

## КАРИОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© В. И. Турилова,<sup>1</sup> Т. Д. Смирнова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> ФГБУ НИИ группа Минздрава России РФ, Санкт-Петербург;  
<sup>1</sup> электронный адрес: turilova@mail.cytspb.rssi.ru

Проведен цитогенетический анализ клеточных линий множественной миеломы (ММ) человека L363, Karpas 707, RPM1 8226 и U-266. Показано, что в процессе длительного существования в условиях *in vitro* число хромосом в клеточных линиях сохранялось на околодиплоидном уровне (L363, Karpas 707 и U-266) или увеличивалось до гипотриплоидного (RPM1 8226). Клеточные линии имели сложно перестроенные кариотипы с аномалиями хромосом всех пар, однако одинаковых транслокаций хромосом не выявлено. Локусы хромосом, которые вовлекались в структурные перестройки, часто совпадали с сайтами копийного дисбаланса, характерного для ММ *in vivo*. В линиях ММ обнаружены разные типы кариотипической структуры клеточных популяций, которые различались сочетанием клеток с основным и дополнительными структурными вариантами кариотипа (СВК) и клеток с неклональными перестройками хромосом. В целом кариотипическая изменчивость клеточных линий ММ соответствует динамике кариотипа миеломных клеток *in vivo* и имеет опухолеспецифический характер.

Ключевые слова: клеточные линии множественной миеломы человека, кариотип, численные и структурные перестройки хромосом, кариотипическая гетерогенность.

Численные и структурные перестройки хромосом играют ключевую роль в онкогенезе, приводя к изменению структуры и функции генов-мишеней, геному дисбалансу и как следствие к нарушению регуляции клеточного цикла и дифференцировки, к гибели и миграции клеток. В многостадийном процессе канцерогенеза выделяют первичные и вторичные перестройки хромосом. Первичные перестройки имеют специфический характер, могут быть выявлены как единственная аномалия кариотипа на ранних этапах развития опухолей и являются знаковыми для разных типов неоплазий человека. Многочисленные и более сложные вторичные перестройки также имеют неслучайный характер, по-видимому, зависят от первичных опухолеспецифических перестроек хромосом и приводят к масштабному геномному дисбалансу (Heim, Mitelman, 2009).

Клеточные линии, полученные из разных типов злокачественных новообразований человека, содержат весь комплекс изменений генома опухолевых клеток *in vivo*. В качестве модельных систем клеточные линии опухолевого происхождения широко используются для исследования молекулярного профиля рака, выявления и изучения генов, вовлеченных в онкогенез, их продуктов, механизмов злокачественной трансформации клеток, а также оценки эффективности противоопухолевых препаратов.

В то же время клеточные линии являются автономными динамичными системами с неограниченным сроком жизни клеток в культуре. В условиях длительного существования *in vitro* происходит дальнейшее изменение как кариотипа, так и тканеспецифических и опухолеспецифических свойств клеток. В связи с этим представляет интерес исследовать кариотипическую изменчивость,

обуславливающую сохранение или изменение опухолеспецифических свойств при длительном существовании клеток в условиях *in vitro*.

Известно, что постоянные клеточные линии характеризуются более низким по сравнению с опухолевыми клетками *in vivo* уровнем кариотипической гетерогенности, выраженным модальным числом хромосом и наибольшим интервалом изменчивости по числу хромосом (Мамаева, 1996). Вместе с тем установлено, что для выживания клеточной популяции *in vitro* необходимо существование в ней в определенных соотношениях клеток с разными структурными вариантами кариотипа (СВК) (Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003). Кариотип клеточной линии имеет индивидуальную сбалансированную структуру, которая определяется специфическим характером численных и структурных изменений хромосом при сохранении хромосомного материала, в целом соответствующего как минимум диплоидному набору аутосом (Мамаева и др., 1983, 1986; Мамаева, 1996).

Изменения кариотипа клеток *in vitro* происходят прежде всего под влиянием условий культивирования. Кариотипическая изменчивость клеточных линий в разных условиях культивирования клеток хорошо изучена (Полянская, 2000; Полянская, Вахтин, 2003). Показано, что характер кариотипической изменчивости клеток, определяемый влиянием факторов культивирования, во многом зависит от исходной структуры кариотипа клеточной линии. В клеточных линиях, полученных из разных типов новообразований человека, структура кариотипа определяется тканеспецифичностью канцерогенеза. Роль тканеспецифических механизмов возникновения и прогрессии опухолей в кариотипической изменчивости

Т а б л и ц а 1

## Источники клеточных линий

Линия	Заболевание <sup>а</sup>	Возраст и пол больного	Литературный источник
RPMI 8226	ММ, IgG $\lambda$ , момент постановки диагноза	61 год, мужской	Matsuoka et al., 1967
U-266	ММ, IgE $\lambda$ , фаза рецидива	53 года, мужской	Nilsson et al., 1970
L363	Плазмоклеточный лейкоз, IgG	36 лет, женский	Diehl et al., 1978
Karpas 707	ММ, IgG $\lambda$ , фаза рецидива	53 года, мужской	Karpas et al., 1982

Пр и м е ч а н и е. Все клетки получены из периферической крови. <sup>а</sup> Указана фаза течения болезни, на которой опухолевый материал использовали для получения клеточной линии.

опухолевых клеток в культуре остается малоизученной. Одним из подходов к исследованию этого вопроса является цитогенетический анализ клеточных линий, полученных из опухолей определенного типа с изученными механизмами молекулярного патогенеза и характером хромосомных нарушений.

Множественная миелома (ММ) — злокачественная опухоль, возникновение которой связано с трансформацией В-клеток на терминальных стадиях дифференцировки. Миеломные клетки имеют фенотипические особенности плазмобластов или долгоживущих плазматических клеток (Kuehl, Bergsagel, 2002). ММ характеризуется выраженной геномной гетерогенностью, обусловленной сложной комбинацией численных и структурных изменений хромосом (Fonseca et al., 2004). По степени сложности и нестабильности перестроек хромосом ММ подобна солидным опухолям (Sawyer, 2011).

Выявлены два типа и, возможно, два механизма возникновения ММ (Smadja et al., 1998). Около половины случаев ММ составляют негипердиплоидные опухоли, в клетках которых число хромосом может быть менее 48 и более 75, т. е. гипо-, псевдодиплоидным или околотетраплоидным. При этом околотетраплоидные кариотипы представляют собой дубликацию гипо- или псевдодиплоидного генома. Полагают, что ключевую роль в патогенезе данного типа ММ играют транслокации с участием генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IGH*) в локусе 14q32 (транслокации IgH), которые приводят к нерегулируемой экспрессии генов, попадающих под энхансер(ы) *IGH* (Bergsagel, Kuehl, 2001). Наиболее распространены пять типов транслокаций IgH — t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q11) и t(6;14)(p21;q32), в результате которых повышается экспрессия генов циклина D1 (*CCND1*, 11q13), *MMSET/WHSC1* и *FGFR3* (4p16.3), *c-MAF* (16q23), *MAFB* (20q11) и циклина D3 (*CCND3*, 6p21) соответственно (Bergsagel, Kuehl, 2005). Подавляющее большинство клеточных линий ММ получено из наиболее агрессивных негипердиплоидных опухолей.

Вторую половину опухолей определяют как гипердиплоидная ММ. В случае гипердиплоидной ММ число хромосом в опухолевых клетках варьирует от 48 до 75. При этом обнаружена избирательная трисомия хромосом восьми нечетных пар: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21, дополнительные копии которых присутствуют в кариотипе в различных сочетаниях (Fonseca et al., 2009). Транслокации IgH имеют характер, скорее, вторичных перестроек хромосом как следствие нарастающей геномной нестабильности при прогрессии ММ и обнаружены менее чем в 10 % опу-

холей (Smadja et al., 2003). Известны единичные случаи получения клеточных линий из опухолевого материала больных гипердиплоидной ММ (Våtsveen et al., 2009).

Вторичные перестройки хромосом при прогрессии того и другого типов ММ включают в себя делеции хромосомы 13 или 13q, аномалии хромосомы 1p (делеции) и 1q (экстракопирование), транслокации хромосом с вовлечением гена *MYS* и делеции 17p (инактивация *p53*) (Fonseca et al., 2009; Sawyer, 2011). Хромосомный дисбаланс при ММ проявляется в том, что в кариотипах опухолевых клеток часто отсутствуют районы хромосом 1p, 6q, 8p, 13q, 14q, 16q, 17p и 22q. Напротив, появление дополнительных копий характерно для районов хромосом 1q, 6p, 12q и 17q, а в случае гипердиплоидной ММ — также районов 5q, 9q, 11q, 15q и 19q (Gutierrez et al., 2004; Walker et al., 2006).

Несмотря на то что основные представления о молекулярном патогенезе ММ получены при интенсивном использовании клеточных линий ММ, кариотипическая изменчивость миеломных клеток в культуре не исследована. Цель настоящей работы — выявление особенностей численных и структурных изменений хромосом в кариотипах четырех длительно существующих в культуре клеточных линий ММ человека, а также определение кариотипической структуры этих клеточных популяций.

## Материал и методика

Основные сведения о происхождении клеточных линий ММ человека L363, Karpas 707, RPMI 8226 и U-266, использованных в работе, приведены в табл. 1. Клеточная линия RPMI 8226 получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), клеточные линии L363, Karpas 707 и U-266 любезно предоставлены проф. К. Нилссоном (Университет г. Упсала, Швеция). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), без антибиотиков.

Для цитогенетического анализа клеточных линий ММ использовали культуры клеток в экспоненциальной фазе роста, через 2—3 сут после пересева. Препараты метафазных хромосом готовили по стандартной методике без предварительной инкубации клеток с колхицином. Клетки обрабатывали гипотоническим раствором, содержащим 0.075 М KCl (Sigma, США) и 1 % цитрата натрия (Sigma, США) в соотношении 1 : 1, в течение 15—20 мин при комнатной температуре. Фиксацию клеток проводи-

ли смесью метанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) с трехкратной сменой фиксатора. После переноса суспензии клеток на предметные стекла препараты высушивали на воздухе.

Рутинное окрашивание хромосом проводили в 1%-ном растворе красителя Гимза (Merck, США). Дифференциальное окрашивание метафазных хромосом на G-диски выполняли по методу (Ozkinay, Mitelman, 1979).

Модальное число хромосом определяли путем их подсчета в 100 метафазных пластинках. Долю полиплоидных клеток в популяции оценивали при просмотре 1000 метафазных пластинок без точного подсчета числа хромосом. Для получения количественных характеристик кариотипа использовали 3—4 препарата метафазных хромосом клеток каждой линии. Анализ структуры кариотипа и кариотипической гетерогенности клеточных популяций проводили среди 100 (клеточная линия L363) и 50 (клеточные линии Karpas 707, RPMI 8226 и U-266) метафазных пластинок, окрашенных на G-диски.

