^{INK4A} и p14^{ARF}. Можно предположить, что делеция хромосомы 9 в локусе p21 является одной из первых ХП, появившихся на стадии старения ЭК, и играет важную роль в их иммортализации.

Нами показано, что делящаяся популяция клеток линии ECV304 состоит из полипloidных клеток; вероятно, в клетках ECV304 существует контрольная точка клеточного цикла G₂/M. После остановки клеточного цикла в G₂-фазе полиплоидные клетки с хромосомными перестройками подвергаются апоптозу (Bashe et al., 1999; Buvlamin et al., 1999; Stuschke et al., 2002, и др.), который осуществляется при экспрессии нормального гена *p23*. Однако в линии ECV304 доля апоптотических клеток небольшая, что, скорее всего, определяется отсутствием супрессорного белка p14^{ARF} и деградацией белка *p53* в результате образования комплекса с белком *Mdm2*. Известно также, что контрольная точка G₂/M может осуществляться независимо от статуса и экспрессии гена *p53* (Bashe et al., 1999) в отличие от контрольной точки G₁/S. Это могло привести к появлению в линии ECV304 трансформированных клеток с полипloidным кариотипом и множественными численными и структурными ХП.

Кроме того, в кариотипе клеток линии ECV304 наблюдается две перестроенные хромосомы 3 с точками разрывов в одном и том же локусе p25. В этом локусе выявлен супрессорный ген *VHL*, мутации которого и потеря гетерозиготности по этому гену приводят к развитию заболевания фон Хиппель-Линдау. Это заболевание относится к наследственному раку — образованию опухолей кровеносных сосудов (ангиомы и гемангиомы), феохромоцитом и других опухолей (Kondo, Kaelin, 2001). Продукт гена *VHL* является компонентом белкового комплекса, состоящего из илонгина B и C, а также Cul2 и Rbx1. Этот комплекс полиубиквитинирует и разрушает α -субъединицу фактора HIF1 α , индуцируемого гипоксией (Kaelin, 1999; Maxwell et al., 1999). В негативных по гену *VHL* опухолевых клетках α -субъединица этого фактора стаби-

лизируется, и HIF1 α независимо от гипоксии активирует сосудистый эндотелиальный фактор роста — VEGF, эритропоэтин, а также TGF α . В результате инактивации гена *VHL* опухолевые клетки интенсивно секретируют эти факторы роста, стимулирующие рост сосудов (ангиогенез) в опухолях. Белок pVHL участвует в контроле клеточного цикла и дифференцировки клеток, а также в образовании внеклеточного матрикса и его реорганизации при опухолевой трансформации клеток (Gnarra et al., 1996; Macleod, 2000; Kondo, Kaelin, 2001).

Известно, что клетки ECV304 обладают значительно большей способностью к ангиогенезу *in vitro* при их культивировании на Матригеле по сравнению с нормальным эндотелием (Hughes, 1996). Эти данные соответствуют нашим результатам анализа кариотипа клеток ECV304. Хромосома 3 рвется в локусе p25, в котором картирован ген *VHL*. Если его супрессорная функция отсутствует в результате делеции, клетки могут экспрессировать факторы роста сосудов — VEGF, эритропоэтин и TGF α . Скорее всего, разрыв хромосомы 3 произошел в одном из гомологов еще в диплоидных клетках с образованием делеции района 3pter—p25, включающего в себя супрессорный ген *VHL*. При полиплоидизации генома независимо друг от друга из двух копий делецированной хромосомы 3 образовались две разные перестройки хромосомы 3 с одинаковой точкой разрыва в локусе p25: *der(3)t(3;12)(3p25; 12q11~12;12q?24.1)* и *add(3)t(3;?)(p25)*.

