

## ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ КАРИОТИПА КЛЕТОК КРЫСЫ В ПРОЦЕССЕ ИХ ТРАНСФОРМАЦИИ IN VITRO

© Н. М. Ярцева,<sup>1,\*</sup> Р. Ф. Федорцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Всероссийский центр экстренной  
и радиационной медицины им А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург;  
\* электронный адрес: Yartseva@mail.cytspb.rssi.ru

Опухолевая трансформация клеток характеризуется изменениями кариотипа, включающими в себя анеуплоидию, изменение ploidy клеток, а также множественные клональные нарушения числа и структуры хромосом. Хромосомные перестройки играют существенную роль в процессе иммортализации и трансформации клеток. Несмотря на многолетние исследования хромосомных перестроек, данных о первичных хромосомных перестройках на ранних стадиях трансформации все еще недостаточно. Мы исследовали нарушения кариотипа при спонтанной трансформации эмбриональных фибробластов крысы, а также при трансформации онкогенами на разных пассажах in vitro. Данные литературы и результаты нашего цитогенетического анализа клеточных линий крысы, полученных различными путями трансформации клеток разного гистогенеза in vitro, показали, что на ранних пассажах кариотип клеток может либо оставаться нормальным, либо приобретать клональные изменения хромосом различного характера. На поздних пассажах появляются новые перестройки с вовлечением других хромосом кариотипа. Несмотря на это, некоторые линии не приобретают опухолевого фенотипа и остаются иммортализованными. Обсуждается роль нестабильных хромосом и их локусов в трансформации клеток.

**Ключевые слова:** хромосомные перестройки, кариотип, клеточные линии, трансформация.

**Принятые сокращения:** АРМС — альвеолярная рабдомиосаркома, ИЭФ — иммортализованные эмбриональные фибробласты, МЧХ — модальное число хромосом, СПХ — структурные перестройки хромосом, ТК — трансформированные клетки, ТЭФЗ — трансформированные эмбриональные фибробласты, злокачественные, ХП — хромосомные перестройки, ЧПХ — численные перестройки хромосом, ЭФ — эмбриональные фибробласты, ЭФТИ — эмбриональные фибробласты трансгенные, иммортализованные, CGH — сравнительная геномная гибридизация, OSE — overial surface epithelial.

Опухолевая трансформация клеток — многостадийный процесс, который происходит вследствие нарушения генома клетки в результате генных мутаций, численных перестроек хромосом (ЧПХ) и структурных (СПХ), а также эпигеномных нарушений.

Исследования хромосомных перестроек (ХП) в опухолевых клетках человека и животных широко проводились во всем мире на протяжении целого ряда лет. Показано, что для опухолевых и трансформированных клеток характерны анеуплоидия, а также изменение уровня ploidy клеток, в то же время число хромосом может оставаться нормальным, а в кариотипе при этом наблюдаются СПХ. Наличие множественных клональных СПХ в кариотипе — характерная черта опухолевых клеток (Rowley, 1973, 1990; Levan, Mitelman, 1975; Nowell, 1976; Manolova et al., 1979; Sandberg, 1982; Mitelman, Levan, 1986; Heim, Mitelman, 1989, 2009; Mitelman, 2000).

Популяция опухолевых клеток гетерогенна и состоит из анеуплоидных клеточных клонов, различающихся по числу копий нормальных хромосом и составу множественных клональных СПХ. ХП включают в себя первичные изменения хромосом, которые появляются на ранних этапах трансформации клеток, а также вторичные хромосомные аномалии, которые отражают увеличение неста-

бильности генома клеток и опухолевую прогрессию (Nowell, 1976; Sandberg, 1982; Heim, Mitelman, 2009).

Важным достижением в исследовании ХП было выявление клональных опухолеспецифических СПХ, которые первоначально были обнаружены в кариотипах злокачественных гемопоэтических клеток миелоидного и лимфоидного происхождения в виде сбалансированных ХП — реципрокных транслокаций и инверсий. Эти перестройки в гемобластозах иногда могут быть единственными в кариотипе злокачественных клеток, например t(9;22) при хроническом миелоидном лейкозе (Rowley, 1973, 1990; Heim, Mitelman, 1989).

Ранее в клетках опухолей в качестве опухолеспецифических СПХ были выявлены делеции некоторых районов определенных хромосом, например del(13)(q14) при ретинобластоме, del(9)(p21) в карциномах, а также другие делеции. В дальнейшем транслокации и реже инверсии хромосом обнаружены в саркомах: в 80% случаев миксоидной липосаркомы присутствует транслокация t(12;16)(12q13;16p11), в инфантильной фибросаркоме — der(15)t(12;15)(12p13;15q25). Кроме того, транслокации хромосом выявлены в опухолях эпителиального происхождения, например в 60% случаев карциномы простаты наблюдается транслокация t(21;21)(q22.3;q22.2). В дру-

гих карциномах и саркомах также обнаружены хромосомные транслокации (Mandahl, Mertens, 2009; Teixeira, Heim, 2009).

В результате развития методов молекулярной генетики было показано, что в местах разрывов хромосом находятся гены, отвечающие за важные процессы в клетках: регуляцию пролиферации клеток — ростовые факторы, опухолевые супрессорные гены, онкогены, гены, отвечающие за дифференцировку клеток, регуляцию апоптоза, репарацию ДНК, гены цитоскелета и клеточной адгезии.

ХП, выявленные в местах разрывов хромосом, приводят к двум типам событий — активации или инактивации генов (Mitelman et al., 2007). В результате реципрокных транслокаций и инверсий образуются гибридные гены (fusion genes), например в гемопоэтических клетках: t(9;22) приводит к образованию гена *ABL/BCR* в клетках хронического миелоидного лейкоза, t(8;21) — гена *RUNX1/ETO(RUNX1T1)* в клетках острого миелоидного лейкоза, inv(7)(p15q34) — гена *TRB/HOXA* в клетках острого лимфобластного лейкоза и т. д. В опухолевых клетках также выявлены гибридные гены: *FUS/DDIT* — при миксоидной липосаркоме, *ETV6/NTRK3* — в клетках инфантильной фибросаркомы, *TMPRSS2/ERG* — в клетках карциномы простаты. При образовании гибридных генов происходит изменение функций генов-партнеров, что в результате приводит к нарушению регуляции их генов-мишеней (Peterson, Zhang, 2004; Mitelman et al., 2007; Johansson, Harrison, 2009; Chen et al., 2010; Edwards, 2010; Taylor et al., 2011).

Изменение регуляции генов при транслокациях также может происходить в результате их перемещения к сильным генным регуляторам. Например, активация гена *c-MYC* в клетках лимфомы Беркета с t(8;14)(q24;14q32) у человека — ген *c-MYC* с 8q24 перемещается к энхансеру гена тяжелых цепей иммуноглобулина E на 14q32, при этом ген *c-MYC* может быть перестроен (Manolova et al., 1979; Zhang et al., 1982; Klein, 1989).

В результате хромосомных делеций утрачиваются гены, локализованные в делетированных участках хромосом, например опухолевые супрессорные гены, такие как ген *RBI* в клетках ретинобластомы — del(13)(q14), ген *p21<sup>WAF1</sup>* в клетках карцином — del(9)(p21), ген *PTEN* — del(10)(q23—24) в клетках 35—60 % анапластических астроцитов. Кроме того, могут утрачиваться гены, ответственные за дифференцировку клеток — *GMCSF* (granulocyte macrophage colony stimulating factor) — del(5)(q?31), в клетках острого миелобластного лейкоза и др. (Rocco, Sindransky, 2001; Ohgaki, Kleihues, 2009; Olney, Le Beau, 2009; Яковлева и др., 2011). В результате делеции остается один аллель гена, экспрессии которого может быть недостаточно для осуществления его функции, или ген может быть мутантным, что приводит к неограниченной пролиферации клеток и их иммортализации.

Таким образом, опухолеспецифические ХП являются одной из причин трансформации клеток наряду с генными мутациями и эпигенетическими нарушениями.

Все опубликованные данные цитогенетических и молекулярно-генетических исследований клеток солидных опухолей и гемобластозов были собраны в Базе данных ХП в неоплазиях человека Фелексом Мителманом (Database of Chromosome Aberrations in Cancer, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), которая постоянно дополняется новыми данными (Mitelman et al., 2008). Большая часть цитогенетических анализов была выполнена для лейкозов и злокачественных лимфом — около 70 %,

для солидных опухолей — около 30 %. Меньше всего известно о ХП в клетках карцином, в основном приведены случаи на поздних стадиях развития — эффузии или метастазы, клетки которых имеют очень сложный кариотип с множественными ХП. Следовательно, первичные ХП в клетках солидных опухолей и особенно в карциномах изучены в меньшей степени по сравнению с гемобластомами. Выявление и исследование первичных ХП и их роли в трансформации клеток остаются актуальным направлением исследований.

Клеточные линии опухолевого происхождения человека и животных и линии, полученные в результате трансформации клеток *in vitro*, служат удобными моделями для всестороннего изучения механизмов онкогенеза и поиска новых и адекватных методов терапии злокачественных новообразований.

Настоящая работа представляет сравнительный анализ как данных литературы, так и данных собственного анализа хромосом и их локусов, преимущественно вовлекающихся в численные и структурные перестройки в клеточных линиях крысы, полученных в результате трансформации клеток клеточными и вирусными онкогенами и в результате спонтанной трансформации *in vitro* на ранних этапах и при ее прогрессии.

Представляется также важным сопоставить локусы хромосом, чаще других вовлекающиеся в перестройки в процессе трансформации клеток, с генами, которые содержат эти локусы согласно Базам данных по геному крысы RATMAP (<http://ratmap.org>) и RGD (<http://rgd.mcg.edu>). Такое сопоставление может способствовать выяснению роли ХП в трансформации клеток.

Исследованные клеточные линии были предоставлены авторами, получившими эти линии, или взяты из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН.

Препараты хромосом делали по методу Ярцевой с сотрудниками (2007) с некоторыми модификациями для каждой линии. Дифференциальное окрашивание хромосом на G-сегменты проводили, как описано ранее (Ozkinay, Mitelman, 1979). Идентификацию хромосом осуществляли согласно идиограммам хромосом крысы при уровне разрешения 300 дисков на гаплоидный набор хромосом (Satoh et al., 1989). Описание кариотипа крысы сделано согласно номенклатуре хромосом человека ISCN, 2009.

### Численные перестройки хромосом

Характерной чертой опухолевых и трансформированных клеток является анеуплоидия. Анализ данных литературы показал, что в клеточных линиях, полученных из клеток опухолей крысы различного гистогенеза, модальное число хромосом (МЧХ) остается преимущественно на околодиплоидном уровне (41—45). Только в некоторых случаях МЧХ становится гипо- или гипертетраплоидным, как это наблюдалось в глиоме, анапластической астроцитоме, гепатоклеточной и холангиоклеточной карциномах, хондросаркоме (Swarm chondrosarcoma), а также в клеточных линиях, полученных из этих клеток (Levan, Mitelman, 1975; Au et al., 1977; Gil-Benso et al., 2001; Мамаева, 2002; Stevens et al., 2005, и др.). В то же время клетки некоторых гепатом имеют тетра- или октаплоидное МЧХ, что не является типичным исключительно для клеток гепатом (Holocek et al., 1989; Herens et al., 1992). Увеличение уровня ploидности характерно и для нор-

мальных гепатоцитов. Так, у крысы больше половины клеток печени имеют ploidy 4c (Безбородкина и др., 2008).