Препараты анализировали под световым микроскопом AxioPhot (Opton, Германия), используя объектив 100×/1.30. Метафазные пластинки фотографировали на пленку «Микрат-изопан». Идентификацию нормальных и перестроенных хромосом проводили по микрофотографиям. Кариотипы и структурно перестроенные хромосомы клеточных линий MM описаны и представлены в соответствии с Международной номенклатурой хромосом человека (Shaffer et al., 2009). Численные и структурные изменения хромосом, которые встречались в двух метафазных пластинках и более, относили к клональным, а обнаруженные в одной клетке — к неклональным изменениям.

## Результаты

Количественные характеристики кариотипов. Клеточные линии MM характеризовались четко выраженным модальным классом клеток по числу хромосом (табл. 2). Доля полиплоидных клеток в популяциях варьировала: наименьшее их количество отмечено в линии L363 (4.8 %), а наибольшее — в линии U-266 (21.4 %).

Анализ структуры кариотипов и кариотипическая гетерогенность. В клеточной линии L363 выявлены два основных СВК, условно обозначенных как I и II, которые различались перестройками одного из гомологов хромосом 5 и 14 (рис. 1, 2). В СВК I (30 % клеток) обнаружены структурные перестройки обоих гомологов хромосомы 5 — add(5)(p13) и add(5)(q11.2), а аномальная хромосома der(14) с дополнительным материалом на длинном плече являлась результатом транслокации хромосом X и 14 — der(14)t(X;14)(q21;q31). СВК II (39 % клеток) содержал нормальный гомолог хромосомы 5, хромосому add(5)(q11.2) и аномальную хромосому add(14)(q31), которая, по-видимому, образовалась вследствие утраты части материала хромосомы X в составе der(14)t(X;14)(q21;q31). Остальные нормальные и структурно перестроенные хромосомы СВК I и СВК II были одинаковыми.

Реаранжировки хромосом в кариотипе клеток L363 представляли несбалансированные транслокации, делеции и экстракопирование отдельных хромосом и хромосомных районов. Выявлены численные изменения хро-

Таблица 2

### Количественные характеристики кариотипов клеточных линий

Линия	Модальное число хромосом <sup>a</sup>	Пределы изменчивости по числу хромосом	Доля полиплоидных клеток в популяции, %
L363	47 (92 %)	45—48	4.8
Karpas 707	45 (89 %)	43—46	7.8
RPMI 8226	67 (73 %)	65—68	8.2
U-266	44 (83 %)	43—45	21.4

<sup>a</sup> В скобках указана доля клеток с модальным числом хромосом, %.

сом X (–X), 7 (+add(7)), 8 (+der(8)) и структурные перестройки хромосом X, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 15, 17, 20 и 22 (рис. 1, 2). В СВК I обнаружено 17 (36.2 %), а в СВК II — 16 (34.04 %) структурно перестроенных хромосом. Хромосомный дисбаланс в клетках L363 проявлялся в экстракопировании материала длинных плеч хромосом 1, 5, 7, 8 и моносомии по длинному плечу хромосомы 6. В клетках с числом хромосом, равным 45 и 46, обнаружены численные неклональные изменения — потери хромосом 2, 4, del(20), 21, 22.

Кариотипическая гетерогенность популяции клеток L363 преимущественно определялась структурными перестройками хромосом в клетках модального класса (2n = 47). Помимо клеток с основными СВК I и СВК II в популяции обнаружены клетки с дополнительными СВК, которые отличались от основных СВК перестройками 1—4 хромосом (рис. 3).

Кариотипическую гетерогенность популяции клеток L363 и взаимоотношения между разными СВК можно представить на основании сопоставления полученных данных с первым описанием кариотипа клеток L363 (Diehl et al., 1978). На ранних этапах культивирования модальный кариотип клеток L363 содержал нормальный гомолог хромосомы 5, аномальные хромосомы add(5)(q11.2) и der(14), а также другие структурно перестроенные хромосомы, которые сохранились в кариотипе при длительном культивировании клеток. В настоящей работе доля клеток с таким СВК составляла только 8 %. Перестройки второго гомолога хромосомы 5 и хромосомы der(14), которые, по-видимому, произошли в процессе культивирования клеток, привели к стабилизации двух основных СВК (СВК I и СВК II). Причем среди клеток с СВК I не выявлено никаких других вариантов кариотипа, а среди клеток с СВК II обнаружен вариант кариотипа (4 % клеток) с трисомией по хромосоме 16 и числом хромосом 48.

Кариотип клеток, в котором присутствовали нормальный гомолог хромосомы 5, аномальные хромосомы add(5)(q11.2) и der(14), оказался менее стабильным. Среди клеток с таким сочетанием структурно перестроенных хромосом 5-й и 14-й пар обнаружены клетки с разными СВК (рис. 3). При этом поливариантность кариотипа клеток обусловлена главным образом перестройками материала хромосомы 1. Материал хромосомы 1 как нормального гомолога, так и в составе измененных хромосом add(1)(p36.3) и der(8)t(1;8)(q12;p11.2) вовлекался в клональные перестройки, выявленные в дополнительных СВК. Эти перестройки включали в себя в одном СВК перестройку длинного плеча хромосомы add(1)(p36.3)

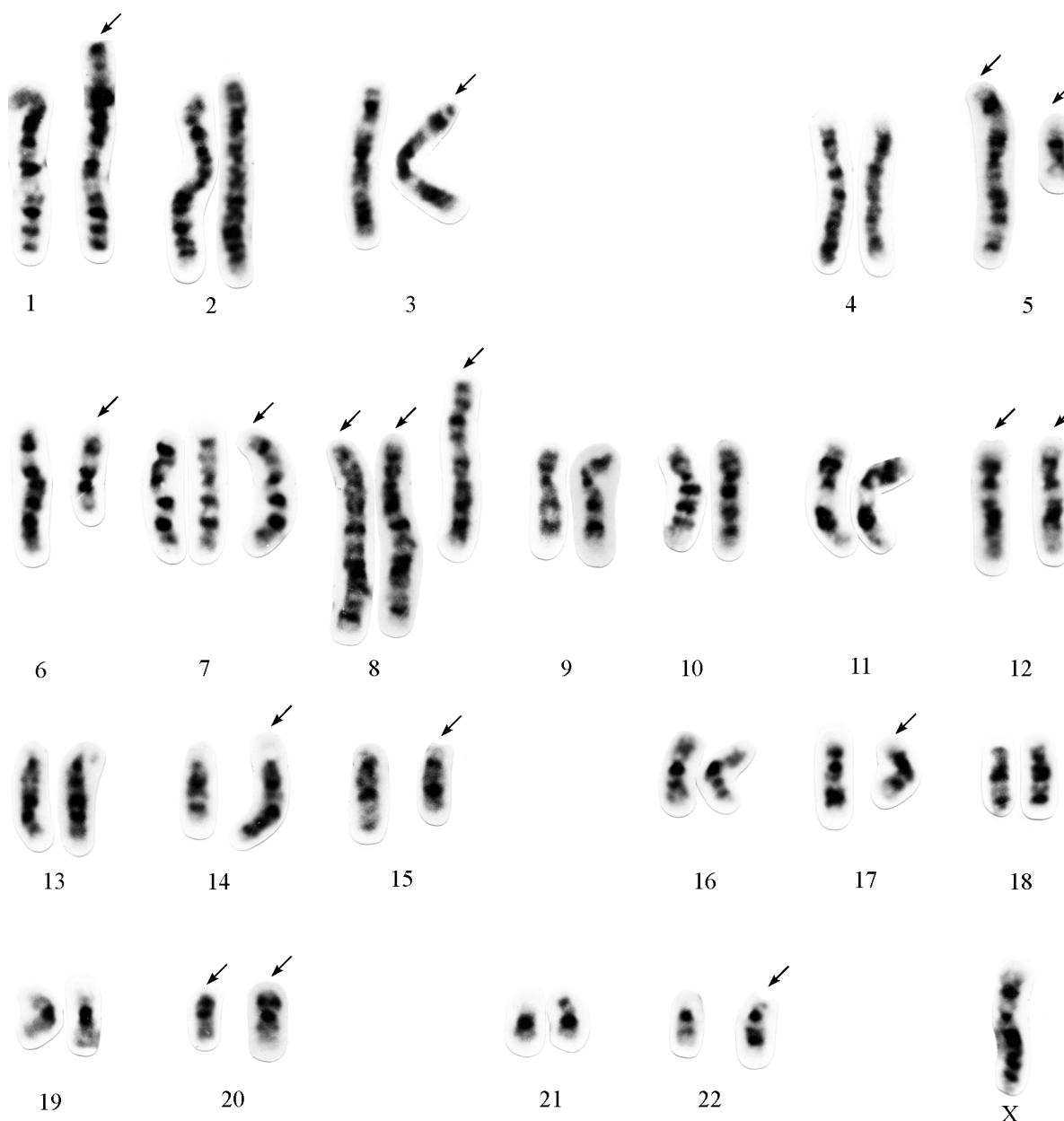


Рис. 1. Структурный вариант кариотипа I клеточной линии L363.

47,X,-X,add(1)(?:p36.3→qter),add(3)(pter→q21::?),add(5)(?:p13→qter), add(5)(pter→q11.2::?),add(6)(pter→q11::?),add(7)(?:p13→qter), der(8)(8pter→8q24.1::5q11.2→5qter)×2,+der(8)(1qter→1q12::8p11.2→8qter), del(12)(pter→p12::p11.2→qter), add(12)(?:p11.1→qter), der(14)t(X;14)(14pter→14q31::Xq21→Xqter),add(15)(pter→q22::?), der(17)(?:p11.2→q21::?),del(20)(pter→p11.2::p11.2→qter),add(20)(pter→q11.2::?), add(22)(pter→11.2::?).  
Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы.

(7 % клеток), а в другом — перестройку длинного плеча хромосомы 1 в составе хромосомы  $der(8)t(1;8)(q12;p11.2)$  (2 % клеток).

Еще один дополнительный СВК (5% клеток) отличался перестройкой с участием хромосом 1 и 10, которая приводила к появлению аномальных хромосом  $add(1)(p13)$  и  $der(10)t(1;10)(p22;q25)$ . В другом СВК (5 % клеток) с такой перестройкой хромосом 1 и 10 обнаружена перестройка хромосомы  $add(7)(p13)$  с появлением на коротком плече дополнительного материала неизвестного происхождения. В 1 из этих 5 клеток была выявлена неклональная структурная перестройка хромосомы 11 ( $add(11)(p11.2)$ ).

Таким образом, в кариотипической структуре популяции клеток L363 выявлены основные СВК I и СВК II и

дополнительные СВК. При этом клетки с неклональными перестройками — как численными, так и структурными — встречались редко.