Существует мнение о том, что клетки линии ECV304 — не эндотелиальной природы, а являются опухолевыми эпителиоподобными клетками линии T24 рака мочевого пузыря. Мы сравнили кариотип клеток нашей линии ECV304 с кариотипом клеток T24. Эта линия была исследована современными методами цитогенетического анализа: SKY — спектральным кариотипированием и CGH — сравнительной геномной гибридизацией (Harding et al., 2002). Результаты сравнения показали, что кариотип клеток линии T24 отличается от кариотипа клеток нашей линии ECV304 по основным цитогенетическим характеристикам: модальному числу хромосом (82, а не 109—110, как в клетках ECV304), числу структурных ХП (18, тогда как в клетках ECV304 их более 40), а также по составу перестроенных хромосом. Несмотря на то что в обеих линиях в структурных перестройках участвуют одни и те же хромосомы кариотипа (2, 3, 5, 8, 9, 10 и др.), тип ХП и вовлеченные локусы различаются в этих линиях. Так, например, в обеих линиях есть делеция хромосомы 9 — *del(9p)*, но в линии T24 разрыв хромосомы 9 наблюдался в локусе p13, а не p21, как в клетках ECV304. Делеция локуса 9p21 встречается, как уже упоминалось, в клетках разных типов опухолей и клеточных линий.

Для клеток рака мочевого пузыря были выявлены следующие специфические ХП: амплификация локуса 6p22.3, делеция 8p21.2—21.3 (Hurst et al., 2004), делеции хромосомных плеч 8p, 9p и 11p, а также добавки — частичные трисадомии хромосомных плеч 8q и 1q (Fadl-Elmula et al., 2001; Van Oers et al., 2006). В кариотипе нашей линии ECV304 таких перестроек не наблюдалось. Было выявлено экстракопирование плеч других хромосом по сравнению с кариотипом линии T24 — 1p, 5p, 17p, 20p и 2q.

Таким образом, можно заключить, что митотическая (делящаяся) популяция клеток эндотелиальной линии ECV304 представляет собой гетерогенную популяцию клеток с полипloidным кариотипом и множественными численными и структурными ХП. Наличие парной хромо-

сомы 9 с делецией в локусе p21 позволяет предполагать ее появление в диплоидных ЭК в стадии старения, а также ее роль в иммортализации эндотелиоцитов. Сохранение в клеточной популяции линии полиплоидных клеток с множественными ХП свидетельствует о нарушении контрольных точек клеточного циклов G₁/S и S и сохранение контрольной точки G₂/M, а также об отсутствии апоптотической гибели клеток с aberrантным кариотипом, вероятно связанном с нарушением функций белка p53, опосредованного отсутствием гена p14^{ARF}.