В опухолевых и трансформированных клетках человека и животных часто встречается увеличение числа копий нормальных хромосом по отношению к ploidy клеток. Так, трисомии хромосом 1—4, 6, 7, 11 и 14 наблюдались в ряде клеточных линий крысы, полученных из опухолевых клеток различного гистогенеза. Копирование хромосом 1 и 6 характерно для опухолевых клеток спонтанных мезотелиомы *in vivo* и *in vitro* и аденокарциномы эндометрия матки соответственно, кроме того, хромосома 6 копируется в клетках рака легкого, индуцированного радоном (Funaki et al., 1991; Dano et al., 2000; Namta et al., 2005).

Важно отметить, что кроме копирования хромосом наблюдались моносомии по отношению к ploidy клеток хромосом 1, 5, 9, 10, 13—15 и 17. Чаще других утрачивались хромосомы 13, 15 и 17: хромосома 13 в клетках глиомы и шваномы, глиомных клетках линии 35-2, в клетках эритролейкемии и эритробластной лейкемии, а также хондросаркомы. Моносомия целой хромосомы 15 выявлена в опухолевых клетках карциномы молочной железы, шваномы, глиомы, анапластической астроцитомы и хондросаркомы (Swarm chondrosarcoma), а также в опухолевых клетках спонтанной иммуноцитомы и в клетках саркомы Рауса (Levan, Mitelman, 1975; Au et al., 1977; Wiener et al., 1982; Lee et al., 1986; Ichikawa et al., 1990; Stevens et al., 2005). Важно отметить моносомию целой хромосомы 15 в наших клетках LRec-1sf и отсутствие длинного плеча хромосомы 15 в клетках линии LRec-1sf, а также в других клеточных линиях (рис. 1, 5) (Арцыбашева, 1989; Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 2007).

Моносомии хромосомы 17 выявлены в линиях, полученных из опухолевых клеток эритролейкемии, дифференцированной аденокарциномы молочной железы, хондросаркомы, глиомы и феохромоцитомы (линия PC-12) (Федорцева и др., 1983; Мамаева, 2002).

Потери хромосомы 1 обнаружены в клетках гепатом и трансформированных клетках печени (Herens et al., 1992). В клетках опухолевой линии PC-12 (из клеток феохромоцитомы) выявлена моносомия хромосомы 5. Утрата хромосомы 9 наблюдалась в клетках глиомы и хондросаркомы, хромосомы 10 — в клетках гепатомы и хондросаркомы, хромосомы 14 — в клетках эритролейкемии и шваномы (Au et al., 1977; Maeda et al., 1980; Chen et al., 1987; Ichikawa et al., 1990; Herens et al., 1992; Мамаева, 2002; Stevens et al., 2005).

Моносомии некоторых аутосом также встречаются в опухолях и клеточных линиях человека. Чаще других выявляется моносомия хромосомы 13 в клетках трансформированной эндотелиальной линии человека ECV-304 и в клетках опухолей эпителиального происхождения — меланом, карциномах легкого, яичника, почек и других опухолей, а также в клеточных линиях, полученных из этих опухолей. В клетках карцином наблюдались моносомии и других хромосом — 18, 21 и 22 (Мамаева, 1998, 2002; Roschke et al., 2003; Ярцева, Федорцева, 2008). Эти данные свидетельствуют о том, что потери определенных аутосом являются важным изменением кариотипа опухолевых клеток, приводящим к уменьшению дозы генов, поддерживающих нормальный статус клеток.

В исследованных нами клеточных линиях, полученных в результате трансформации ЭФ клеточными или ви-

русными онкогенами или в результате их спонтанной трансформации *in vitro*, в большинстве случаев МЧХ было 42 (табл. 1). В четырех линиях, полученных путем трансфекции ЭФ клеточными и вирусными онкогенами на ранних пассажах культивирования (10—19-й), клетки имели нормальный кариотип. В других линиях кариотип был псевдодиплоидным с МЧХ 42, но содержал СПХ. Так, в линии K51-2 выявлены три СПХ и трисомия хромосомы 9 за счет появления ее изохромосомы. В четырех клеточных линиях МЧХ на ранних пассажах было гиподиплоидным (41—44). Так, в клетках линии Ref 58 # 1 Fo 8 были выявлены трисомии хромосом 6 и 8, а в линиях tr B4 и tr C2 — трисомия хромосомы 12 (Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 1996; Yartseva et al., 1997).

В клетках линий K51-2, K51-4 и K51-5 МЧХ изменилось от нормального диплоидного в линии K51-5 и псевдодиплоидного в линиях K51-2 и K51-4 до гипотетраплоидного к 100-му пассажу культивирования во всех трех линиях. В линиях K51-4 и K51-5 появилась трисомия хромосомы 6 на 55-м и 57-м пассажах соответственно. Трисомия хромосомы 6 была выявлена также в кариотипе линии Mos+Neo 1, а трисомии хромосом 6 и 9 — в линии Mos + Neo 6 (рис. 1, 3). Дополнительные копии хромосом в этих линиях вовлекаются в структурные перестройки с другими хромосомами кариотипа (Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 1996).

Таким образом, в клетках всех линий, полученных из фибробластов от трансгенных эмбрионов крыс по генам *K-51* и *Mos + Neo*, на поздних пассажах выявлена трисомия хромосомы 6, как и в клетках линии Ref 58 # 1 Fo 8, что, вероятно, является случайным событием в этих клетках.

В линиях LRec, полученных в результате спонтанной трансформации ЭФ крысы при их быстром старении (3—8-й пассажи), на ранних пассажах культивирования (4—15-й пассажи) клетки линий были либо псевдодиплоидными (LRec-1—LRec-3 и LRec-6), либо гипотетраплоидными (LRec-4, LRec-5 и LRec-7) (табл. 1) (Арцыбашева, 1989; Ярцева и др., 1994).

Клетки линий LRec-1 и LRec-3 анализировали в процессе культивирования — линию LRec-1 исследовали несколько раз с 12-го по 70-й пассаж: на 70-м пассаже гетерогенность клеточной популяции этой линии увеличилась, появилась субпопуляция клеток с числом хромосом 41 и отдельными неклональными СПХ. Кариотип линии LRec-3 исследовали на пассажах 15 и 47, который все время оставался псевдодиплоидным (Ярцева и др., 2007).

Кроме того, исследовали кариотип клеток линии LRec-1sf, полученной культивированием клеток LRec-1 в среде без сыворотки: МЧХ клеток стало гипердиплоидным (43). Также исследовали клетки опухоли LRec-1sf, полученные из клеток линии LRec-1sf (табл. 1): число хромосом опухолевых клеток стало гипертриплоидным и не было выявлено четко выраженного модального класса по числу хромосом (Арцыбашева, 1989).

Клетки двух других линий, полученных в результате спонтанной трансформации ЭФ при длительном культивировании (для линии K-22 — более 100 пассажей), были гипердиплоидными (линия Fwa 3) или гипертриплоидными (линия K-22). Эти две линии исследованы только на поздних пассажах культивирования, в отличие от линий LRec (Глазко и др., 1989).

В клетках всех линий LRec на ранних пассажах наблюдались трисомия хромосомы 7 в псевдодиплоидных

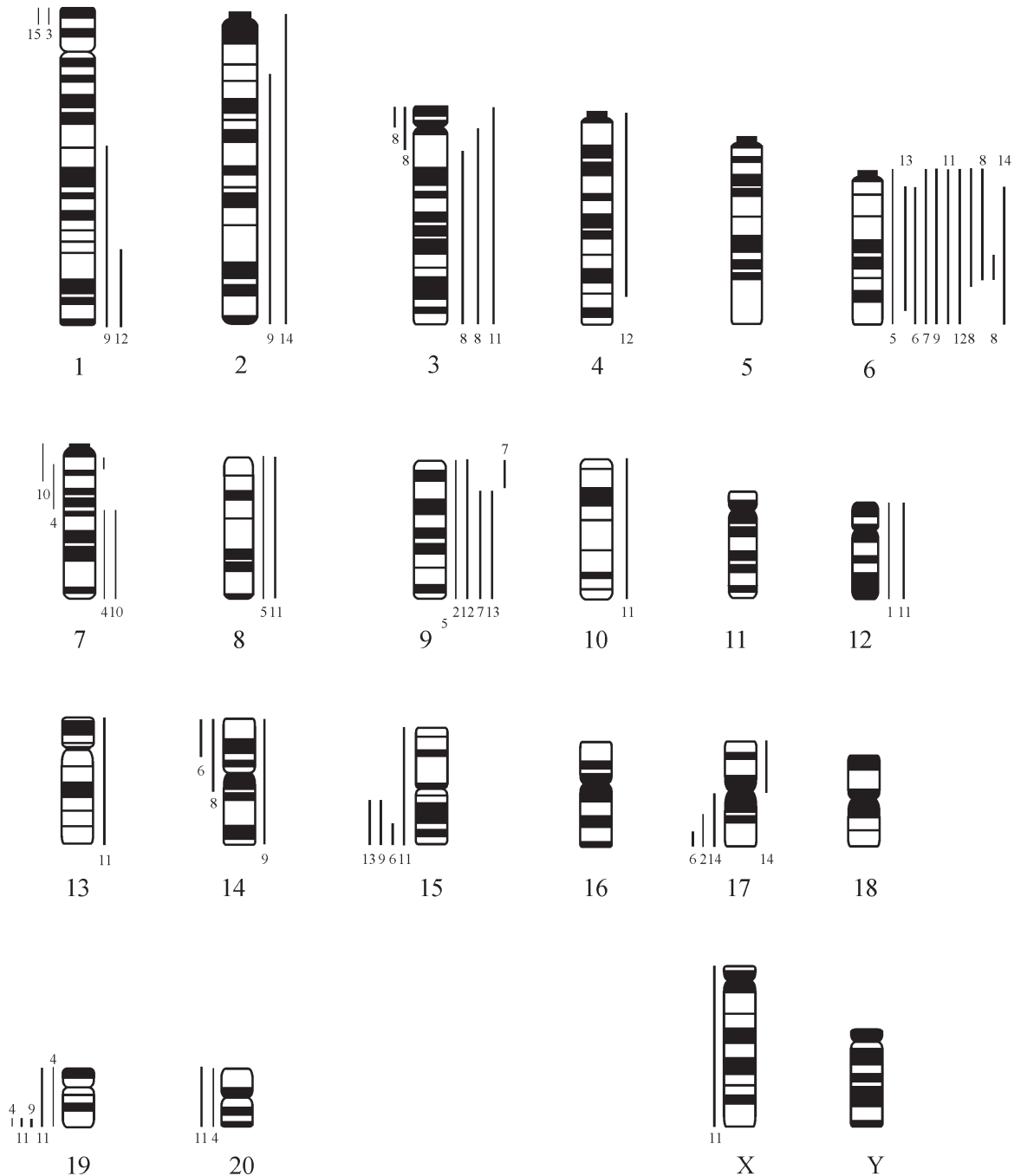


Рис. 1. Копирование и потери целых хромосом или их частей в кариотипах клеточных линий, полученных при трансформации ЭФ *in vitro* на ранних и средних пассажах.

*Черта справа* от идиограммы хромосомы обозначает копирование хромосомы или ее части, *черта слева* — утрату хромосомы. *Тонкая черта* — копирование хромосом на ранних пассажах, *жирная черта* — на средних пассажах. *Цифры под чертой и над чертой* — клеточные линии: 1 — tr B4 и tr C2, 2 — K51-2, 3 — K51-4 (пассаж 10), 4 — LRec-1—LRec-6, 5 — REF58#1 Fo 8, 6 — Mos+Neo 6, 7 — K51-4 (пассажи 55 и 100); 8 — K51-5 (пассажи 57 и 100), 9 — LRec-1sf (пассажи 15 и 62), 10 — LRec-7 (пассаж 8), 11 — LRec-1sft, 12 — Fwa 3; 13 — Mos+Neo 1, 14 — K-22, 15 — REF58#1 2-224.