Клеточная линия Karpas 707. Перестройки хромосом, обнаруженные в кариотипе клеток Karpas 707, так же как в клетках L363, включали в себя несбалансированные транслокации, делеции и экстракопирование отдельных хромосом. Численным изменениям подвергались хромосомы Y(-Y), 12(-12), 13(-13), 16(-16), 17(-17) и 21(+add(21)). Хромосомы X, 4—6, 11, 13, 15—19, 21 и 22 вовлекались в структурные перестройки (рис. 4). Число структурно перестроенных хромосом в основном варианте кариотипа составляло 17 (37.8 %). Поскольку происхождение трех хромосом кариотипа (mar1—mar3) не установлено, невозможно оценить хромосомный дисба-

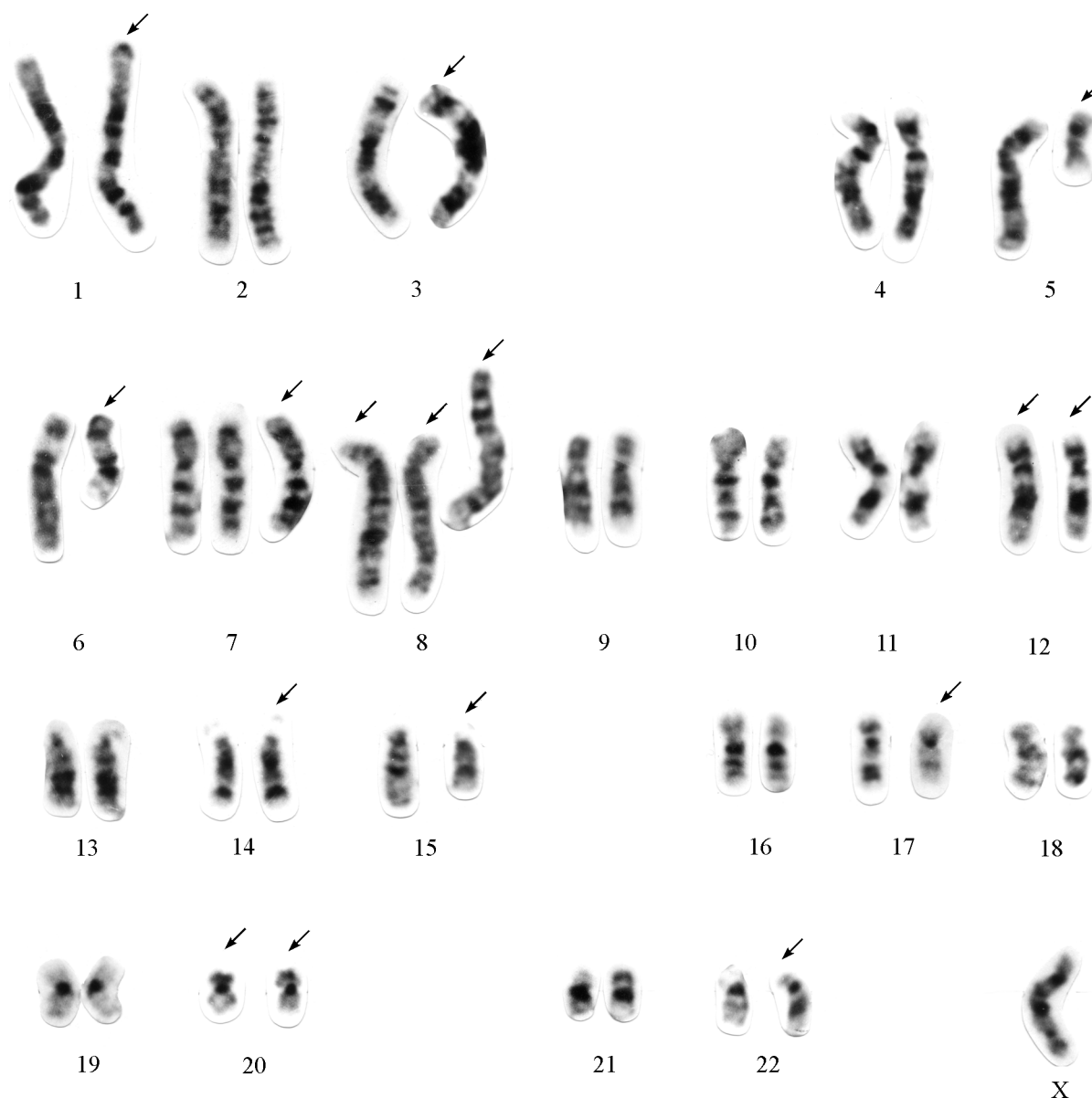


Рис. 2. Структурный вариант кариотипа II клеточной линии L363.

47,X,-X,add(1)(?:p36.3→qter),add(3)(pter→q21::?),add(5)(pter→q11.2::?), add(6)(pter→q11::?),add(7)(?:p13→qter), der(8)(8pter→8q24.1::5q11.2→5qter)×2, +der(8)(1qter→1q12::8p11.2→8qter),del(12)(pter→p12::p11.2→qter), add(12)(?:p11.1→qter),add(14)(pter→q31::?),add(15)(pter→q22::?), der(17)(?:p11.2→q21::?),del(20)(pter→p11.2::p11.2→qter),add(20)(pter→q11.2::?), add(22)(pter→q11.2::?). Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы.

ланс в клетках и определить, моносомия по какой из хромосом — 12, 13, 16 или 17 — является истинной.

В отличие от популяции клеток L363, в которой наблюдали два основных СВК и дополнительные СВК, кариотипическая структура популяции клеток Карпас 707 была иной. В клеточной линии Карпас 707 были выявлены два СВК, которые различались перестройкой хромосомы 19. Один вариант кариотипа (36 % клеток) содержал два нормальных гомолога хромосомы 19. В другом, основном СВК (64 % клеток), присутствовали нормальная хромосома 19 и anomальная хромосома add(19)(q13.3). При этом в том и другом вариантах кариотипа наблюдали неклональные перестройки хромосом (30 % клеток), не связанные с каким-либо одним вариантом кариотипа. Различия между СВК заключались лишь в частоте появления клеток с неклональными пере-

стройками. Так, среди клеток, кариотип которых содержал два нормальных гомолога хромосомы 19, клетки с неклональными перестройками составляли 38.9 %. Доля клеток с неклональными перестройками среди клеток, содержащих одну нормальную хромосому 19 и ее anomальный гомолог, составляла 25 %. Численные неклональные изменения включали в себя как увеличение материала хромосом (трисомия по хромосоме 1), так и его потерю (хромосомы der(X), 5, add(6), der(13), 20, 21, add(21)). Хромосомы der(X), 3, 12, 14 и 15 были вовлечены в структурные неклональные перестройки (рис. 7).

Клеточная линия RPMI 8226. В кариотипе клеток RPMI 8226 были выявлены преимущественно несбалансированные транслокации (рис. 5). В структурные перестройки вовлекались хромосомы 1—3, 5, 6, 8—12,

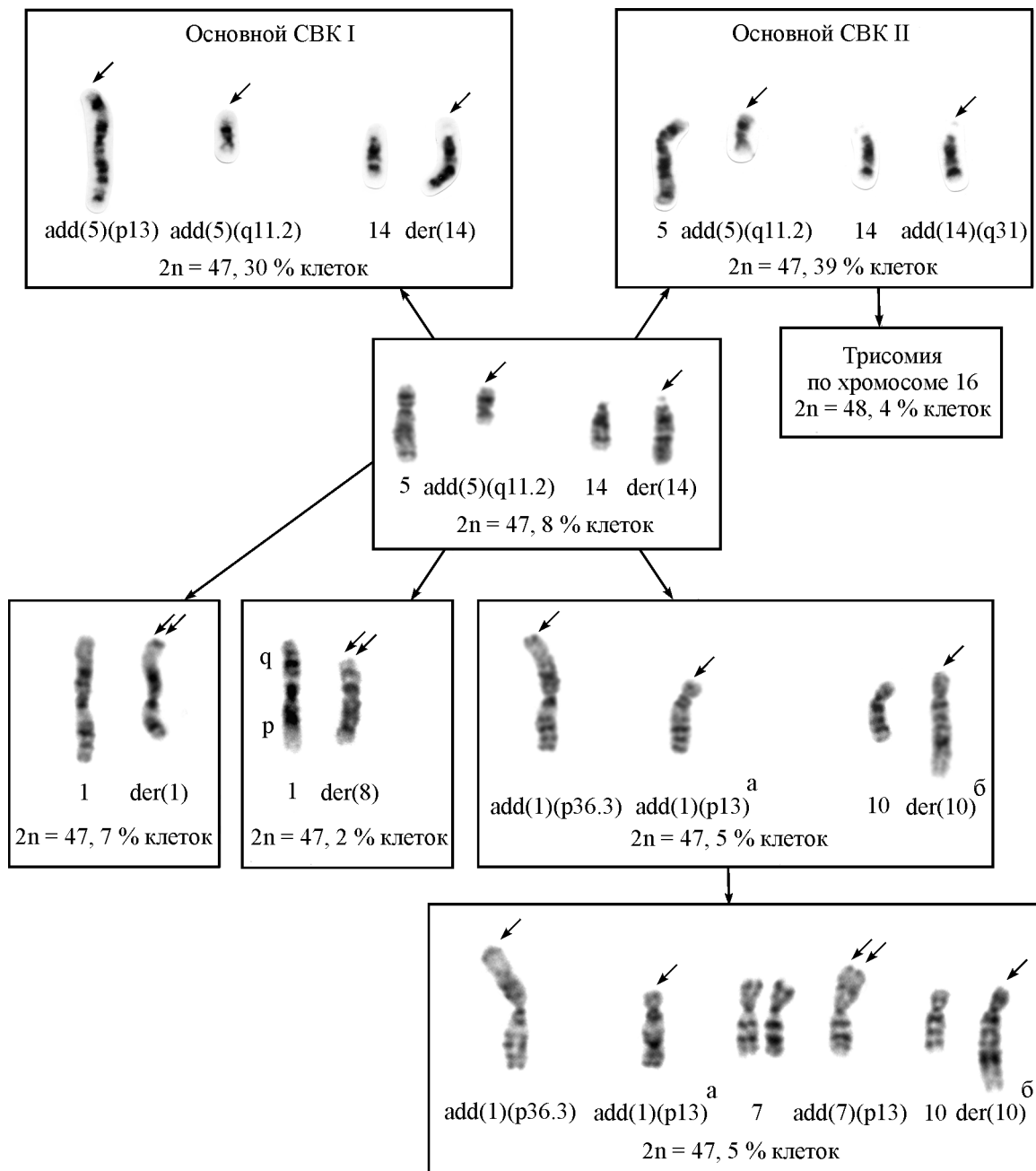


Рис. 3. Кариотипическая гетерогенность популяции клеток L363.