Список литературы

- Гильяно Н. Я., Семенова Е. Г., Бондарева Г. Н., Носкин Л. А., Коневега Л. В. 2005. Модификация клеточной радиочувствительности ингибиторами NO-синтаз. Радиационная биология. Радиоэкология. 45 : 63—67.
- Горбунова В. А. 2003. Новые направления в лекарственном лечении злокачественных опухолей: опухолевый ангиогенез и антиangiогенные препараты. Мед. радиология и радиц. безопасность. 48 (6) : 29—42.
- Копнин Б. П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65 (1) : 5—33.
- Седов В. М., Лебедев Л. В., Гусинский А. В., Андреев Д. Ю., Семёнова Е. Г., Кухарева Л. В., Пинаев Г. П., Соколова И. М., Парамонов Б. А., Дьяков В. Е., Шломин В. В., Шарипов Э. М. 2000. Эндотелизация in vitro сосудистых протезов «Витафон». Информ. бюл. «Клеточные культуры». 15 : 16—19.
- Aviv H., Khan M. Y., Skurnick J., Okuda K., Kimura M., Gardner J., Pnolo L., Aviv A. 2001. Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium. Atherosclerosis. 159 : 281—287.
- Bashe M., Dunst J., Wurl P., Frode D., Meye A., Schmidt H., Rath F. W., Taubert H. 1999. G₂/M checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. Anticancer Res. 19 : 1827—1832.
- Brown J., Reading S. J., Jones S., Fitchett C. J., Howl J., Martin A., Longland C. L., Michelangeli F., Dubrova Y. E., Brown C. A. 2000. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/32. Lab. Invest. 80 : 37—45.
- Bulavin D. V., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 1999. Dereulation of p53/p21 Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after gamma-irradiation. Oncogene. 18 : 5611—5619.
- Cajero-Juarez M., Avila B., Ochoa A., Garrido-Guerrero E., Varela-Echavarria A., Martinez D., Clapp C. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. Eur. J. Cell Biol. 81 : 1—8.
- Cockerill G. W., Meyer G., Noack L., Vadas M. A., Gambl I. R. 1994. Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. Lab. Invest. 71 : 497—509.
- Drexler H. G., Quentmeier H., Dirks W. G., Mac Leod R. A. 2002. Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells. In Vitro Cell Develop. Biol. Anim. 34 : 185—186.
- Fadl-Elmula I., Kytola S., Pan Y., Lui W. O., Derienzo G., Forsberg L., Mandahl N., Gorunova L., Bergerheim U. S., Heim S., Larson C. 2001. Characterization of chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. Int. J. Cancer. 92 : 824—831.
- Filatov L., Golubovskaya V., Hurt J. C., Byrd L. L., Phillips J. M., Kaufmann W. K. 1998. Chromosomal instability is correlated with telomere erosion and inactivation of G₂ checkpoint function in human fibroblasts expressing human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. Oncogene. 16 : 1825—1838.
- Gnarra J. R., Zhou S., Merrill M. J., Wagner J. R., Krumm A., Papavassiliou E., Oldfield E. H., Klausner R. D., Linehan W. M. 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 10 589—10 594.
- Harding M. A., Arden K. C., Gildea J. W., Gildea J. J., Perlman E. J., Viars C., Theodorescu D. 2002. Functional genomic comparison of lineage-related human bladder cancer cell lines with differing tumorigenic and metastatic potentials by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and a novel method positional expression profiling. Cancer Res. 62 : 6981—6989.
- Hartwell L. H., Kastan M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. Science. 266 : 1821—1828.
- Hughes S. E. 1996. Functional characterization of spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV-304: use in an *in vitro* model of angiogenesis. Exp. Cell Res. 225 : 171—185.
- Hurst C. D., Fiegier H., Carr P., Williams S., Carter 2004. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. Oncogene. 23 : 2250—2263.
- Ide H., Minamishima Y., Eizuru Y., Okada M., Sakihama K., Katsuki T. 1988. Transformation of human endothelial cells by SV40 virions. Microbiol. Immunol. 32 : 45—55.
- ISCH. 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel.
- Johnson T. E., Umbenhauer D. R., Hill R., Bradt C., Mueller S. N., Levin E. M., Nichols W. W. 1992. Karyotypic and phenotypic changes during *in vitro* aging of human endothelial cells. J. Cell. Physiol. 150 : 17—27.
- Kaelin W. G. J. 1999. Marry vessels, faulty gene. Nature. 399 : 203—204.
- Kamb A., Gruis N. A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavtigian S. V., Stockert E., Day R. S., III, Johnson B. E., Skolnick M. H. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science. 264 : 436—440.
- Kondo K., Kaelin W. G. J. 2001. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. Exp. Cell Res. 264 : 117—125.
- Lopez-Pedrera C., Jardi M., Engles-Esteve J., Munoz-Anoves P. 1997. Characterization of tissue factor expression on the human endothelial cell line ECV304. Amer. J. Hematol. 56 : 71—78.
- Macleod K. 2000. Tumor suppressor genes. Curr. Opin. Genet. Develop. 10 : 81—93.
- Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G.-W., Clifford S. C., Vaux E. C., Cockman M. E., Wykoff C. C., Pugh C. W., Maher E. R., Ratcliffe P. J. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature. 399 : 271—275.
- Mukhopadhyay T., Multani A. S., Roth J. A., Pathak S. 1998. Reduced telomeric signals and increased telomeric associations in human lung cancer cell lines undergoing p53-mediated apoptosis. Oncogene. 17 : 901—906.
- Nichols W. W., Buynak E. B., Bradt C., Hill R., Aronson M., Jarrell J., Mueller S. N., Levin E. M. 1987. Cytogenetic evaluation of human endothelial cell cultures. J. Cell. Physiol. 32 : 453—462.
- Nobori T., Mluta K., Wu D. J., Lols M., Takabayashi K., Carson D. 1994. Deletions of cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer. Nature. 368 : 753—756.
- Pandita T. K., Pathak S., Geard C. R. 1995. Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. Cytogenet. Cell Genet. 71 : 86—93.
- Rhim J. S., Tsai W. P., Chen Z. Q., Chen Z., Van Waes C., Burger A. M., Lautenberger J. A. A. 1998. Human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. Carcinogenesis. 19 : 673—681.
- Rocco J. W., Sidransky D. 2001. P16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. Exp. Cell Res. 264 : 42—55.
- Roussel M. F. 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. Oncogene. 18 : 5311—5317.
- Seabright M. A. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet. 65 : 101—109.
- Sherr C. J. 1998. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. Genes Develop. 12 : 2984—2991.