линиях и увеличение числа ее копий до 5 или 6 в гипотетраплоидных линиях. Важно отметить, что в кариотипах клеток LRec было только один или два (в зависимости от уровня пloidности клеток) нормальных гомолога хромосомы 7, тогда как другие ее гомологи подвергались структурным перестройкам (рис. 4, 5) (Ярцева и др., 1994). В клетках линии LRec-1sf после приобретения способности расти в среде без сыворотки сохранилась трисомия хромосомы 7 наряду с появлением трисомии хромо-

сомы 6 на пассаже 15 и хромосомы 14 — на пассаже 62 (рис. 1). В опухолевых клетках LRec-1sft число копий нормальных хромосом варьировало от 1 (хромосома 15) до 5 (хромосома 6), а хромосомы 17 и 20 выявлены всего в 2 копиях относительно триплоидного кариотипа. В то же время не было обнаружено ни одной нормальной копии хромосомы 19, так как все ее гомологи были вовлечены в структурные перестройки (рис. 1, 5) (Арцыбашева, 1989).

Исследованные цитогенетически клеточные линии, полученные при трансформации клеток *in vitro*

Название линии (пассажи), тип клеток	Чем индуцирована трансформация	МЧХ (количество клональных ЧПХ/СПХ)	Откуда и кем получена линия
Mos 3 (29), ЭФТИ	Геном <i>Mos</i> , инъецирован в зиготу	42 (без перестроек)	Предоставлена Н. А. Пуговкиной, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
Mos 6 (14), ЭФТИ	То же	42 (без перестроек)	Предоставлена Н. А. Пуговкиной
Mos+Neo 1 (25), ЭФТИ	Генами <i>Mos + Neo</i> , инъецирован в зиготу	42 (3/2)	
Mos+Neo 6 (45), ЭФТИ	То же	42 (2/3)	» »
K51-2 (13), ЭФТИ	Геном K-51, из семейства генов <i>Mos</i> , описан Бердичевским (Berdichevskii, 1986), инъецирован в зиготу	42 (1/3)	» »
K51-4 (10), ЭФТИ	Геном K-51, инъецирован в зиготу	42 (—/2)	» »
K51-5 (14), ЭФТИ	То же	42 (без перестроек)	» »
REF58#1 Cl 4/2 (19), ИЭФ	Генами <i>Myc + Ras</i>	То же	Предоставлена М. Vogt, Саковский институт, Сан-Диего, США
REF58#1 Fo 8 (19), ИЭФ	То же	44 (2/—)	То же
REF58#1 Fo 2-224 (9), ИЭФ	» »	42 (—/1)	» »
Xi59#1 Cl 1 (23) Иммуортализованные эмбриональные хондробласты	» »	42 (без перестроек)	» »
IE5 Клон иммортализованной линии REF-LT, ЭФ крыс Фишер	Геном LT-антигена вируса полиомы	42 (—/1)	Предоставлена Е. А. Камиссаровой, Институт Канцерогенеза РАМН, Москва
tr F8 Трансформированные клетки (ТК) IE5, злокачественные	Геном <i>E7</i> вируса папилломы, тип 16 (HPV 16)	42 (—/1)	Предоставлена В. А. Журбицкой, Институт канцерогенеза РАМН, Москва
tr A4E5 ТК IE5, злокачественные	Генами <i>E6 + E7</i> (HPV 16) и (HPV 18) соответственно	42 (—/2)	Предоставлена Е. А. Камиссаровой
tr C2 ТК IE5	Геном <i>E7</i> (HPV 16)	43 (1/1)	То же
Не исследовано			
tr B4 ТК IE5	То же	43 (1/1)	» »
Не исследовано			
LRec-1 (12), LRec-2 (14), LRec-3 (15), LRec-4 (10), ТЭФЗ	Спонтанная трансформация	42 (1/1), 42 (—/2), 42 (—/2), 75 (?/3)	Предоставлены И. В. Арцыбашевой, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
LRec-6, (6) ТЭФ	То же	42 (—/2)	Предоставлены И. В. Арцыбашевой
LRec-7 (8) ТЭФ (крысы породы Wistar) ТЭФЗ	» »	75 (?/6—8)	То же
LRec-1sf (14) Клетки линии LRec-1 пассажа 15, растущие в среде без сыворотки, злокачественные	» »	43 (1/6)	» »
LRec-1sft Клетки опухоли, полученной из клеток LRec-1sf, анализ после 2—3 пассажей <i>in vitro</i>	» »	66, 67, 68 (9/7)	» »
K-22 (134) ТЭФЗ	» »	?73 (?/2—6)	Коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
Fwa 3 ТЭФЗ	» »	45 (2/1)	Предоставлена Т. Т. Глазко, Аграрный университет МСХА, Москва

В линии LRec-4 наблюдалось уменьшение до 3 копий нормальных хромосом 1, 2, 11, 17, 18 и до 2 копий хромосом 19 и 20 по отношению к тетраплоидному набору хромосом в этих клетках (рис. 1) (Арцыбашева, 1989).

Анализ клеточных линий K-22 и Fwa 3 показал в клетках линии Fwa 3 трисомии хромосом 6 и 9. Линия K-22 гетерогенна — число гомологов нормальных хромосом и ко-

личество структурно перестроенных хромосом варьирует в разных клетках. Во всех исследованных клетках выявили дополнительную копию хромосомы 2, которая в некоторых клетках вовлекается в структурные перестройки с другими хромосомами, и 1 или 2 дополнительные копии хромосомы 6, участвующие в транслокации t(6;17) во всех исследованных клетках (Глазко и др., 1989).

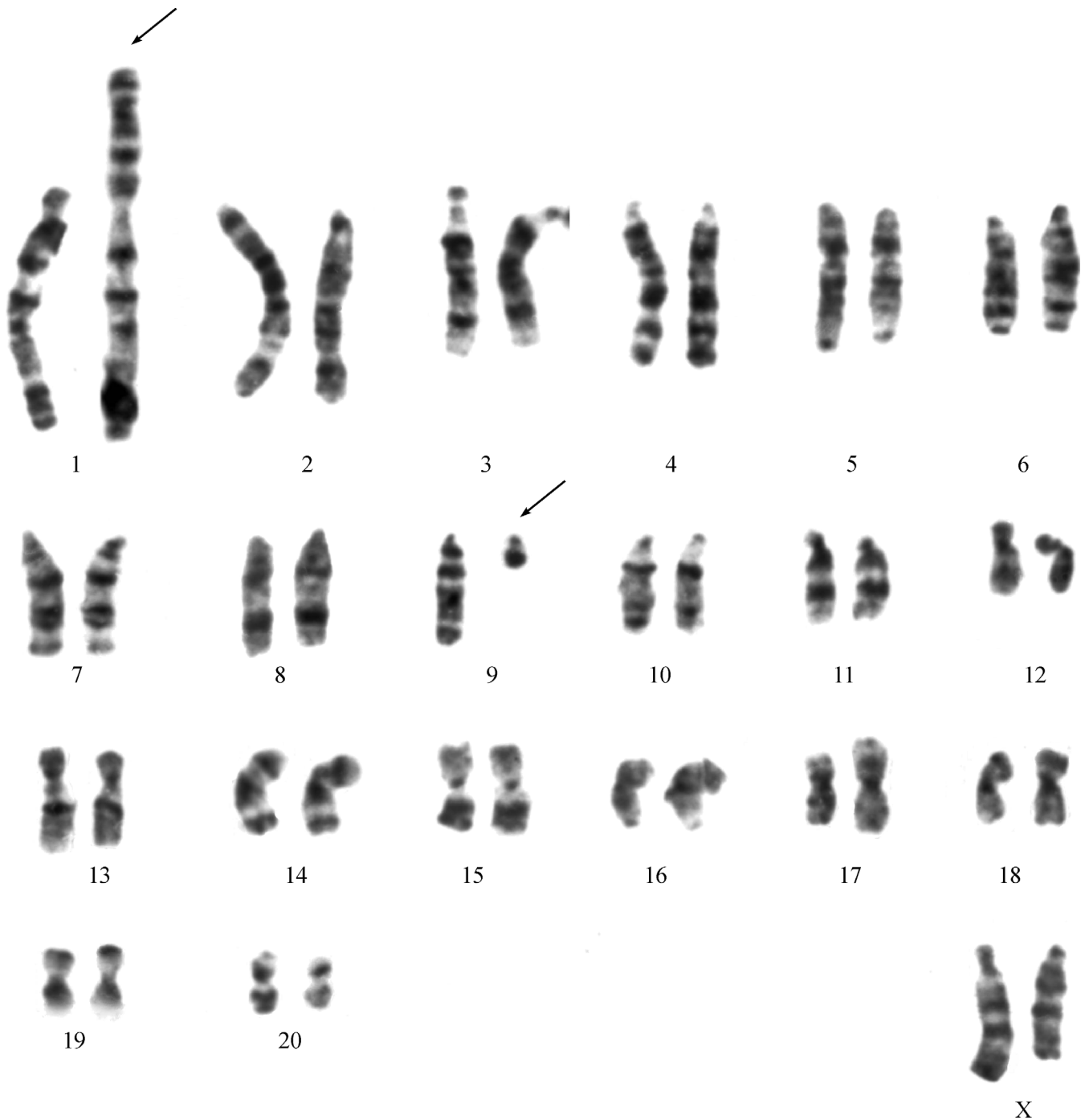


Рис. 2. Модальный кариотип клеток линии K51-4 на 10-м пассаже — 42,XX,der(1)t(1;9)(9qter → 9q13::1p12 → 1qter), del(9)(cen → 9q13:).

Стрелка — структурно перестроенные хромосомы. Описание кариотипа приводится согласно номенклатуре хромосом человека ISCN, 2009. Описание идентифицированных ХП приводится согласно идиограммам хромосом крысы на 300 дисков (Satoh, 1989).

Таким образом, в клетках спонтанно трансформированных клеточных линий, как и в других наших линиях, выявлено копирование определенных нормальных аутосом: хромосомы 6 на средних пассажах и хромосомы 7 на ранних пассажах. Копирование хромосомы 7 и вовлечение ее в t(7;19) в клетках LRec являются специфическими изменениями кариотипа ЭФ для этих линий и, по-видимому, способствуют их иммортализации при быстром старении *in vitro*.

Утрата целых аутосом по отношению к пloidности клеток обнаружена только в линии LRec-4 и в клетках

LRec-1sft. Следует подчеркнуть, что выявлены моносомии по длинному плечу хромосомы 15 в клетках LRec-1sft и по длинному плечу хромосомы 17 в линиях K51-2 и K-22 (рис. 1, 5). Моносомии хромосомы 15 и ее длинного плеча, а также длинного плеча хромосомы 17, вероятно, играют важную роль в трансформации клеток и ее прогрессии.