В рамках представлены хромосомы, перестройки которых отличают разные СВК клеток. Стрелки между рамками показывают происхождение разных СВК. Двойными стрелками обозначены аномальные хромосомы кариотипа, вовлеченные в дальнейшие структурные перестройки в клетках с дополнительными СВК:  $der(1)(?::p36.3 \rightarrow q32::?)$ ,  $add(7)(?::p13 \rightarrow qter)$ ,  $der(8)(?::1q25 \rightarrow 1q12::8p11.2 \rightarrow 8qter)$ ,  $add(1)(?::p13 \rightarrow qter)$ ;  ${}^b der(10)t(1;10)(10pter \rightarrow 10q25::1p22 \rightarrow 1pter)$ . Доля клеток с разными СВК указана от общего числа проанализированных клеток ( $n = 100$ ).

14, 15—17 и 22. В основном СВК число аномальных хромосом составляло 25 (37.3%). Хромосомный дисбаланс в клетках RPMI 8226 можно оценить только по тем хромосомам и хромосомным районам, которые представлены в кариотипе числом копий, большим или меньшим по отношению к уровню пloidности клеток. Так, хромосомы 7, 18, 21 и хромосомные районы 1q, 16p, частично 5q и 16q были представлены в четырех копиях. Напротив, хромосомы 4, 8—10, 13, 14 и 19 присутствовали в основном в двух копиях. Хотя кариотип клеток RPMI 8226 содержал по одной нормальной копии хромосом 15 и 22, материал этих хромосом вовлечен в структурные перестройки

и в целом количественно соответствовал околотриплоидному уровню клеток.

Популяция клеток RPMI 8226 характеризовалась значительной кариотипической гетерогенностью. Основным СВК (рис. 5) был обнаружен только в 42% клеток, остальные 58% содержали неклональные численные и структурные перестройки хромосом. В разных клетках RPMI 8226 были отмечены дополнительные копии хромосом 5, 8 или появление хромосом неизвестного происхождения, отсутствовали хромосомы 4,  $add(6)$ , 15, 20—22,  $mar1$ , одна из копий  $mar4$ . В неклональные структурные перестройки вовлекалось большинство нормальных и

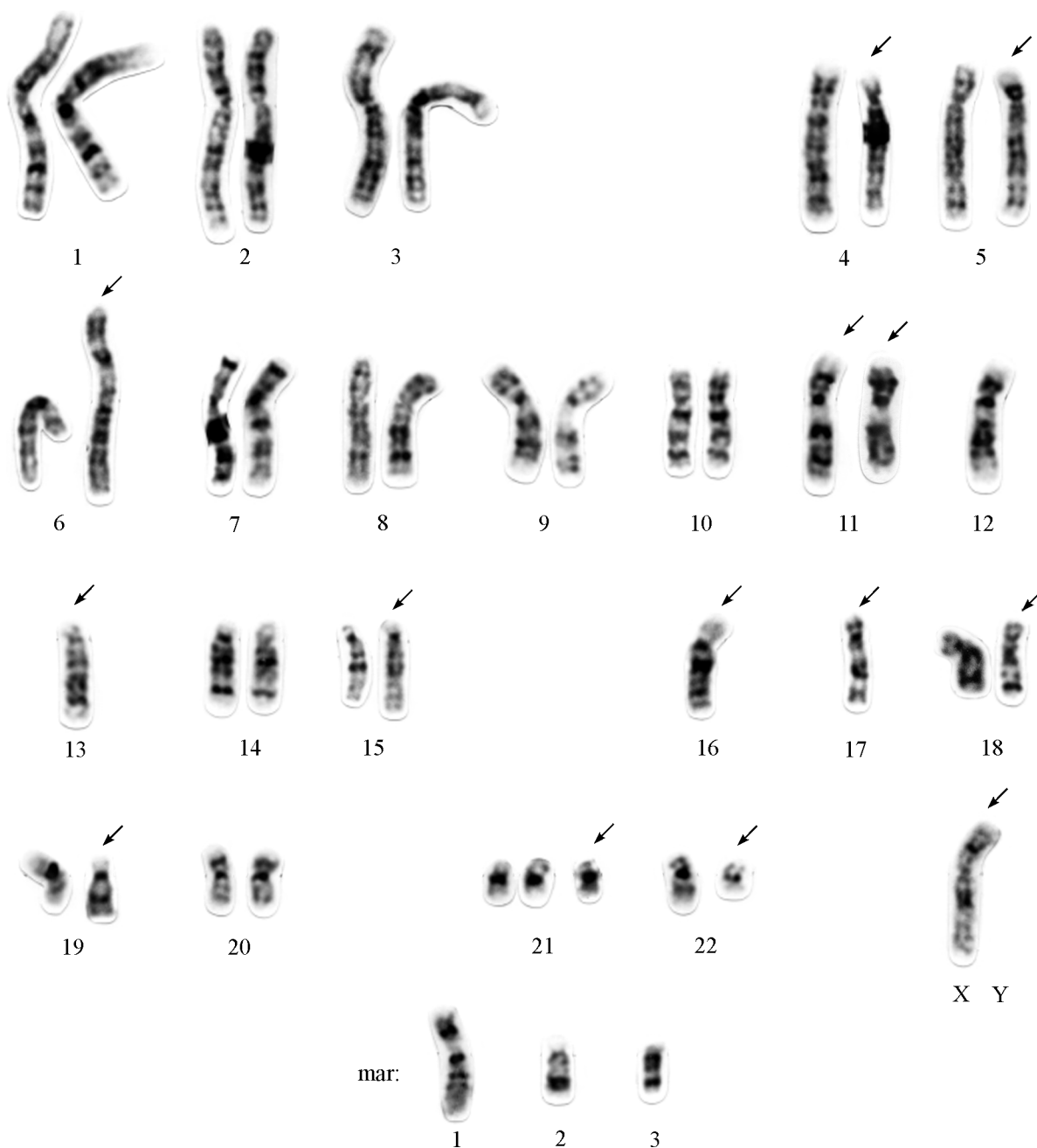


Рис. 4. Основной структурный вариант кариотипа клеточной линии Karpas 707.

45,der(X)(?:p22.1→q22::?),-Y,add(4)(?:p12→qter),add(5)(?:p12→qter), add(6)(?:p21.3→qter),add(11)(pter→q14::?),add(11)(pter→q14::?),-12,-13,der(13)(pter→q12::?:q12→q14::q14→qter),add(15)(pter→q22::?),-16,add(16)(pter→q12.1::?),-17,der(17)(p13→q25::?),der(18)(pter→q11.2::?:q11.2→q21.3::?:q21.3→qter),add(19)(pter→q13.3::?:q13.3→qter),+add(21)(pter→q21::?:q21→qter),+add(22)(pter→q11.2::?:q11.2→qter),+3mar. Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы, происхождение которых установлено.

аномальных хромосом кариотипа (рис. 7). Наиболее нестабильной в кариотипе клеток RPMI 8226, как и в клетках L363, оказалась хромосома 1, которая часто подвергалась неклональным структурным изменениям. Среди этих аномалий следует отметить экстракопирование различных районов 1q, которые в виде несбалансированных транслокаций были обнаружены в отдельных клетках на длинных плечах хромосом 1, 2, 5 и 7. Однако вовлечение локусов 1q в такие транслокации имело случайный характер (рис. 7).

Клеточная линия U-266. Кариотип клеток U-266 содержал комплексные перестройки хромосомного

материала, при этом 23 хромосомы (52.3 %) имели структурные аномалии (рис. 6). 7 измененных хромосом (mar1—mar7) идентифицировать не удалось. Масштабная реарранжировка кариотипа также не позволила оценить хромосомный дисбаланс в клетках.

Несмотря на множественные перестройки хромосом, популяция клеток U-266 характеризовалась относительной кариотипической стабильностью. Основной СВК выявлен в 84 % клеток. Кариотипическая гетерогенность обусловлена присутствием клеток с неклональными перестройками (16 % клеток). Численные неклональные изменения хромосом включали в себя потерю хромосомы

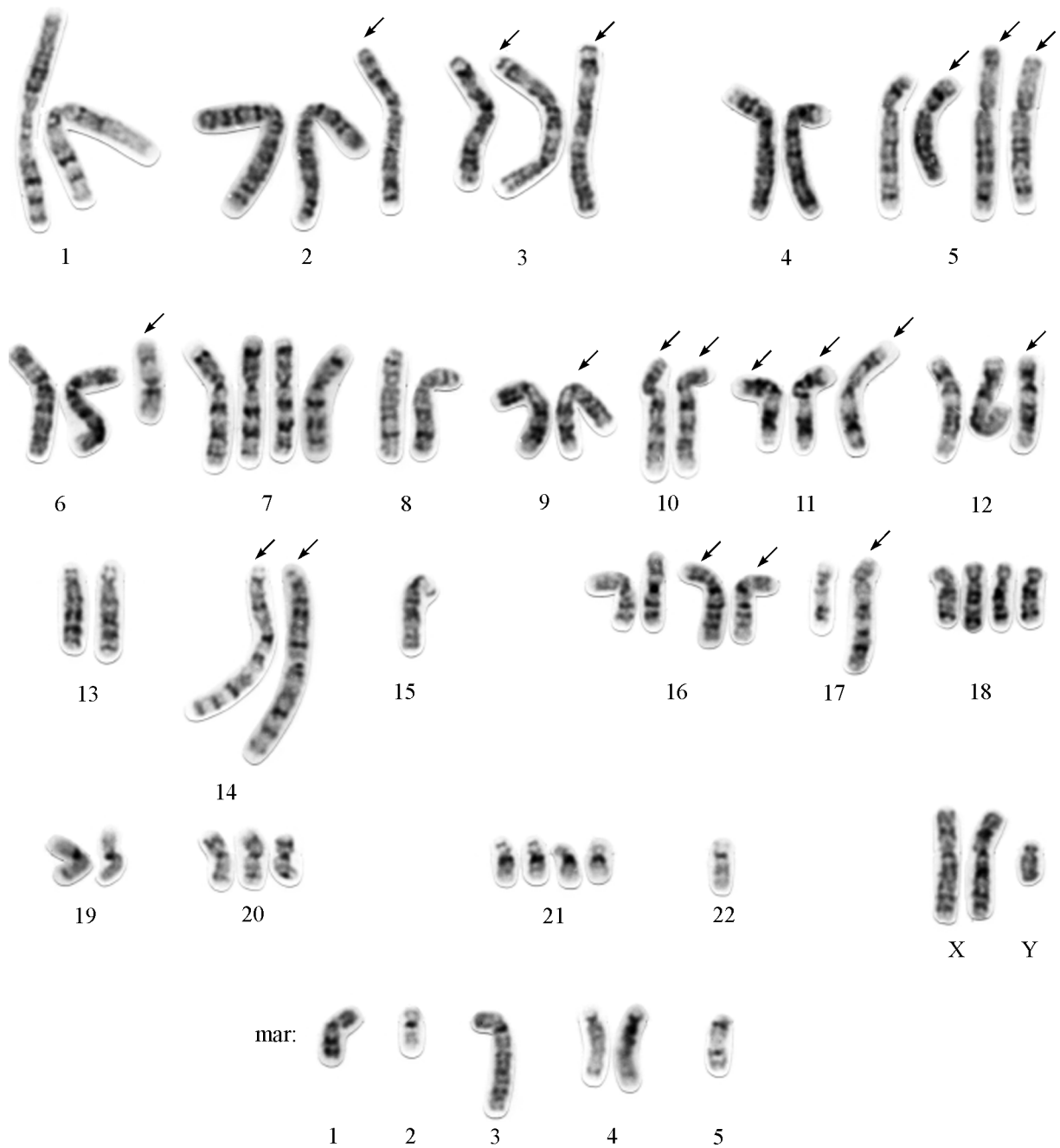


Рис. 5. Основной структурный вариант кариотипа клеточной линии RPMI 8226.