- Spruck C. H.* 1994. *P16* gene in uncultured tumours. *Nature*. 370 : 183—184.
- Stuschke M., Sak A., Wurm R., Sinn B., Wolf G., Budach V.* 2002. Radiation-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G_2 -phase checkpoint. *Int. J. Radiat. Biol.* 78 : 807—819.
- Suda K., Rothen-Rutishauser B., Gunthert M., Wunderli-Allespach H.* 2001. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. In *Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 37 : 505—514.
- Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T.* 1990. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. In *Vitro Cell Develop. Biol.* 26 : 265—274.
- Tokunaga O., Satoh T., Yamasaki F., Wu L.* 1998. Multinucleated variant endothelial cells (MVECs) in human aorta: chromosomal aneuploidy and a elevated uptake of LDL. *Semin Thromb Hemost.* 24 : 279—284.
- Van Oers J. M., Adam C., Denzinger S., Stoehr R., Bertz S., Zaak D., Stief C., Hofstaedter F., Zwarthoff E. C., van der Kwast T. H., Knuechel R., Hartmann A.* 2006. Chromosome 9 deletion are more frequent than FGFR3 mutation flat urothelial hyperplasias of the bladder. *Int. J. Cancer.* 119 : 1212—1205.
- Zhang L., Aviv H., Gardner J. P., Okuda K., Patel S., Kimura M., Bardeguez A., Aviv A.* 2006. Loss of chromosome 13 in cultured human vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 260 : 357—364.

Поступила 11 XII 2007

CHARACTERISTICS OF THE SPONTANEOUSLY TRANSFORMED HUMAN ENDOTHELIAL
CELL LINE ECV304. I. MULTIPLE CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS
IN ENDOTHELIAL CELLS ECV304

N. M. Yartseva,¹ R. F. Fedortseva²

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

Karyotype of endothelial line ECV304 cells obtained from human umbilicus vein endothelial cells was studied using G-banding chromosome staining. It has been revealed that the cells have a polyploid karyotype with 96—112 chromosomes and multiple numerical and structural clonal rearrangements. Almost all the chromosomes of the karyotype are involved in structural rearrangements. There are several double chromosome rearrangements revealed including del(9)(p21) as well as two derivatives of chromosome 3 with the breakpoint in the locus p25 — der(3)t(3;12)(3p25;12q11~12q24.?) and der(3)t(3;?)(3p25). The role of these rearrangements in the immortalization of endothelial cells and signs of transformation are discussed. In connection with the information received about the fact that the cells of ECV304 line are not endothelial cells but T24, urinary bladder cancer cells (which karyotype was studied by Hurst et al., 2000), the comparative analysis of the karyotypes of these two lines was carried out. It has been revealed that these two lines differ by all cytogenetic characteristics. Neither identical structural chromosomal rearrangements nor cell characteristic of urinary bladder cancer cells were detected. Our line ECV304 is not identical to the line T24.