Немногочисленные данные литературы по цитогенетике спонтанно трансформированных клеточных линий крысы касаются в основном линий, полученных при длительном культивировании как ЭФ, так и клеток другого гистогенеза. МЧХ в клетках фибробластоподобных ли-

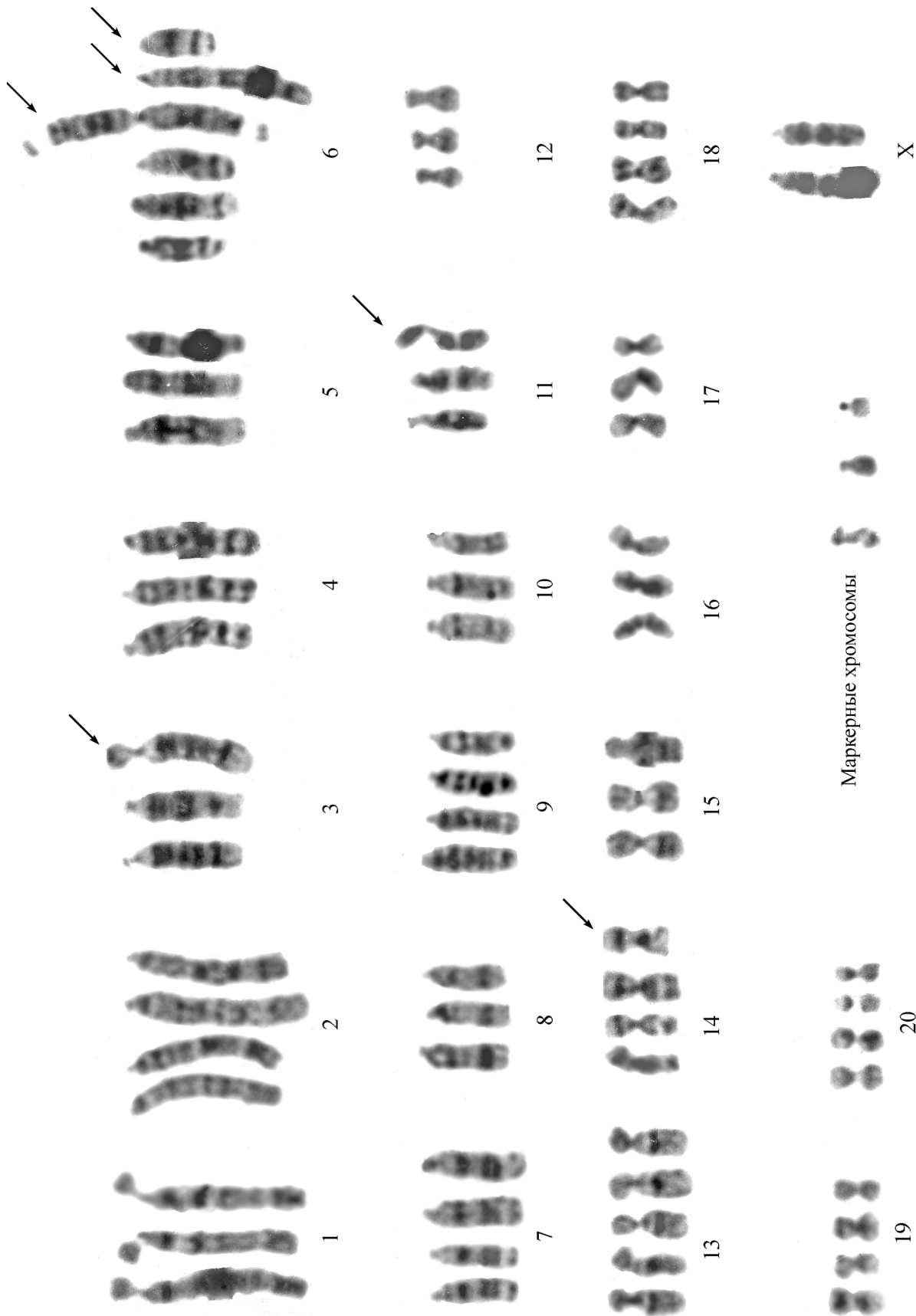


Рис. 3. Гипотетраплоидный кариотип клетки линии K51-5 на 57-м пассаже 77,-X,-X,XX,-1,-3,der(3)t(3;18)(18pter → 18p11~12::3p11 → 3pter)<sup>a</sup>, -4,-5,der(6)t(6;6)(?::6q32 → 6q14::6cen → 6q32::?)<sup>a</sup>,der(6)(3;6)(6cen → 6q24.73::3q12 → 3qter)<sup>a</sup>, del(6)(q14-q22),-8,-10,-11,add(11)(1p?11::?)<sup>a</sup>, -12,+13,der(14)(14pter → 14q11.2::?), -15,-16,-17,+3mar.

<sup>a</sup> Перестроенные хромосомы, которые наблюдаются не во всех клетках популяции.

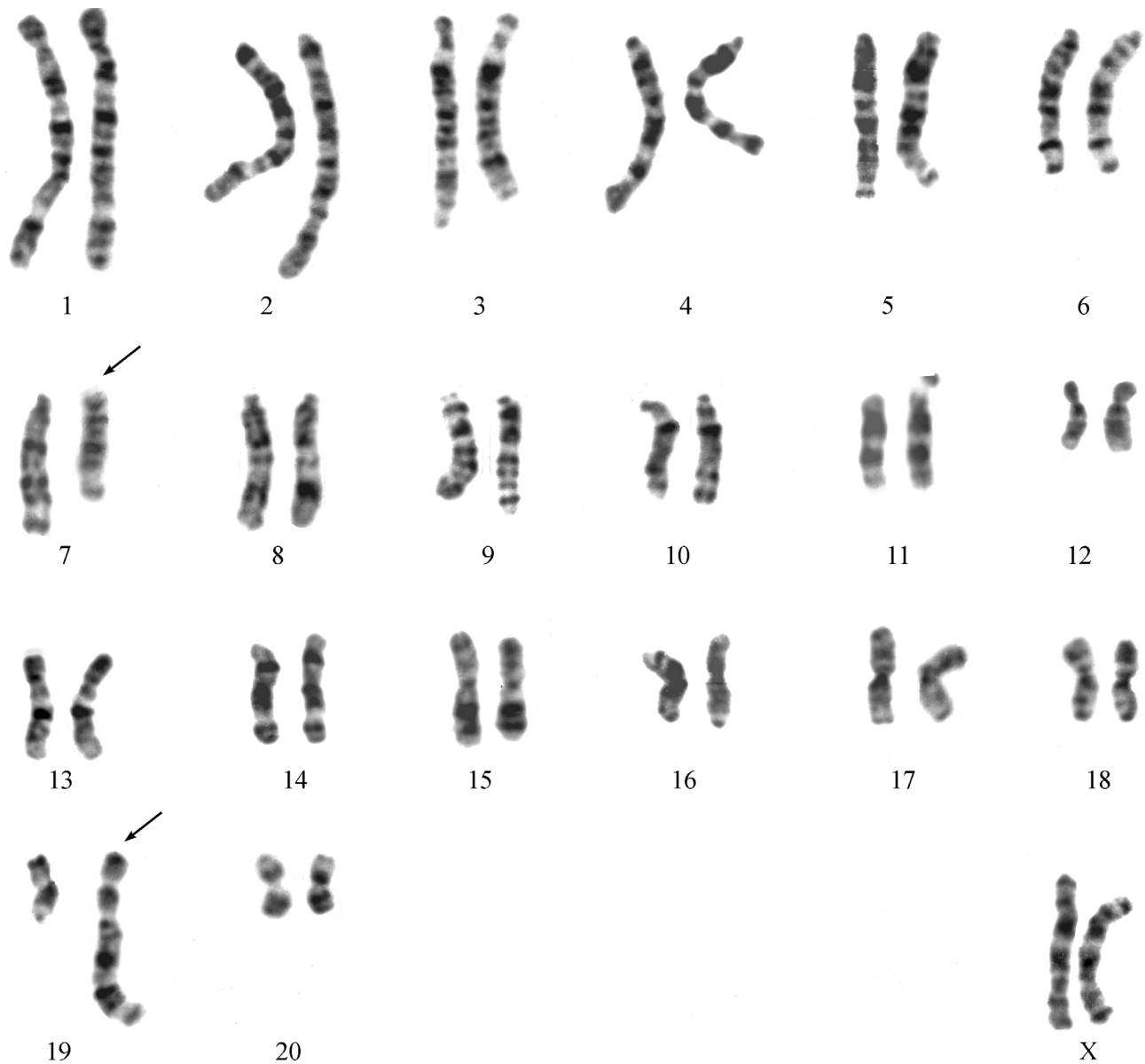


Рис. 4. Модальный кариотип клеток линии LRec-1 на 15-м пассаже — 42,XX,del(7)(cen → q11.2::q22.1 → qter),der(19)t(7:19)(19pter → 19q12::7q11.1 → 7qter).

Стрелка — структурно перестроенные хромосомы.

ний (Rat-2 — фибробласты, Hmf — миофибробласты, МСК — мезенхимные стволовые клетки) остается также на диплоидном уровне (39—45) как на ранних пассажах, так и на поздних. В упомянутых клеточных линиях наблюдается, как и в наших линиях, копирование хромосом 3, 6 и 7, но в то же время число копий хромосомы 9 не изменяется. Ранние пассажи (4—8-й) были исследованы только в линиях из МСК, полученных из костного мозга (Foudah et al., 2009). В этих клетках копируются только хромосомы 3 и 6 в отличие от наших линий на пассаже 8, кроме того, увеличивается число копий хромосомы 13 во всех линиях МСК.

В линиях Hmf и Rat-2 копируются кроме хромосомы 7 и другие хромосомы кариотипа — 4, 11, 19 и 20 в линии Hmf, в клетках Rat-2 — только хромосома 11 (Brett et al., 1986; Krishnaveni, Ghosh, 1996).

Сохранение диплоидного уровня кариотипа выявлено также в линиях TF1—TF4, полученных в результате

трансформации ЭФ онкогеном *EJH-ras* в различном сочетании с вирусными онкогенами (*E1B Ad5*, *E1B Ad12* и *E7 HPV16*), а также только онкогеном *E7 HPV16* (Kato et al., 1992). В то же время линии A14 и B25, полученные при трансформации ЭФ геном *EJH-ras*, различались по числу хромосом. Так, линия B25 была полиплоидной, а линия A14 — диплоидной, в ней также было выявлено копирование хромосомы 6 (Zhou et al., 1997).

Преобладание диплоидного уровня числа хромосом наблюдалась и в клеточных линиях, полученных при спонтанной трансформации клеток другого гистогенеза. Так, в двух клонах, полученных из поверхностного эпителия яичника (OSE), на ранних пассажах клетки были с числом хромосом, близким к диплоидному, и только в одном клоне выявили популяции диплоидных и тетраплоидных клеток. На поздних пассажах клетки этих клонов, кроме одного, также сохраняли диплоидность.