67,XXY,-1,add(2)(pter→q33::?),dup(3)(pter→q26.3::q25→qer)×2,-4, add(5)(pter→q22::?),der(5)(6pter→6p21.3::?:5p11→5qter), +der(5)(15qter→15q21::?:5p11→5qter),add(6)(pter→q13::?:),+7,-8,-9, add(9)(?:p13→qter),-10,add(10)(pter→q26::?)×2, add(11)(pter→q23::AgNOR)×2,der(11;17)(17qter→17q10::1q10→11qter), add(12)(pter→q24.1::?:),-13,-14,der(14)(14pter→14q32::1p13~q12→1qter)×2, -15,-15, der(16)(16pter→16q23::?:22q11.2→22qter), +der(16)(16pter→16q23::?:22q11.2→22qter),-17, der(17)(17pter→17q25::?:8q22→8qter),+18,-19,+21,-22,-22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4:der(?) (?→?cen→?:1p32→1pter)×2,+mar5. Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы, происхождение которых установлено.

21 или появление хромосом неизвестного происхождения. В структурные неклональные перестройки вовлекались хромосомы X, 1, add(1), 2, del(3), 5, add(6)(q13), add(6)(q21), 12, add(12), mar7 (рис. 7).

Вовлечение хромосом в структурные перестройки. Сложность геномных нарушений в длительно культивируемых клеточных линиях ММ проявлялась в том, что хромосомы каждой пары кариотипа подвергались структурным изменениям (рис. 7). Хромосомы X, 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15 и 22 вовлекались в структурные

клональные и неклональные перестройки в клетках всех четырех исследованных линий. Однако одинаковых транслокаций хромосом не выявлено.

В целом в клеточных линиях ММ было идентифицировано 108 локусов, вовлеченных в структурные перестройки, при уровне разрешения хромосом 400 бендов на гаплоидный набор. Точки разрывов при образовании структурно перестроенных хромосом были локализованы преимущественно в G-негативных дисках (49%), центромерных (p11 → q11) и прицентромерных (p11.2 и q11.2)



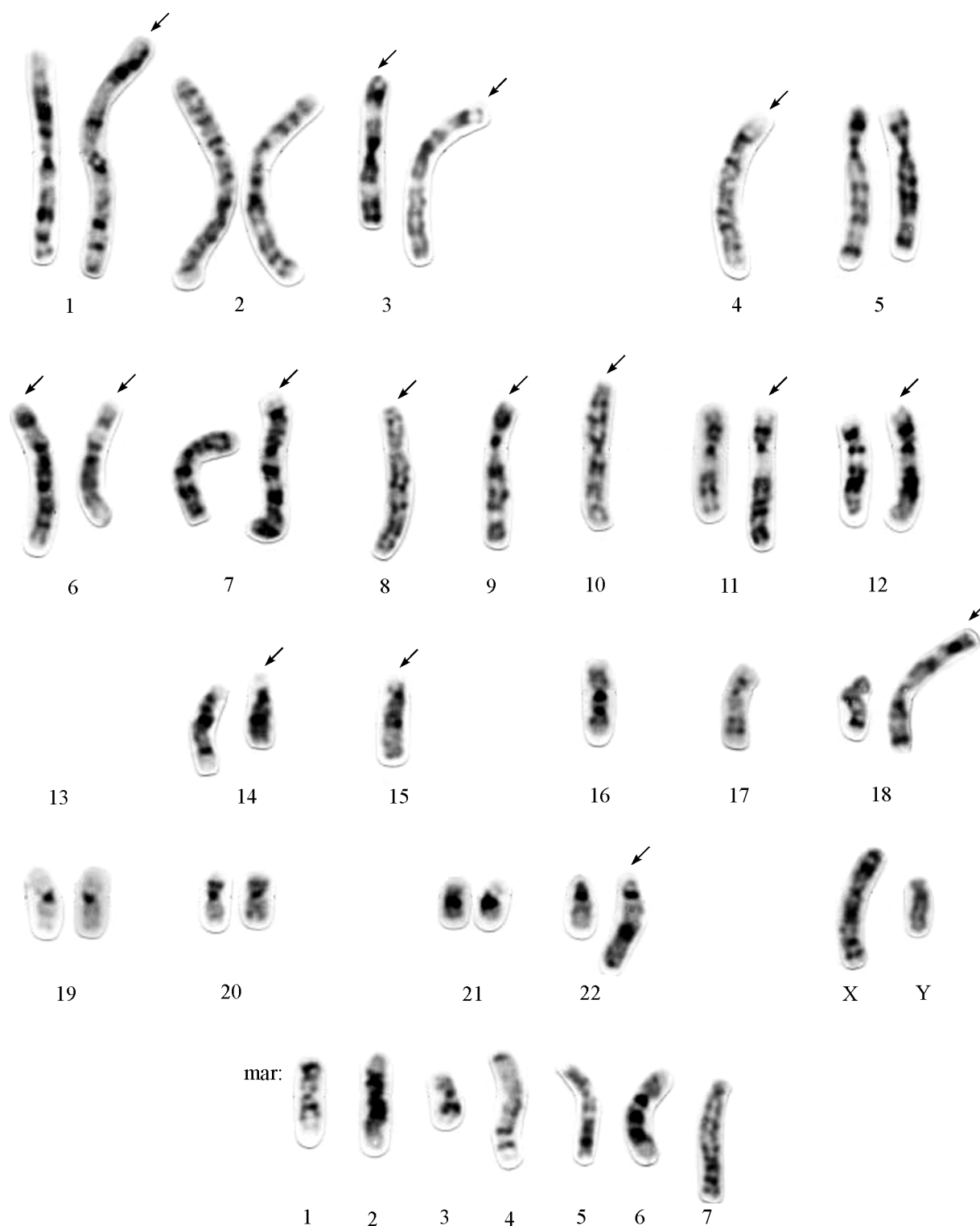


Рис. 6. Основной структурный вариант кариотипа клеточной линии U-266.

44,XY,add(1)(?:p13→qter),del(3)(pter→26.2:),add(3)(pter→q25::?),-4, der(4)(?:p16:p15.2→p14:p12→q21::?),add(6)(pter→q21::?), add(6)(pter→q13::?), add(7)(pter→q32::?),-8,der(8)(8pter→8q24.1::?:7q31→7qter),-9, add(9)(pter→q34::?),-10,der(10)(?:q24→q21::p11.2→qter), der(11)(11pter→11q13::?:11q13→11q21::4q22→4qter), add(12)(?:p11.1→qter),-13,-13,add(14)(pter→q13::?),-15, der(15)(pter→q11.2::?:q21→qter),-16,-17,-18,add(18)(?:p11.3→qter), der(22)(22pter→22q11.2::?:15q15→15qter),+7mar. mar3:der(?10), mar7:der(?13). Стрелками обозначены структурно перестроенные хромосомы, происхождение которых установлено.

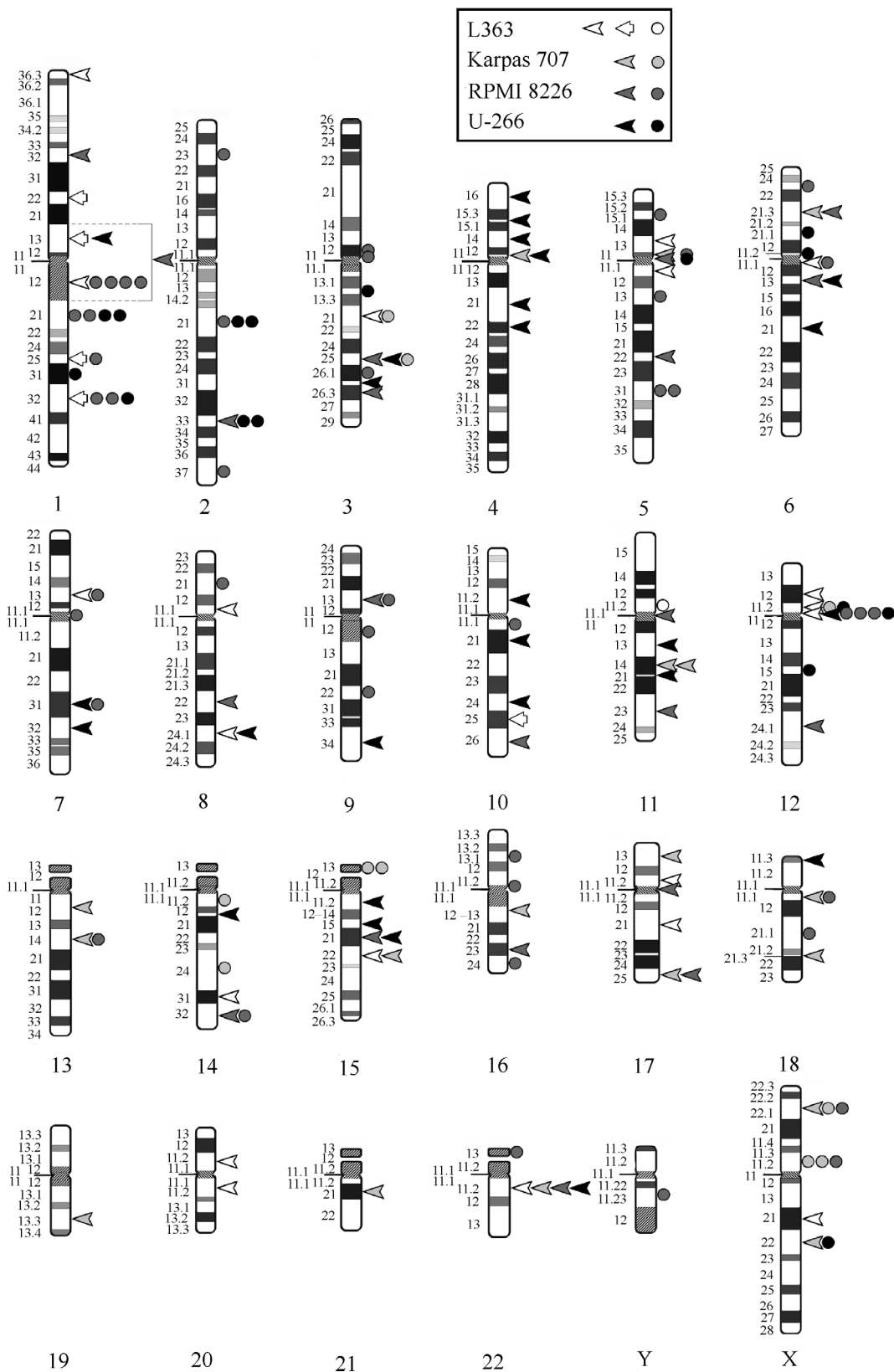


Рис. 7. Схема вовлечения хромосом и хромосомных локусов в структурные клональные и неклональные перестройки в клеточных линиях L363, Karpas 707, RPMI 8226 и U-266.

Локусы, которые вовлекаются в клональные перестройки хромосом в клетках всех линий, показаны *головками стрелок*; в дополнительных СВК клеточной линии L363 — *стрелками*; локусы, которые вовлекаются в неклональные перестройки хромосом в клетках всех линий, показаны *кружками*.

районах (27 %). Реже в перестройках участвовали G-позитивные диски (13 %) и теломерные локусы (11 %).

Анализ вовлечения локусов хромосом в клональные и неклональные структурные перестройки показал, что 9 % локусов неоднократно вовлекались только в клональные перестройки, а 5 % локусов — только в неклональные. В то же время 18 % локусов участвовали как в клональных, так и в неклональных структурных перестройках в клетках одной и той же или разных линий. Остальные 68 % локусов однократно обнаружены в клональных (43 %) или неклональных (25 %) перестройках хромосом в клетках всех исследованных линий (рис. 7).

### Обсуждение

Выполненный нами анализ показал, что все исследованные линии имели сложно перестроенные кариотипы с аномалиями хромосом всех пар и различную структуру клеточных популяций.

Известно, что онкогенетические механизмы возникновения двух разных по пloidности клеток типов ММ определяют дальнейшую прогрессию опухолей, в процессе которой уровень пloidности клеток, как правило, не изменяется (Chng et al., 2006). Можно предполагать, что в клеточных линиях, полученных из негипердиплоидных опухолей, число хромосом будет сохраняться околодиплоидным или околотетраплоидным. Действительно, в клеточных линиях L363, Karpas 707 и U-266 с околодиплоидным кариотипом модальное число хромосом не изменялось на протяжении длительного культивирования (Nilsson, 1971; Diehl et al., 1978; Karpas et al., 1982). В клеточной линии RPMI 8226 на ранних этапах культивирования преобладали гиподиплоидные клетки с модальным числом, равным 39 (Moore, Kitamura, 1968). Однако на современном этапе прогрессии кариотипа клетки RPMI 8226 являются гипотриплоидными с модальным числом 67 хромосом. Анализ количественных характеристик кариотипов клеточных линий ММ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ, www.dsmz.de/)) показывает, что некоторые клеточные линии также имеют околодиплоидный статус, в то время как кариотип других клеточных линий стабилизируется на околотриплоидном уровне.

Возможны два направления эволюции кариотипа при прогрессии опухолевых клеток: по типу моносомий и по типу трисомий (Muleris et al., 1988). Появление в кариотипе дополнительных копий отдельных нормальных и (или) структурно перестроенных хромосом характеризует эволюцию кариотипа по типу трисомий. При этом число хромосом в клетках возрастает до гипердиплоидного (Gisselsson, 2011). Согласно представлениям об эволюции кариотипа по типу моносомий (Muleris et al., 1988), появление несбалансированной транслокации сопровождается потерей потенциального реципрокного продукта и, следовательно, утратой одной из хромосом кариотипа. В миеломных клетках частая потеря аномальной хромосомы 14, образующейся в результате реципрокной транслокации IgH, особенно в случае t(4;14)(p16.3;q32) (Keats et al., 2003), вполне согласуется с таким предположением. После нескольких циклов событий, приводящих к возникновению новых несбалансированных транслокаций и утрате ряда хромосом кариотипа, возможны эндоредупликация и появление околотетраплоидного кариотипа с удвоенными копиями как нормальных, так и aberrантных хромосом.

Последующие транслокации и элиминации хромосом могут приводить к стабилизации кариотипа на околотриплоидном уровне (что *in vivo* показано в основном для опухолей эпителиального происхождения, но не ММ). Такой тип эволюции кариотипа, обнаруженный в опухолях и клеточных линиях молочной железы (Davidson et al., 2000) и толстой кишки человека (Abdel-Rahman et al., 2001), также характерен и для клеточной линии RPMI 8226 с гипотриплоидным кариотипом. В кариотипе клеток RPMI 8226 некоторые аномальные хромосомы представлены в двух копиях, а нормальные хромосомы — в четырех или двух копиях. Вероятно, те хромосомы кариотипа клеток RPMI 8226, которые присутствуют в двух копиях, подвергались структурным перестройкам и (или) делеции.

Иной характер эволюции кариотипа демонстрируют околодиплоидные клеточные линии, в которых в процессе длительного культивирования происходят структурные перестройки фактически без изменения числа хромосом (L363, Karpas 707 и U-266). Следовательно, специфический механизм генетической нестабильности, обуславливающий онкогенез ММ *in vivo*, определяет количественные изменения кариотипа и при длительном культивировании клеточных линий ММ. Механизм генетической нестабильности при ММ остается неясным. Полагают, что, подобно большинству солидных опухолей (Fukasawa, 2005) и некоторым лейкозам (Neben et al., 2004; Giehl et al., 2005), аномалии центросом играют заметную роль и в появлении анеуплоидных миеломных клеток (Chng, Fonseca, 2009).

Транслокации IgH, неправильная сегрегация хромосом в митозе и структурные перестройки хромосом формируют специфический для ММ хромосомный дисбаланс, который поддерживается и в клеточных линиях ММ (Inoue et al., 2004).

Так, по нашим данным, в клеточных линиях L363 и RPMI 8226 независимо от уровня пloidности наблюдается, с одной стороны, экстракопирование районов 1q и 7q, с другой — потеря 6q (L363) или материала хромосом 4, 8—10, 13 и 14 (RPMI 8226). Большое число структурных аномалий хромосом в клетках Karpas 707 и U-266 затрудняет оценку хромосомного дисбаланса. Однако сохранение определенного числа хромосом в кариотипах этих клеток на протяжении длительного культивирования позволяет предполагать, что и состав хромосомного материала не подвергался существенным изменениям, несмотря на структурные преобразования. Можно допустить, что в той и другой клеточной линии имеет место делеция 13q. В пользу поддержания хромосомного дисбаланса в клеточных линиях может свидетельствовать неслучайное вовлечение хромосом в численные неклональные перестройки — в кариотипах отсутствуют или имеют дополнительные копии хромосомы тех же пар, что и в кариотипах миеломных клеток *in vivo*.

Увеличение материала хромосом 1q, 7q, 8q, 11q, 15q и утрата хромосомы 13 или 13q и хромосомных районов 1p, 6q, 8p, 9p, 14q, 16q и 17r являются отличительной особенностью кариотипов как клеточных линий ММ (Inoue et al., 2004; Largo et al., 2006; Lombardi et al., 2007), так и опухолевых клеток ММ (Gutierrez et al., 2004). Однако по хромосомам X, 4, районам 9p, 10q (делеции), хромосоме 7 (7q), районам 8q, 17q, 18q и 19p (экстракопирование) хромосомный дисбаланс более выражен в клеточных линиях (Inoue et al., 2004; Largo et al., 2006; Lombardi et al., 2007).

Проведенный нами анализ структурных изменений хромосом в клеточных линиях L363, Karpas 707, RPMI

**Неслучайный характер вовлечения хромосом и хромосомных локусов  
в структурные перестройки в клеточных линиях L363, Kagras 707, RPMI 8226 и U-266**

Локусы хромосом, перестройки которых обнаружены в клеточных линиях ММ в настоящей работе	Локусы хромосом, перестройки которых выявлены в кариотипах больных ММ <sup>а</sup>	Локусы хромосом, в которых выявлен копийный дисбаланс у разных групп больных ММ	
		экстракопирование	делеции
1p36.3 <sup>б</sup> 1p32 <sup>б</sup> 1p22 <sup>б</sup>	1p36  1p22		1p36.32 (2) 1p32.3 (4) 1p21.1—p31.1(2) 1p21.2—p22.2 (3) 1p12—p21.1 (2)
1p13 <sup>в</sup> 1q12 <sup>г</sup> 1q21 <sup>д</sup>	1q12 1q21	1q (1,2,3) 1q21 (1) 1q21.1—q23.3 (4)	
1q25, <sup>г</sup> 1q31, <sup>е</sup> 1q32 <sup>г</sup> 2q37 <sup>е</sup> 3q13.2, <sup>е</sup> 3q21 <sup>г</sup> 3q26.1, <sup>е</sup> 3q26.2, <sup>б</sup> 3q26.3 <sup>б</sup> 4p16 <sup>б</sup> 4p15.2 <sup>б</sup> 4p14 <sup>б</sup> 4q21 <sup>б</sup>	1q31, 1q32 2q37	1q (1,2,3) 3q11—q22 (2) 3q26—qter (2)	4p16.3 (4), 4p16.2 (2) 4p15.1—p15.31 (2) 4p11—p14 (3) 4q13.2—q22.1 (3)
5p15.1, <sup>е</sup> 5p13, <sup>б</sup> 5p12, <sup>г</sup> 5p11, <sup>г</sup> 5q11.2, <sup>б</sup> 5q13 <sup>е</sup> 5q22, <sup>б</sup> 5q31 <sup>д</sup> 6p23 <sup>е</sup> 6p21.3 <sup>в</sup> 6q11, <sup>г</sup> 6q13, <sup>в</sup> 6q21 <sup>б</sup> 7q31, <sup>г</sup> 7q32 <sup>б</sup> 8p21 <sup>е</sup>	6q11, 6q13, 6q21  8p21	5p—q13.2 (2) 5q21.11—qter (2) 6p22.1—p25.2 (2) 6p21.31—p22.3 (4) 7q (2)	6q (3)  8p12—p22 (2) 8p12—p23.1 (4) 8p21.2—p23.2 (3) 8p11.22 (2)
8p11.2 <sup>б</sup> 9q34 <sup>б</sup>	9q34	9q34 (1) 9q34.2 (2)	
11q13 <sup>б</sup> 11q23 <sup>б</sup>	11q13 11q23	11q13.2—q13.4 (2) 11q23 (1) 11q23.2—qter (2)	
12p12 <sup>б</sup> 13q12 <sup>б</sup>	12p12 13q12		12p12.1 (2) 13q12.12 (2) 13q12.13—qter (3) 13q12—q21 (2) 13q14.3 (1)
13q14 <sup>г</sup>	13q14		13q14.11—q14.3 (4)
14q13 <sup>б</sup> 14q24 <sup>е</sup>			14q13.2—q21.3 (2) 14q24.2 (2) 14q24.1—q31.1 (4) 14q31.1—q31.2 (3) 14q32.32 (2)
14q31 <sup>б</sup> 14q32 <sup>г</sup> 15q22 <sup>в</sup>	14q32	15q22 (1)	
16p13.1 <sup>е</sup> 16q12.1 <sup>б</sup> 16q23 <sup>б</sup> 16q24 <sup>е</sup> 17p13 <sup>б</sup>	16q23 16q24 17p13		16p13.12 (2) 16q12.1 (3, 4) 16q23.1—qter (3) 16q24.2 (2) 17p13 (1) 17p13.2—p12 (2) 17p13.2—p13.1 (3)