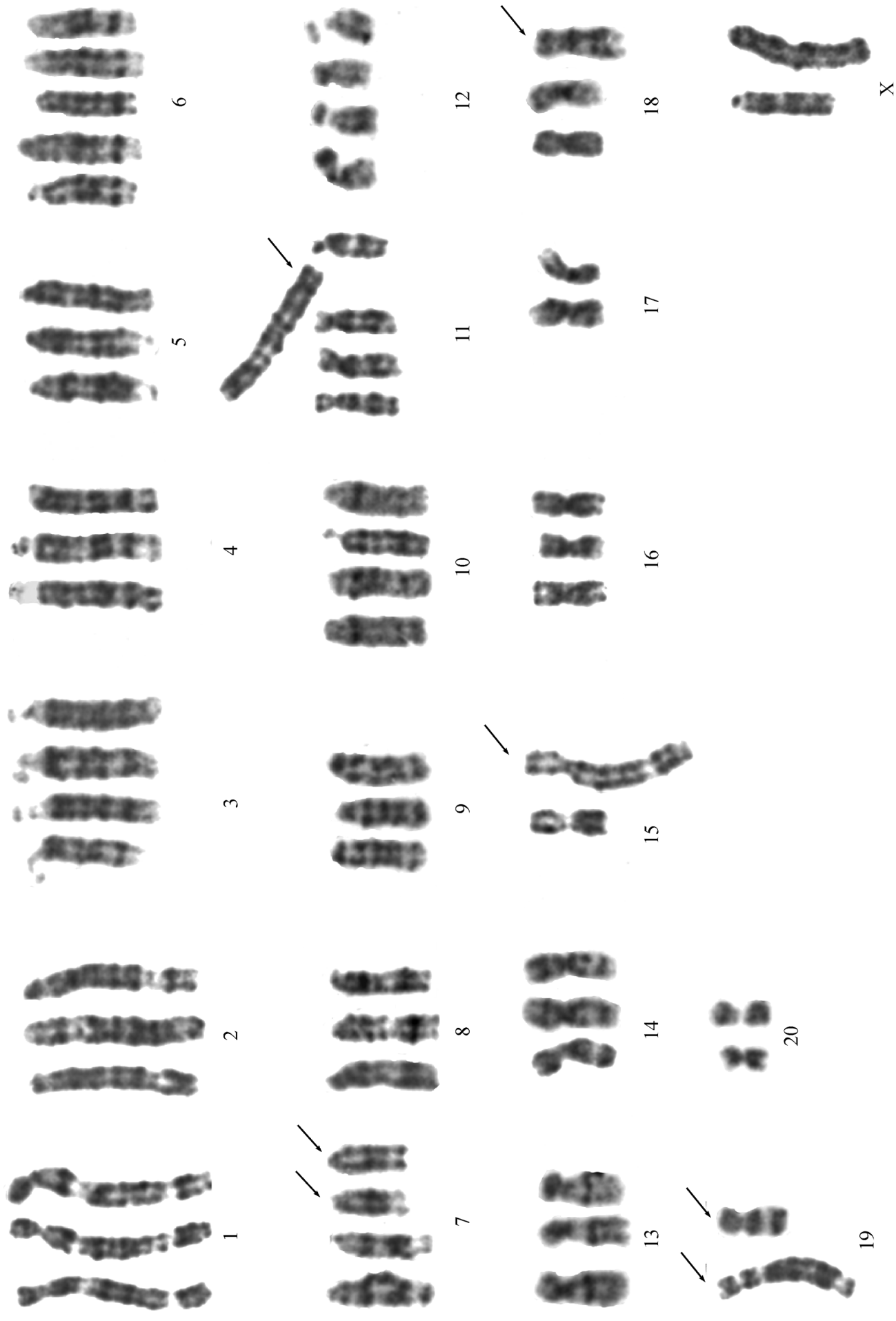


Рис. 5. Кариотип клетки популяции опухолевых клеток LRec-1stf на 3-м пассаже in vitro 65,XX,-X,-X,+3,+6,+6, del(7)(cen → q11.2::q22.1 → qter),+10,+der(11), der(11)t(2:11) (2qter → 2q14::1p12 → 11qter),+12,-15,der(15)t(1:15),-17, add(18)(18pter → 18q12.3::?),-19,der(19)(19pter → 19q12::7q11.1 → 7qter),add(19)(q12.3),-20.

Стрелка — структурно перестроенные хромосомы.

Диплоидное МЧХ сохранялось в четырех линиях NMR, полученных при спонтанной трансформации мезотелиальных клеток париетальной плевры на ранних пассажах культивирования (8-м и 10-м). В двух линиях на средних пассажах (31-м и 34-м) преобладали гипердиплоидные клетки, но появились полиплоидные популяции. В этих линиях, а также в клетках мезотелиомы и клеточной линии MET, полученной из опухолевых клеток, на средних (20—34-м пассажах) культивирования выявлена трисомия хромосомы 1. Эта структурная перестройка, вероятно, является специфической для клеток мезотелиомы (Funaki et al., 1991).

В клетках OSE также на ранних пассажах культивирования наблюдалось копирование хромосомы 11.

Моносомии хромосом выявлены в клоне линии TF4 (хромосома 12) и в MCK (хромосома 20, но только на ранних пассажах). Важно подчеркнуть, что, как и в наших линиях на поздних пассажах культивирования, в линиях трансформированных миофибробластов Hmf-e и в клеточных клонированных OSE клеток обнаружена моносомия хромосомы 15. Кроме того, в клетках OSE выявляют моносомию хромосомы 5 или чаще интерстициальную делецию в этой хромосоме (Brett et al., 1986; Godwin et al., 1992).

Сопоставление собственных результатов с данными литературы показало, что при трансформации клеток крысы различного тканевого происхождения независимо от способа трансформации *in vitro* на ранних пассажах в большинстве случаев сохраняется диплоидное или близкое к диплоидному число хромосом. На поздних пассажах культивирования в некоторых случаях число хромосом становится полиплоидным (Funaki et al., 1991; Ярцева и др., 1996).

Вышеизложенные данные показывают, что характерной чертой изменения кариотипа опухолевых и трансформированных клеточных линий крысы является увеличение числа копий нормальных хромосом. В некоторых случаях это увеличение является опухолеспецифическим, как, по-видимому, трисомия хромосомы 1 для клеток спонтанной мезотелиомы. Результаты наших исследований показывают, что для трансформированных клеточных линий, полученных из фибробластов различными путями, на ранней стадии трансформации, по-видимому, характерно копирование целых хромосом 7 и 9 или их сегментов, что, возможно, способствует иммортализации ЭФ. Копирование хромосомы 6 или ее сегментов происходит на более поздних стадиях трансформации и, вероятно, имеет значение для ее прогрессии.

Потеря отдельных хромосом также является важной и характерной чертой изменения кариотипа опухолевых и трансформированных клеток. Моносомия хромосом 15 и 17 или их длинных плеч выявляется в кариотипах клеток различного тканевого происхождения и независимо от пути трансформации. Утрата этих хромосом, по-видимому, является значительным изменением кариотипа клеток крысы в процессе трансформации и прогрессии.

### Структурные перестройки хромосом

Характерной чертой изменения кариотипа опухолевых и трансформированных клеток являются также клональные СПХ, которые наблюдались почти во всех исследованных нами клеточных линиях. Анализ клональ-

ных ХП в иммортализованных и трансформированных клеточных линиях провели во всех линиях, кроме шести отмеченных, на ранних пассажах, в шести линиях на средних пассажах, а в четырех, кроме ранних, на средних и поздних пассажах культивирования (табл. 1).

Цитогенетический анализ СПХ в клеточных линиях, полученных *in vitro*, на ранних пассажах культивирования. В кариотипах клеток всех линий LRec и опухолевых клетках LRec-1sft кроме линии LRec-7 были обнаружены две структурно перестроенные хромосомы 7 —  $del(7)$  и  $der(19)t(7;19)$  (рис. 4, 5). В линии LRec-7 не было  $der(19)t(7;19)$ , но присутствовали другие перестройки хромосомы 7, а также две копии  $del(7)$ , которые наблюдались и в клетках опухоли LRec-1sft. Общие СПХ —  $del(7)$  и  $der(19)t(7;19)$  — сохранялись в процессе культивирования и наблюдались на 70-м и 47-м пассажах в линиях LRec-1 и LRec-3 соответственно, так же как и в линии LRec-1sft на 14-м пассаже. Таким образом, описанные перестройки хромосомы 7 можно рассматривать как первичные и специфические для линий LRec (Арцыбашева, 1989; Ярцева и др., 1994, 2007).

В другой группе клеточных линий (IE5, trF8, trB4, trC2 и trA4E5) наблюдалась одна, специфическая для этой группы линий, клональная СПХ (табл. 1) — реципрокная транслокация между хромосомами 8 и 10 —  $t(8;10)(8q22;10q12.3)$ , в результате которой образовались две перестроенные хромосомы —  $der(8)$  и  $der(10)$ . В некоторых клетках IE5 были обнаружены дополнительные клональные СПХ —  $t(3;12)$  и  $del(15)$ , а в линии A4E5 во всех клетках выявлена инсерция неидентифицированного хромосомного материала в локус  $q13$  —  $is(9)(q13)$  (табл. 2) (Yartseva et al., 1997).

Анализ трех клеточных линий REF 58 и линии Xi 59 только в клетках REF 58#1 Fo 2-224 выявил структурную перестройку хромосомы 1 —  $add(1)(p12)$  с неидентифицированным дополнительным фрагментом на коротком плече (табл. 2). Во всех линиях наблюдали неклональные СПХ от 14 до 52.3 % от количества исследованных клеток, в клетках REF 58#1 Cl 4-2 выявили максимальное их количество.

В кариотипах клеток всех линий K51, кроме линии K51-5, выявили две или три индивидуальные для каждой линии клональные СПХ. Все исследованные клетки линий K51-5 и Mos имели нормальные кариотипы или неклональные СПХ (6—12 %). Важно отметить, что на ранних пассажах во всех линиях клетки с клональными СПХ составляли меньшую часть клеточной популяции (22—40 %). В клональные СПХ в клеточных линиях K51-2 и K51-4 вовлекались хромосомы 1, 7, 9 и 17 (табл. 2; рис. 2). Специфических клональных СПХ в линиях K51 не обнаружено (Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 1996).

Таким образом, на ранних пассажах в клеточных линиях, полученных разными способами трансформации ЭФ крысы, структурным перестройкам подвергаются хромосомы 1, 7—10, 17 и 19, при этом чаще других хромосом перестраиваются хромосомы 1, 7 и 9, а разрывы происходят в локусах  $1p12$ ,  $7q11$ ,  $7q22$  и  $9q13$  (рис. 6). Вероятно, вовлечение этих хромосом в кариотипе крысы в клональные СПХ имеет значение для иммортализации и трансформации ЭФ. Только в иммортализованной линии IE5, полученной с помощью трансфекции ЭФ вирусными онкогенами, в СПХ вовлекались хромосомы 8 и 10. Возможно, реципрокная транслокация  $t(8;10)$ , которая сохра-

Таблица 2

## Структурные перестройки нестабильных хромосом на ранних пассажах

Линия (пассаж)	Хромосома		
	1	7	9
tr A4E5 K51-2 (13)		del(7)(q22) der(17)t(7;17) (7q22;17q12.1)	is(9)(q13) i(9)(q)
K51-4 (10)	der(1)t(1;9) (1p12;9q13)		del(9)(q13) der(1)t(1;9) (1p12;9q13)
LRec-1 (12)		der(19)t(7;19) (7q11.1;19q12.3)	
LRec-2 (14)		der(19)t(7;19) (7q11.1;19q12.3)	
LRec-3 (15)		del(7)(q11.2q22.1)	
LRec-5 (5)			
LRec-6 (4)			
LRec-4 (10)		der(19)t(7;19) (7q11.1;19q12.3)	
LRec-7 (8)	del(1)(q21)	del(7)(q11.2q22.1) × 2 der(7)t(7;12) (7cen;12p11.2) × 2 der(?)t(7;14) (7q?13;14p22;14p11.1 14q11.1;14q22.1) × 2	
REF58 # 1Fo 2-224 (9)	add(1)(p12)		

няется и в линиях, производных от IE5, имеет значение для иммортализации ЭФ крысы.

В клетках наших линий СПХ можно считать только транслокацию t(7;19) и del(7) в клетках линий LRec, а также транслокацию t(8;10) в линии IE5 и ее производных.

Результаты анализа кариотипов спонтанно трансформированных клеточных линий на ранних пассажах (1—13-м) другими авторами приводятся только в трех работах, проведенных на иммортализованных линиях мезотелиальных клеток NRM1—NRM3 и коммерческой линии RM4. В двух линиях NRM выявили нормальный кариотип, а в линии NRM1 и линии RM4 — структурные перестройки хромосомы 1: der(16)t(1;16)(1q12;16p11) и дупликацию района q37-qter (Funaki et al., 1991).