Таблица 3 (продолжение)

Локусы хромосом, перестройки которых обнаружены в клеточных линиях ММ в настоящей работе	Локусы хромосом, перестройки которых выявлены в кариотипах больных ММ <sup>а</sup>	Локусы хромосом, в которых выявлен копияный дисбаланс у разных групп больных ММ	
		экстракопирование	делеции
17p11.2 <sup>б</sup>		17p11 (2)	
17q21 <sup>б</sup>		17q21.32 (2)	
17q25 <sup>в</sup>	17q25		
19q13.3 <sup>б</sup>	19q13	19q13 (1, 2)	
20q11.2 <sup>б</sup>		20q11.22 (2)	
21q21 <sup>б</sup>		21q21.1 (2)	
22q11.2 <sup>в</sup>	22q11		22q11 (1)
Xq21 <sup>б</sup> , Xq22 <sup>г</sup>		Xq21.33—q25 (2)	22q11.22 (2, 3)

<sup>а</sup> Локус обнаружен в перестройках хромосом у пяти и более больных (Mohamed et al., 2007). Локусы, которые вовлекались в клональные перестройки в клетках разных линий: <sup>б</sup>однократно, <sup>в</sup>неоднократно. Локусы, которые вовлекались в перестройки: клональные и неклональные (<sup>г</sup>) и только в неклональные (<sup>д</sup>) в клетках разных линий. <sup>е</sup>Локусы, которые однократно вовлекались в неклональные перестройки в клетках разных линий. В скобках указаны источники литературы: 1 — Cremer et al., 2005; 2 — Largo et al., 2007; 3 — Agnelli et al., 2009; 4 — Walker et al., 2010.

8226 и U-266 показал, что тип перестроек, а именно несбалансированные транслокации, характер вовлечения в них хромосом и хромосомных локусов хорошо соответствуют наблюдениям других авторов на опухолевых клетках и клеточных линиях ММ (Rao et al., 1998; Mohamed et al., 2007). Мы не обнаружили одинаковых для всех проанализированных клеточных линий транслокаций хромосом. Отсутствие повторяющихся транслокаций (кроме транслокаций IgH) отмечено в образцах костного мозга больных ММ и в клеточных линиях ММ (Rao et al., 1998), а также в опухолях и клеточных линиях толстой кишки (Knutsen et al., 2010) и легкого человека (Grigorova et al., 2005). Одинаковых структурных перестроек хромосом, за исключением опухолеспецифической транслокации t(8;14)(q24;q32), не выявлено и в клеточных линиях лимфомы Беркитта (Karpova et al., 2006). Возможно, неслучайные транслокации маскируются комплексными перестройками хромосом при прогрессии опухоли или специфическое изменение числа копий ДНК, а не определенные транслокации хромосом (Knutsen et al., 2010) играют роль в патогенезе разных типов неоплазий.

Сопоставление локусов, участвующих в структурных перестройках хромосом в клетках L363, Karpas 707, RPMI 8226 и U-266, с локусами, подвергающимися копияному дисбалансу в опухолевых клетках ММ (Cremer et al., 2005; Largo et al., 2007; Agnelli et al., 2009; Walker et al., 2010), обозначило определенные тенденции. Оказалось, что 57.4 % локусов, вовлеченных в структурные перестройки, располагаются или внутри более протяженных районов геномного дисбаланса или включают в себя сайты, подвергающиеся изменениям числа копий ДНК (табл. 3). Полагают, что локальный копияный дисбаланс является следствием структурных перестроек хромосом (Kolomietz et al., 2001). Например, изменения числа копий ДНК в локусах хромосом 4p16, 11q13, 16q23 и 20q11 связывают с транслокациями IgH (Walker et al., 2010). Дупликацию сегмента Xq21.33 в клетках L363 также рассматривают как результат транслокации с точкой разрыва в локусе Xq21 (Largo et al., 2007).

В геноме миеломных клеток аномалии числа копий ДНК наиболее многочисленны по сравнению с другими типами лейкозов и лимфом и в различной степени затра-

гивают все хромосомы (Agnelli et al., 2009; Walker et al., 2010). Анализ экспрессии генов, локализованных в сайтах копияного дисбаланса на разных хромосомах, показывает, что сочетанное действие дозы генов и их экспрессии определяет патогенетические пути развития ММ (Walker et al., 2006; Largo et al., 2007; Agnelli et al., 2009). Патогенез ММ связан с нарушениями регуляции клеточного цикла и апоптоза, NF-каппа В и Wnt-сигнальных путей, а также процессов, обеспечивающих модификацию гистонов (Walker et al., 2010).

Как показали результаты нашей работы и исследования других авторов (Rao et al., 1998), в клеточных линиях по сравнению с опухолевыми клетками больных увеличиваются число и сложность структурно перестроенных хромосом. Рееаранжировки хромосом при культивировании клеток могут приводить к усилению копияного дисбаланса (возможно, и опухолеспецифического) и изменению профиля экспрессии генов. Исследование большой группы (23) клеточных линий ММ свидетельствует о том, что эти клеточные линии проявляют несколько отличный от опухолевых образцов ММ паттерн транскрипции генов, связанных в основном с прогрессией клеточного цикла и пролиферацией (Lombardi et al., 2007). Кроме того, в клеточных линиях повышается частота встречаемости специфических для ММ геномных аномалий, отмечены «вторая» транслокация IgH, а также транслокации с участием локусов генов легких цепей Ig (Kuehl, Bergsagel, 2002). Перестройки хромосом, активирующие ген *MYC* и делеции *p53*, выявлены в 90 % клеточных линий (Kuehl, Bergsagel, 2002). Экспрессия генов *MMSET* и *MAF* показана в клеточных линиях, не имеющих соответствующих транслокаций IgH: t(4;14)(p16.3;q32) и t(14;16)(q32;q23) (Lombardi et al., 2007). Создается впечатление, что в условиях *in vitro* включается весь потенциал генетических изменений, свойственных ММ, что и способствует повышению скорости пролиферации миеломных клеток в культуре.

Однако принимая во внимание, что клеточные линии ММ получены из наиболее продвинутых и агрессивных опухолей, вопрос о том, возникают столь масштабные рееаранжировки генома в процессе культивирования клеток или длительное существование в культуре возможно

лишь для миеломных клеток с определенными генетическими характеристиками, остается открытым. Независимо от этого сравнительный анализ кариотипов опухолевых клеток и клеточных линий ММ свидетельствует об однонаправленном характере кариотипической изменчивости клеток ММ *in vivo* и *in vitro*.

Различные типы кариотипической структуры клеточных популяций, выявленные в настоящей работе, свойственны не только клеточным линиям ММ человека. Сосуществование в популяции клеток с основным и дополнительными СВК, представленными в разных соотношениях (Полянская, 2000), а также клеток с неклональными перестройками показано для клеточных линий различного опухолевого происхождения (Savelyeva, Matyeva, 1987, 1988). Остается, однако, неясным, является кариотипическая структура индивидуальной характеристикой клеточной популяции или определяется условиями культивирования.

Известно, что клональные перестройки хромосом обеспечивают пролиферативные преимущества опухолевых клеток *in vivo*, в то время как неклональные перестройки ответственны за их выживание. Динамические взаимоотношения между этими типами хромосомных аномалий определяют стабильность или нестабильность генома и играют ключевую роль в опухолевой прогрессии (Heng et al., 2006; Ye et al., 2007).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что характер и направленность кариотипической изменчивости длительно культивируемых клеточных линий ММ соответствуют динамике кариотипа миеломных клеток *in vivo*. Можно предположить, что тканеспецифические механизмы онкогенеза ММ ограничивают количественную и структурную кариотипическую изменчивость клеточных линий ММ. Вместе с тем нарастание и сложность структурных перестроек хромосом, углубление хромосомного дисбаланса могут приводить к изменению профиля экспрессии генов и биологических свойств миеломных клеток в культуре.

Авторы искренне признательны Б. Н. Кудряцеву (Институт цитологии РАН) за консультации, обсуждение результатов работы и ценные замечания.

#### Список литературы

- Мамаева С. Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. 38 (8) : 787—814.
- Мамаева С. Е., Литвинчук Л. Ф., Пинаев Г. П. 1983. Закономерности кариотипической изменчивости в перевиваемых клеточных линиях человека. ДАН СССР. 270 (2) : 456—458.
- Мамаева С. Е., Литвинчук Л. Ф., Пинаев Г. П. 1986. Характеристика кариотипа постоянных клеточных линий. II. Изменчивость и сбалансированность хромосомного набора клеток М-HeLa. Цитология. 28 (2) : 193—203.
- Полянская Г. Г. 2000. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных условиях. Успехи современной биологии. 120(6) : 529—539.
- Полянская Г. Г., Вахтин Ю. Б. 2003. Кариотипическая структура клеточных популяций *in vitro* как целостная система. Цитология. 45(2) : 115—131.
- Abdel-Rahman W. M., Katsura K., Rens W., Gorman P. A., Sheer D., Bicknell D., Bodmer W. F., Arends M. J., Wyllie A. H., Edwards P. A. 2001. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 2538—2543.

Agnelli L., Mosca L., Fabris S., Lionetti M., Andronache A., Kwee I., Todoerti K., Verdelli D., Battaglia C., Bertoni F., Deliliers G. L., Neri A. 2009. A SNP microarray and FISH-based procedure to detect allelic imbalances in multiple myeloma: an integrated genomics approach reveals a wide gene dosage effect. Genes Chromosomes Cancer. 48 : 603—614.