При анализе линий МСК в одной из них на 4-м пассаже выявлен der(6)t(6;6), в другой — дицентрик хромосомы 1. В остальных линиях наблюдался либо нормальный кариотип, либо кариотип с ЧПХ (Foudah et al., 2009).

В смешанной популяции OSE клеток, взятых от разных животных, наблюдали нормальный кариотип, тогда как в клонных этих клеток обнаружены структурные перестройки различных хромосом — 1, 4 (4q42), 5 и X (Xq34), чаще других перестраиваются хромосомы 1 и 5. Так, в клоне 2 выявлены дупликация района q43-55.2 хромосомы 1 и делеция хромосомы 5 в районе q21.3-24. Эти же хромосомы вовлекаются в СПХ и на поздних пассажах (Godwin et al., 1992).

В трех клеточных линиях, полученных в результате трансформации онкогенами *v-myc* + *v-H-ras* кишечного эпителия, на ранних пассажах выявлен нормальный кариотип (Pogies et al., 1992).

Таким образом, немногочисленные данные цитогенетического анализа спонтанно трансформированных кле-

ток различного гистогенеза свидетельствуют о том, что на ранних пассажах часто структурно перестраивается хромосома 1 с вовлечением многих локусов — q12, q37, q43, q52 и q55.2. В то же время хромосомы 7 и 9 структурно не перестраиваются и, вероятно, вовлечение этих хромосом в структурные перестройки на ранних пассажах характерно только для ЭФ. Данные о СПХ в фибробластных линиях на ранних пассажах, кроме МСК, к сожалению, не приводятся.

Цитогенетический анализ клональных СПХ в клеточных линиях на средних и поздних пассажах. Некоторые клеточные линии были исследованы нами на средних и поздних пассажах культивирования (с 55-го по 100-й) (табл. 1), тогда как линии LRec-3, LRec-5, Mos 3, Mos+Neo 1, Mos+Neo 6 и Fwa 3 исследованы только на средних пассажах (с 25-го по 47-й). Во всех проанализированных клетках мы выявляли ХП и клеток с нормальным кариотипом нигде, кроме линии Mos 3, на 29-м пассаже не наблюдали. Линия K-22 культивировалась длительное время (более 100 пассажей), прежде чем был проведен ее детальный цитогенетический анализ (табл. 1).

В клетках K51-5 с нормальным кариотипом на 14-м, на 57-м пассажах обнаружили клональные СПХ с вовлечением хромосом 3, 6 и 11, число которых варьировало (рис. 3; табл. 3). На 100-м пассаже появилась новая перестройка хромосомы 3 — i(3q). В клетках K51-4 на 55-м пассаже появилась одна новая постоянная перестройка хромосомы 6 — i(6q). На 100-м пассаже состав СПХ не изменился, но der(1)t(1;9) стал в двух копиях, а del(9) — в двух или трех копиях. В кариотипах линий Mos+Neo 1 и Mos+Neo 6 перестраивались хромосомы 6, 9, 14, 15 и 17 (Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 1996), но СПХ, общих для них, не выявлено.

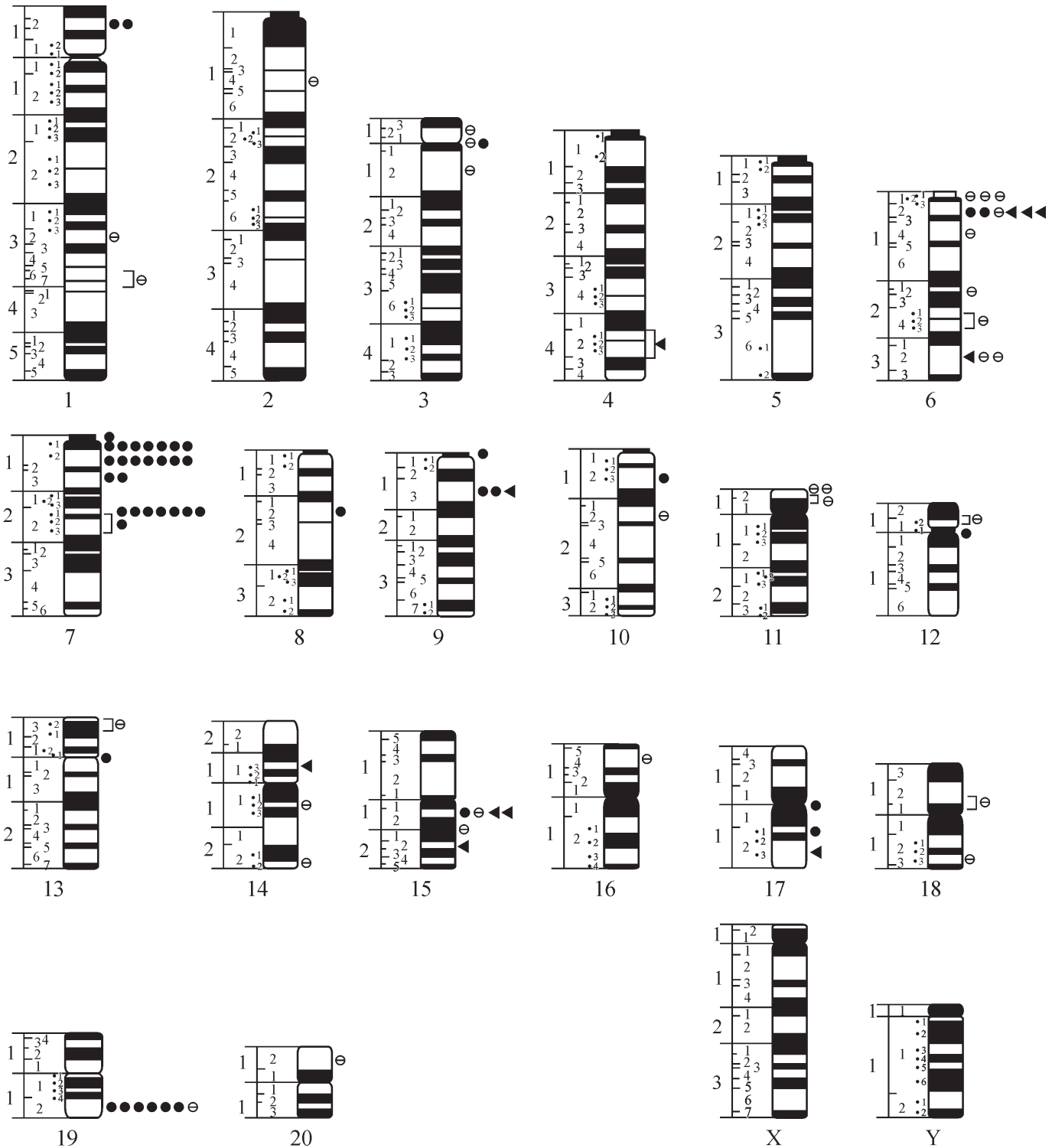


Рис. 6. Точки разрывов хромосом в кариотипах клеточных линий, полученных в результате трансформации ЭФ крысы *in vitro* на разных пассажах культивирования.

Черный кружок — точки разрывов хромосом на ранних пассажах в следующих клеточных линиях: K51-2, K51-4, LRec-1—LRec-7, IE5, tr F8, tr A4E5, tr B4, tr C2, REF58#1 cl 4-2. Светлый кружок — точки разрывов хромосом на средних пассажах в следующих клеточных линиях: LRec-1, LRec-1sf, K51-4, K51-5. Треугольник — точки разрывов хромосом в клеточных линиях, исследованных только на средних или поздних пассажах: K-22, Fwa 3, Mos+Neo 1, Mos+Neo 6. Квадратная скобка — locus хромосомы, идентифицированный неточно.

В клетках LRec-1 на 70-м пассаже появились две новые СПХ с вовлечением хромосом 10 и 20. В клетках линии LRec-1sf с аутокринной регуляцией пролиферации на 14-м пассаже наблюдались четыре новые по сравнению с линией LRec-1 клональные перестройки с вовлечением

хромосом 1, 2, 11, 15, 18 и 19. Только в линии LRec-3 на 47-м пассаже новых СПХ не было обнаружено. Таким образом, анализ кариотипов линий на средних и поздних пассажах культивирования показал, что при прогрессии трансформации появляются новые клональные СПХ при

Структурные перестройки нестабильных хромосом на средних и поздних пассажах

Линия (пассаж)	Хромосома			
	3	6	11	15
К-22 (134)	der(17)t(6;17) (6q12;17q11) × 2			
К51-4 (55) (100)	t(3;11) <sup>a</sup> t(3;11) <sup>a</sup> +i(3)(q) +t(3;?) <sup>a</sup>	i(6)(q) i(6)(q)	add(11)(p?11) <sup>a</sup>	
К51-5 (57)  (100)	der(3)t(3;18)(3p11;18p11) <sup>a</sup> der(6)t(3;6) (3q12;6q24) <sup>a</sup> + i(3q) <sup>a</sup>  То же —der(3)t(3;18) (3p11;18p11)	der(6)t(6;6)(6cen;6q14;6q32) <sup>a</sup> del(6)(q?14q22) der(6)t(3;6)(3q12;6q24) <sup>a</sup>  То же —der(6)t(6;6) (6cen;6q14;6q32) +der(6)(6cen;6q32) + add(6)(q24)	add(11)(p?11)	
LRec-1sf (15)  (62)			der(11)t(2;11) (2q14;11p12)	der(15)t(1;15) (1q32;15q12; 15q21;15q22)
LRec-1sft			der(11)t(2;11) (2q14; 11p12)	der(15)t(1;15) (1q32;15q12; 15q21;15q22)
Mos+Neo 1 (25)		der(6)t(6;6)(q32;q12)		der(15)t(9;15) (9q13;15q12)
Mos+Neo 6 (45)		der(15)t(6;15) (6q12;15q12)		der(15)t(6;15) (6q12;15q12) der(17)t(15;17) (15q12;17q12.3)

Примечание. <sup>a</sup> непостоянные клональные перестройки хромосом.

сохранении первичных перестроек. Популяция клеток с ХП получает селективное преимущество по сравнению с клетками, имеющими нормальный кариотип, и вытесняет их (Ярцева и др., 1996, 2007).

В клетках спонтанно трансформированных линий К-22 и Fwa 3 также наблюдались клональные СПХ, но не было выявлено ни СПХ, одинаковых для этих линий, ни СПХ, подобных перестройкам в линиях LRec. Клетки К-22 отличались большой кариотипической гетерогенностью, значительным числом перестроенных хромосом и имели несколько мини-хромосом. Следует отметить наличие der(17)t(6;17), присутствующего в двух копиях (табл. 3), которое, вероятно, можно считать первичным изменением хромосом, появившимся до увеличения плоидности клеток. В клетках Fwa 3 выявлена клональная реципрокная транслокация t(1;4)(1q41;4q42), в результате чего образовались две перестроенные хромосомы der(1) и der(4), при этом присутствуют две нормальные копии хромосом 1 и 4 (Глазко и др., 1989).

Таким образом, на средних пассажах наблюдается прогрессия клеточной трансформации — клетки линий LRec-1 и LRec-3 стали злокачественными, а клетки линии LRec-1sf, полученной из клеток линии LRec-1 при постепенном понижении количества сыворотки в среде до

нуля, стали обладать аутокринной регуляцией пролиферации. Прогрессия трансформации в линиях LRec сопровождается появлением новых клональных перестроек, в которые вовлекаются другие хромосомы кариотипа — 1, 2, 6, 10, 11, 15, 18—20 при сохранении специфических перестроек хромосомы 7. Хромосомы 7 и 9 перестраиваются только на ранних пассажах культивирования. Сравнение результатов цитогенетического анализа в разных группах линий показало, что на средних пассажах чаще других хромосом в перестройках участвовали хромосомы 3, 6, 11 и 15 (табл. 3)

**Хромосомный дисбаланс.** Идентификация клональных СПХ в исследованных линиях показала, что на ранних пассажах в результате СПХ происходит увеличение хромосомного материала некоторых хромосом по отношению к уровню плоидности клеток за счет копирования отдельных районов. Так, в клетках линии Mos+Neo1 копируются районы 6q12-32 и 9q13-qter в дериватах — der(6)t(6;6) и der(15)t(9;15) соответственно (рис. 1). В клетках всех линий LRec в перестроенных гомологах хромосомы 7 копируется район q22.1-qter, а в линии LRec-7 выявлено шесть der(7), и район q22.1-qter копируется дважды по отношению к гипотетраплоидному числу хромосом (табл. 2; рис. 1). В линии К51-2 выявлена три-

Таблица 4

## Вовлечение нестабильных хромосом кариотипа крысы в численные и структурные перестройки

Линия или опухоль	Хромосома										
	1	2	3	6	7	9	10	11	15	17	19
Mos+Neo 1				ч/с		ч/с			ч/с		
Mos+Neo 6				ч/с					ч/с	ч/с	
K51-2					/с	ч/с				ч/с	
K51-4	/с		ч/с	ч/с		/с		/с			
K51-5			ч/с	ч/с				/с			
Ref 58#1	/с										
Fo 2-224											
Ref 58#1				ч/							
Fo 8											
tr IE5							/с				
tr F8							/с				
tr B4							/с				
tr C2							/с				
tr A4E5						/с	/с				
LRec-1 (пассаж 12)					ч/с						/с
LRec-1 (пассаж 70)					ч/с		/с				/с
LRec-1sf	ч/с	ч/с		ч/	ч/с			/с	ч/с		/с
LRec-1sft	ч/с	ч/с	ч/	ч/	ч/с		ч <sup>а</sup> /	/с	ч/с	ч <sup>а</sup> /	/с
LRec-2—					ч/с						/с
LRec-6					ч/с						/с
LRec-7	ч/с		/с	ч/с	ч/с	ч/			ч/с	ч/	
Fwa 3	/с			ч/		ч/					
K-22	ч/		ч/с	ч/с						ч/с	

Примечание. ч — клональные ЧПХ — моносомии или целые копированные хромосомы; ч — клональные ЧПХ — утрата или копирование части хромосомы; с — клональные СПХ. <sup>а</sup> Перестройки хромосом, встречающиеся не во всех исследованных клетках.

сомия хромосомы 9 в результате образования изохромосомы при наличии еще одного ее нормального гомолога (Ярцева и др., 1994, 1996; Пуговкина и др., 1996).

Также в исследуемых линиях на ранних пассажах обнаружены СПХ, в результате которых наблюдаются потери хромосомного материала (рис. 1). Важно отметить, что в клетках всех линий LRec выявлена интерстициальная делеция района q11.2—22.1 в хромосоме 7. В линии LRec-7 также обнаружены потери в хромосоме 7 районов cenq11.1 и cenq13 в других перестроенных гомологах. В этой линии наблюдались потери хромосомного материала также в хромосомах 1, 3, 11, 13—15. На ранних пассажах утраты районов в хромосомах 1, 6, 9, 15 и 17 наблюдались и в клеточных линиях K51-2, K51-4 и Mos+Neo 1 (рис. 1).

На средних и поздних пассажах культивирования в исследованных линиях выявлены новые копированные районы хромосом. Так, в линиях K51 наблюдается копирование длинного плеча хромосомы 3 (линии K51-4 и K51-5 на пассаже 100) и копирование целой хромосомы 6 (линия K51-4) и ее районов q14-24 и q14-33 (линия K51-5) (рис. 1, 3). Дополнительный хромосомный материал 1q32-qter и 2q14-qter обнаружен также в t(1;15) и t(2;11) соответственно в линии LRec-1sf, который сохраняется в опухолевых клетках LRec-1sft (рис. 1, 5). В клетках других линий также обнаружено копирование хромосомных локусов: 1q41-qter и 4q42-qter — в линии Fwa 3, 6q12-qter и 17pter-q11 — в гипертриплоидной линии K-22, район

6q12-qter также копируется в линии Mos+Neo 6. На каких именно пассажах появился дисбаланс в линиях Fwa 3, K-22 и Mos+Neo 6, пока не определено, так как эти клеточные линии исследованы только на средних пассажах и на 134-м пассаже (линии K-22). Выявлены также потери некоторых районов хромосом: 6cen-q14 и 6q33-qter — в линии K51-5 на 57-м пассаже (данные не показаны), 14pter-p11.3, 15q12-?21 и 17q12.3-qter — в линии Mos+Neo 6 (рис. 1) (Глазко и др., 1989; Пуговкина и др., 1996; Ярцева и др., 1996).

Таким образом, хромосомный дисбаланс выявлен в 12 клеточных линиях, полученных в результате трансформации ЭФ *in vitro*. На ранних пассажах культивирования чаще других копировались районы 6q12-32, 7q22.1-qter и 9q13-qter, а терялись чаще районы 7q11.2-22.1 и 15q12-qter. На средних пассажах чаще других копировался район 6q12-24, а утрачивались районы 15q22-qter и 17q12-qter.

Сравнительный анализ клеточных линий, полученных при трансформации клеток крысы *in vitro*, показал, что почти все хромосомы кариотипа в той или иной степени вовлекаются в клональные ЧПХ и СПХ. Самой нестабильной является хромосома 6, в ЧПХ и СПХ которой вовлекаются шесть разных локусов, преимущественно q12 (табл. 4; рис. 6). Хромосома 7 также активно вовлекается в перестройки обоих типов, но рвется только в четырех локусах, преимущественно в q11 и q22. Хромосомы 1 и 9 также часто перестраиваются с вовлечени-

ем локусов 1p12 и 9q13. Хромосомы 3, 11 и 15 перестраивались на поздних пассажах с вовлечением локусов 3cen, 3p11 и 3q12, аналогично перестраивалась хромосома 11, а хромосома 15 — с вовлечением локусов 15q12 и 15q22 (рис. 6). Перестройки хромосом 3, 6, 11 и 15, по-видимому, имеют значение для прогрессии процесса трансформации клеток. Важно отметить, что в хромосомах 15 и 17 перестройки происходят с потерей длинного плеча или его части, а в хромосоме 3 — с потерей короткого плеча.

Другие исследователи изучали перестройки хромосом на поздних пассажах в основном при спонтанной трансформации клеток. Цитогенетический анализ ЭФ сделан в трансформированной линии Rat-2 только на поздних пассажах (135—196-м) (Krishnaveni, Ghosh, 1996). В СПХ вовлечены, как и в наших линиях, хромосомы 3, 7, 8 и 11 и, кроме того, обе копии хромосомы 2. Вовлечение хромосомы 7 в транслокацию t(2;7) выявлено в отличие от наших линий только на 176-м пассаже.

В эпителиоподобной линии tHmf-e, полученной из линии миофибробластов Hmf, в СПХ вовлекались хромосомы 1, 5, 12, 13, 17 и 19, а также две копии хромосомы 4 (Brett et al., 1986).

В клеточных линиях из МСК на ранних пассажах (1—8-м) наблюдался нормальный кариотип, на 16-м пассаже в СПХ вовлекаются хромосомы 3, 11 и 15, перестраивающиеся и в наших линиях, а кроме того, изменяются и другие хромосомы — 2, 5 и 18 (Foudach et al., 2009). Хромосома 7 в МСК, а также в линиях Hmf и tHmf-e не имеет структурных аномалий.

В линиях, полученных в результате трансформации ЭФ вирусными и клеточными онкогенами (*E7 HPV16+ EJ-ras*) (Kato et al., 1992), а также геном *H-ras* с мутацией в 12-м кодоне (Zouh et al., 1997), структурно перестраиваются также хромосомы 3, 7 (7q?13), 11 и 19 и, кроме того, хромосомы 5 и 16.

На поздних пассажах в клетках OSE появились новые перестройки хромосом: инверсия района 1q43-55.2 в хромосоме 1 в клоне с del(5)(q21.3q24). В клоне без делеции хромосомы 5, но с ее моносомией появилась транслокация t(5;12) за счет перестройки единственного нормального ее гомолога. В линии из смешанной популяции клеток с нормальным кариотипом появилась инсерция (вставка) в локус 1q52, а также hsr (гомогенно окрашенный район) в локус 9q32 (Godwin et al., 1992).

В одной из линий мезотелиальных клеток NRM на средних пассажах появилась делеция хромосомы 16 в q22, а в другой — новые перестройки хромосомы 1: del(1)(q34qter) и dup(1)(q33q36). В третьей линии хромосома 1 также вовлекалась в транслокацию с хромосомой 2, кроме того, перестраивалась хромосома 7 (Funaki et al., 1991).

Таким образом, данные литературы о ХП в трансформированных клетках крысы *in vitro* на средних и поздних пассажах свидетельствуют о том, что активно перестраиваются, как и в наших линиях, хромосомы 1, 3, 7, 11, 15 и 19. Кроме того, в СПХ вовлекаются хромосомы 2 и 5.

Сопоставление наших результатов цитогенетического анализа клеточных линий, полученных в результате спонтанной трансформации ЭФ *in vitro* или трансформации онкогенами, с данными литературы показало, что для трансформации клеток крысы *in vitro* в большинстве случаев характерно сохранение диплоидного уровня кариотипа как при иммортализации клеток, так и при прогрессии трансформации. Кроме того, характерно наличие не-

значительного числа как ЧПХ, так и СПХ на ранних пассажах, а также преимущественное вовлечение в оба типа перестроек на ранних пассажах хромосомы 1, а в наших линиях еще хромосом 7 и 9. На средних пассажах в фибробластоподобных клетках чаще вовлекаются в перестройки хромосомы 3, 5, 11 и 15, а в эпителиальных клетках, кроме того, еще хромосома 1. Вероятно, вовлечение в перестройки хромосомы 7 на ранних пассажах при иммортализации клеток характерно для клеток мезодермального происхождения — фибробластов и миофибробластов. Это предположение подтверждается наличием перестроек хромосомы 7 в других клеточных линиях, например трансформированных миобластных клетках. В линии L6J1 наблюдали t(7;14), в линии ХС, полученной из клеток саркомы Рауса, — t(7;12), в клетках саркомы Рауса — копирование района 7cenq34, в клетках рабдомиосаркомы крысы РА-23 — t(7;14) (Levan, Mitelman, 1975; Федорцева и др., 1983; Каминская и др., 1990). Еще одной характерной чертой изменения кариотипа клеток является хромосомный дисбаланс, при котором происходит либо копирование генов в добавленных районах хромосом, либо потеря генов в результате хромосомных делеций. При прогрессии трансформации наблюдается усиление хромосомного дисбаланса с вовлечением новых хромосомных районов. Вероятно, добавленные или утраченные районы хромосом содержат гены, необходимые клетке для появления, поддержания и прогрессии трансформированного фенотипа.