Bergsagel P. L., Kuehl W. M. 2001. Chromosome translocations in multiple myeloma. Oncogene. 20 : 5611—5622.

Bergsagel P. L., Kuehl W. M. 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J. Clin. Oncol. 23 : 6333—6338.

Chng W. J., Fonseca R. 2009. Centrosomes and myeloma; aneuploidy and proliferation. Environ. Mol. Mutagen. 50 : 697—707.

Chng W. J., Winkler J. M., Greipp P. R., Jalal S. M., Bergsagel P. L., Chesi M., Trendle M. C., Ahmann G. J., Henderson K., Blood E., Oken M. M., Hulbert A., Van Wier S. A., Santana-Dávila R., Kyle R. A., Gertz M. A., Lacy M. Q., Dispenzieri A., Fonseca R. 2006. Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression. Leuk. Res. 30 : 266—271.

Cremer F. W., Bila J., Buck I., Kartal M., Hose D., Itrich C., Benner A., Raab M. S., Theil A. C., Moos M., Goldschmidt H., Bartram C. R., Jauch A. 2005. Delineation of distinct subgroups of multiple myeloma and a model for clonal evolution based on interphase cytogenetics. Genes Chromosomes Cancer. 44 : 194—203.

Davidson J. M., Gorringe K. L., Chin S. F., Orsetti B., Besret C., Courtay-Cahen C., Roberts I., Theillet C., Caldas C., Edwards P. A. 2000. Molecular cytogenetic analysis of breast cancer cell lines. Br. J. Cancer. 83 : 1309—1317.

Diehl V., Schaadt M., Kirchner H., Hellriegel K. P., Gudat F., Fonatsch C., Laskewitz E., Guggenheim R. 1978. Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) *in vitro*: a comparative study. Blut. 36 : 331—338.

Fonseca R., Barlogie B., Bataille R., Bastard C., Bergsagel P. L., Chesi M., Davies F. E., Drach J., Greipp P. R., Kirsch I. R., Kuehl W. M., Hernandez J. M., Minvielle S., Pilarski L. M., Shaughnessy J. D., Jr., Stewart A. K., Avet-Loiseau H. 2004. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res. 64 : 1546—1558.

Fonseca R., Bergsagel P. L., Drach J., Shaughnessy J., Gutierrez N., Stewart A. K., Morgan G., Van Ness B., Chesi M., Minvielle S., Neri A., Barlogie B., Kuehl W. M., Liebisch P., Davies F., Chen-Kiang S., Durie B. G., Carrasco R., Sezer O., Reiman T., Pilarski L., Avet-Loiseau H., International Myeloma Working Group. 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. Leukemia. 23 : 2210—2221.

Fukasawa K. 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. Cancer Lett. 230 : 6—19.

Giehl M., Fabarius A., Frank O., Hochhaus A., Hafner M., Hehlmann R., Seifarth W. 2005. Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. Leukemia. 19 : 1192—1197.

Gisselsson D. 2011. Mechanisms of whole chromosome gains in tumors — many answers to a simple question. Cytogenet. Genome Res. 133 : 190—201.

Grigorova M., Lyman R. C., Caldas C., Edwards P. A. 2005. Chromosome abnormalities in 10 lung cancer cell lines of the NCI-H series analyzed with spectral karyotyping. Cancer Genet. Cytogenet. 162 : 1—9.

Gutiérrez N. C., García J. L., Hernández J. M., Lumbreras E., Castellanos M., Rasillo A., Mateo G., Hernández J. M., Pérez S., Orfao A., San Miguel J. F. 2004. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. Blood. 104 : 2661—2666.

Heim S., Mitelman F. 2009. Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. Wiley-Blackwell. 756 p.

Heng H. H., Liu G., Bremer S., Ye K. J., Stevens J., Ye C. J. 2006. Clonal and non-clonal chromosome aberrations and genome variation and aberration. Genome. 49 : 195—204.

- Inoue J., Otsuki T., Hirasawa A., Imoto I., Matsuo Y., Shimizu S., Taniwaki M., Inazawa J. 2004. Overexpression of PDZK1 within the 1q12—q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Amer. J. Pathol.* 165 : 71—81.
- Karpas A., Fischer P., Swirsky D. 1982. Human myeloma cell line carrying a Philadelphia chromosome. *Science.* 216 : 997—999.
- Karpova M. B., Schoumans J., Blennow E., Ernberg I., Henter J. I., Smirnov A. F., Nordenskjöld M., Fadeel B. 2006. Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines. *Int. J. Oncol.* 28 : 605—617.
- Keats J. J., Reiman T., Maxwell C. A., Taylor B. J., Lar-ratt L. M., Mant M. J., Belch A. R., Pilarski L. M. 2003. In multiple myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood.* 101 : 1520—1529.
- Knutsen T., Padilla-Nash H. M., Wangsa D., Barenboim-Stapleton L., Camps J., McNeil N., Diflippantonio M. J., Ried T. 2010. Definitive molecular cytogenetic characterization of 15 colorectal cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 49 (3) : 204—223.
- Kolomietz E., Al-Maghrabi J., Brennan S., Karaskova J., Minkin S., Lipton J., Squire J. A. 2001. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive sub-microscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood.* 97 : 3581—3588.
- Kuehl W. M., Bergsagel P. L. 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer.* 2 : 175—187.
- Largo C., Alvarez S., Saez B., Blesa D., Martin-Subero J. I., González-García I., Brieva J. A., Dopazo J., Siebert R., Calasanz M. J., Cigudosa J. C. 2006. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. *Haematologica.* 91 : 184—191.
- Largo C., Saez B., Alvarez S., Suela J., Ferreira B., Blesa D., Prosper F., Calasanz M. J., Cigudosa J. C. 2007. Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations. *Haematologica.* 92 : 795—802.
- Lombardi L., Poretti G., Mattioli M., Fabris S., Agnelli L., Biccato S., Kwee I., Rinaldi A., Ronchetti D., Verdelli D., Lambertenghi-Deliliers G., Bertoni F., Neri A. 2007. Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes Chromosomes Cancer.* 46 : 226—238.
- Matsuoka Y., Moore G. E., Yagi Y., Pressman D. 1967. Production of free light chain of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 : 1246—1250.
- Mohamed A. N., Bentley G., Bonnett M. L., Zonder J., Al-Katib A. 2007. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *Amer. J. Hematol.* 82 : 1080—1087.
- Moore G. E., Kitamura H. 1968. Cell line derived from patient with myeloma. *N. Y. State. J. Med.* 68 : 2054—2060.
- Muleris M., Salmon R. J., Dutrillaux B. 1988. Existence of two distinct processes of chromosomal evolution in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 32 : 43—50.
- Neben K., Tews B., Wrobel G., Hahn M., Kokocinski F., Giesecke C., Krause U., Ho A. D., Kramer A., Lichter P. 2004. Gene expression patterns in acute myeloid leukemia correlate with centrosome aberrations and numerical chromosome changes. *Oncogene.* 23 : 2379—2384.
- Nilsson K. 1971. Characteristics of established myeloma and lymphoblastoid cell lines derived from an E myeloma patient: a comparative study. *Int. J. Cancer.* 7 : 380—396.
- Nilsson K., Bennich H., Johansson S. G. O., Ponten J. 1970. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin. Exp. Immunol.* 7 : 477—489.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.
- Rao P. H., Cigudosa J. C., Ning Y., Calasanz M. J., Iida S., Tagawa S., Michaeli J., Klein B., Dalla-Favera R., Jhanwar S. C., Ried T., Chaganti R. S. 1998. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood.* 92 : 1743—1748.
- Savelyeva L., Mamaeva S. 1987. Heterogeneity and balance of chromosomes in human cell line M-HeLa-76 : analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 28 : 311—325.
- Savelyeva L., Mamaeva S. 1988. Population analysis of karyotypic heterogeneity of the Raji Burkitt lymphoma cell line. Analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 34 : 63—75.
- Sawyer J. R. 2011. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet.* 204 : 3—12.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J. (Eds.). 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger.
- Smadja N. V., Fruchart C., Isnard F., Louvet C., Dutel J. L., Cheron N., Grange M. J., Monconduit M., Bastard C. 1998. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia.* 12 : 960—969.
- Smadja N. V., Leroux D., Soulier J., Dumont S., Arnould C., Taviaux S., Taillemite J. L., Bastard C. 2003. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 38 : 234—239.
- Vätsveen T. K., Tian E., Kresse S. H., Meza-Zepeda L. A., Gabrea A., Glebov O., Dai H. Y., Sundan A., Kuehl W. M., Børset M. 2009. OH-2, a hyperdiploid myeloma cell line without an IGH translocation, has a complex translocation juxtaposing MYC near MAFB and the IGK locus. *Leuk. Res.* 33 : 1670—1677.
- Walker B. A., Leone P. E., Chiecchio L., Dickens N. J., Jenner M. W., Boyd K. D., Johnson D. C., Gonzalez D., Dagrada G. P., Protheroe R. K., Konn Z. J., Stockley D. M., Gregory W. M., Davies F. E., Ross F. M., Morgan G. J. 2010. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood.* 116 : e56—e65.
- Walker B. A., Leone P. E., Jenner M. W., Li C., Gonzalez D., Johnson D. C., Ross F. M., Davies F. E., Morgan G. J. 2006. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 108 : 1733—1743.
- Ye C. J., Liu G., Bremer S. W., Heng H. H. 2007. The dynamics of cancer chromosomes and genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 118 : 237—246.

## KARYOTYPIC VARIABILITY OF HUMAN MYELOMA CELL LINES

*V. I. Turilova,<sup>1</sup> T. D. Smirnova<sup>2</sup>*<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg;<sup>1</sup> e-mail: turilova@mail.cytspb.rssi.ru

Cytogenetic analysis of human myeloma cell lines L363, Karpas 707, RPMI 8226 and U-266 has been performed. Chromosome numbers retained near-diploid (L363, Karpas 707 and U-266) or increased to hypotriploid (RPMI 8226) during many years of maintenance of the cell lines *in vitro*. Based on G-banding analysis, the complex karyotypes with abnormalities of virtually all chromosome pairs were found in these cell lines but common chromosome translocations were not observed. In addition, chromosome loci involved in structural rearrangements in these cell lines often overlapped with loci of DNA copy number imbalances revealed in myeloma cells *in vivo*. Besides, distinct types of karyotypic structure of cell populations were found in all of these cell lines which differed by combination of cells with main and additional structural variants of karyotype and cells with non-clonal chromosome aberrations. Taken together, it seems obvious that karyotypic variability of human myeloma cell lines corresponds to karyotypic progression of myeloma *in vivo* and, hence, has tumor specific pattern.

Key words: human myeloma cell lines, karyotype, numerical and structural chromosome abnormalities, karyotypic heterogeneity.

---