Исходя из вышеизложенных данных можно заключить, что на ранних стадиях трансформации клеток *in vitro* в некоторых случаях кариотип всех клеток популяции может оставаться нормальным. В других случаях в кариотипе клеток может наблюдаться только трисомия какой-либо хромосомы, и велика вероятность дальнейшего вовлечения дополнительной копии этой хромосомы в структурную перестройку. В иных случаях наблюдается одна или несколько клональных СПХ без ЧПХ, при этом может сохраняться популяция клеток с нормальным диплоидным кариотипом. На более поздних пассажах культивирования наблюдаются увеличение нестабильности кариотипа, которое выражается в появлении клеток с увеличенным числом клональных ЧПХ и СПХ, обладающих селективным преимуществом по сравнению с клетками с нормальным кариотипом, усиление хромосомного дисбаланса, а в некоторых случаях прогрессия трансформации.

Подобный характер изменений кариотипа выявлен в клеточных линиях китайского хомячка, полученных при спонтанной трансформации ЭФ. На ранних пассажах (5—10-м) определяли нормальный кариотип с диплоидным числом хромосом либо преимущественно с трисомией целой хромосомы 3 или ее длинного плеча 3q. После 10-го пассажа наблюдали исчезновение клеток с нормальным кариотипом, появление анеуплоидии (при сохранении диплоидного уровня) и новых СПХ с вовлечением хромосом 5, 8/8q и др. (Cram et al., 1983; Ray et al., 1986; Shimizu et al., 1995).

Вероятно, при спонтанной трансформации клеток либо первоначально может сохраняться нормальный кариотип, либо происходит нерасхождение какой-либо хромосомы с последующим ее вовлечением в структурные перестройки. Тогда как при трансформации клеток онкогенами на ранних пассажах вероятны все три пути — сохранение нормального кариотипа, наличие только анеуплоидии или появление клона клеток только с СПХ.

### Неслучайное вовлечение хромосомных локусов в численные и структурные перестройки в процессе трансформации клеток

СПХ в виде транслокаций и инверсий приводят к образованию гибридных генов, которые участвуют в трансформации клеток в результате изменения функций генов-партнеров, образующих гибридный ген. Так, в клетках альвеолярной рабдомиосаркомы человека (АРМС) обнаружена специфическая транслокация хромосом  $t(2;13)(2q35;13q14)$  или ее вариант  $t(1;13)(1p36;13q14)$  (Douglass et al., 1993), в результате чего образуются гибридные гены *PAX3/PAX7/FKHR* (Epstein et al., 1995; Barr, 2001). Гены *PAX3* и *PAX7* кодируют транскрипционные факторы, регулирующие вступление клеток-предшественников скелетных мышц, МСК, в миогенную дифференцировку (Gang et al., 2008; Charytonowicz et al., 2009). Продукт гена *FKHR* (*FOXO1A*) регулирует транскрипцию генов, связанных с апоптозом, и потеря одного нормального аллеля гена *FKHR* может привести к нарушению апоптоза. Гибридный транскрипционный фактор *PAX3/FKHR* вызывает нарушения транскрипционной регуляции своих генов-мишеней, например генов миогенной дифференцировки *MYOD1*, *MYF5*, и др., тем самым нарушая миогенную дифференцировку клеток-предшественников мышечных клеток (Taylor et al., 2011). Показано, что одного гена *PAX3/FKHR* недостаточно, для того чтобы произошла трансформация миогенных клеток в клетки рабдомиосаркомы. Для этого необходимы еще некоторые генетические события в геноме клеток, по меньшей мере нарушения в р53-сигнальном пути (Ren et al., 2008). Кроме специфических транслокаций в кариотипах клеток АРМС методом сравнительной геномной гибридизации (CGH) в эмбриональной и плеоморфной рабдомиосаркомах (ПРМС), а также в АРМС показали хромосомный дисбаланс относительно полиплоидного уровня клеток в виде добавок или потерь некоторых целых хромосом или их районов. Выявлена также амплификация района 12q13, в котором локализованы следующие гены: *MDM2*, кодирующий убиквитин-лигазу, *GLI*, продуктом которого является транскрипционный фактор, CDK — циклинзависимые киназы и *GADD153* (Li et al., 2009), а также района 2p24, в котором находятся гены *N-MYC*, *DDX1* — DEAD box gene 1, которые коамплифицированы в АРМС (Nachitanda et al., 1998, и др.). В клетках ПРМС во всех исследованных случаях специфических транслокаций не обнаружено, но выявлены дополнительные копии хромосом или их районов — 8, 18/18q, 20/20q, 22 и др. или ампликоны в районах 1p21, 1q21, 3p12 и др. Кроме того, показаны потери целых хромосом или их районов 3/3p, 5q32, 10q23 и др. Методом CGH на чипах в клетках ПРМС показаны изменения числа копий генов: увеличение копий генов *LAMC2*, кодирующего ламинин гамма 2, и *PAK1*, кодирующего p21-активируемую киназу 1, которые связаны с организацией базальной мембраны и элементов цитоскелета, гена *SAS/CDK4*, а также амплификация гена *FGFR1* и утрата генов *PDGFRA*, *H-RAS* и *GLI* (Gordon et al., 2003; Goldstein et al., 2006). Методом количественной ПЦР в реальном времени в клетках АРМС и ПРМС показали активацию экспрессии генов *PAK1*, *PAX3*, *FKHR*, гена серин-треонин киназы — *AURKA*, которая регулирует функцию центросом, сборку веретена деления, сегрегацию хромосом и цитокинез, а также некоторых других генов (Goldstein et al., 2006). Данные о том, что увеличение числа копий генов и

их амплификация приводят к повышенной экспрессии, подтверждены многими исследованиями и систематизированы Сантариусом и соавторами (Santarius et al., 2010). Таким образом, СПХ и хромосомный дисбаланс в трансформированных и опухолевых клетках приводит к изменению экспрессии генов или к их потере.

По нашим и литературным данным, при трансформации клеток крысы *in vitro* чаще других хромосом в численных и структурных перестройках участвуют хромосомы 1, 3, 6, 7, 9, 11, 15 и 17.

В клетках спонтанной аденокарциномы эндометрия матки крыс и в клеточных линиях из остеосаркомы характерно копирование районов q11-16 и q16-qter хромосомы 6 (Hamta et al., 2005) или же, напротив, потеря района 6q11q16 в клеточных линиях, полученных из остеосаркомы (Stevens et al., 2005).

В районе 6q11-16 находятся гены *Pomc*, *Apob*, *Sdc1*, *n-Myc*, *Ddx1*, *Rrm2* и *Odc1*, которые имеют отношение к возникновению рака (cancer related genes) (табл. 5). Показано, что гены *n-Myc*, *Ddx1*, *Rrm2* и *Odc1* в клетках аденокарциномы матки амплифицированы (Karlsson et al., 2001; Adamovic et al., 2005). Кроме того, в этом районе имеется еще целый ряд генов, участвующих в важных клеточных процессах, имеющих отношение к канцерогенезу (табл. 5). Таким образом, копирование хромосомы 6 и ее района q11-16, а также вовлечение локусов q11, q12, q16 и q32 в клональные СПХ, по-видимому, неслучайно. В наших клеточных линиях хромосома 6 чаще вовлекается в перестройки на более поздних пассажах культивирования и для нее характерно копирование всей хромосомы, иногда в виде изохромосомы — i(6q) или района q11-24 (рис. 1). Так, в линиях K51-4 и K51-5 эта хромосома копируется и вовлекается в СПХ на 55-м и 57-м пассажах культивирования, а в линии LRec-1sf копируется при прогрессии трансформированного фенотипа клеток, выражающегося в приобретении аутокринного типа регуляции пролиферации и полусуспензионного типа роста (рис. 3; табл. 3). В клетках LRec-1sf, вероятно, копирование гена *c-Fos* может быть одним из факторов, способствующих ослаблению способности прикрепления клеток к субстрату.

Хромосома 7 часто перестраивается в опухолевых клетках крысы. Так, в клетках спонтанной иммуноцитомы наблюдается специфическая перестройка  $t(6;7)(q32;q33)$ , в результате которой ген *c-MYC* из локуса 7q33 переносится в район 6q32, близко к гену тяжелых цепей иммуноглобулина E, что приводит к усиленной экспрессии гена *c-MYC* за счет работы энхансера промотора иммуноглобулина. В клетках саркомы Рауса также выявлена структурная перестройка хромосомы 7 с копированием района 7cenq34 (Levan, Mitelman, 1975; Wienar et al., 1982; Pear et al., 1986). Перестройки хромосомы 7 наблюдаются и в других типах опухолей.

В наших клеточных линиях на ранних пассажах чаще других в СПХ и СПХ вовлекаются хромосомы 7 и 9, в частности их локусы 7 (q11, q13 и q22) и 9 (q13).

Хромосома 7 в спонтанно трансформированных линиях LRec и линии K51-2, полученных из ЭФ, структурно перестраивается и копируется на пассажах 4—15. В линии LRec-6 транслокация  $t(7;19)$  с участием локуса 7q11 и интерстициальная делеция  $del(7)(q11.2-22.1)$  выявляются уже на 4-м пассаже культивирования. В локусе 7q11 и районах 7q11-13, 7q12-22 и 7q12-13 находятся гены, регулирующие пролиферацию, апоптоз, репарацию ДНК, которые связаны с иммортализацией и возникновением



## Гены, локализованные в нестабильных локусах хромосом

Район хромосомы	Ген	Название продукта гена
6q11-16	<i>Pomc</i>	Proopiomelanocortin 1
	<i>Apob</i>	Apolipoprotein B
	<i>Sdc1</i>	Syndecan 1
	<i>n-Myc</i>	Neuroblastoma oncogene n-Myc
	<i>Ddx1</i>	DEAD box gene1
	<i>Rrm 2</i>	Ribonucleotide reductase (M2 polypeptide)
	<i>Odc1</i>	Ornithine decarboxylase 1
6q13	<i>Alk</i>	Anaplastic lymphoma receptor tirosin kinase
	<i>Prkce</i>	Protein kinase C, epsilon type
	<i>E2f6</i>	Transcription factor E2f6
	<i>Msh</i>	DNA mismatch repair protein Msh2
	<i>Msh6</i>	and Msh6, гены репарации ДНК
<i>Lama1</i>	Laminin, $\alpha$ 1	
6q11-14	<i>Tub<math>\beta</math>4</i>	Tubulin, $\beta$ 4
6q21-q23	<i>c-Fos</i>	Oncogene
7q11	<i>Yes-rs1</i>	»
	<i>Cdk2</i>	Ciklin depending kinase 2
7q11-q13	<i>Tcfе2a</i>	Transcription factor E2a
	<i>Timp3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
7q13	<i>Igfbp3q2</i>	Insulin-like growth binding protein 3 QTL2
	<i>Apafl</i>	Apoptotic protease activating factor 1
	<i>Igf 1</i>	Insulin-like growth factor 1
	<i>Dcn</i>	Decorin (extracellular matrix)
7q12-q22	<i>Kitl</i>	Kit ligand
	<i>Scpro 3</i>	Stem cell proliferation
	<i>Kifc4b</i>	Kinesin family, member C4B
	<i>Ifng</i>	Interferon $\gamma$
7q22	<i>Cdk4</i>	Ciklin depending kinase 4
	<i>Stat2, Stat6</i>	Signal transducer, activator of transcription 2 and 6
	<i>V-erb-b2</i>	Oncogene
	<i>Elk3, Mdm2</i>	Oncogenes
	<i>Gli</i>	GLI-Kruppel family, member GLI, transcription factor
	<i>Cish2</i>	Cytokin-inducible SUR-containig protein 2, suppressor of cytokine signals (r-interferon)
9q13-22	<i>Il1 r1, Il1r2</i>	Interlikin 1 reseptors, type 1 and 2
	<i>l-Myc 2</i>	Oncogene
	<i>Vav</i>	»
	<i>Rab 23</i>	RAB 23, member of Ras oncogene famaly
	<i>Rp1h</i>	Retinitis pigmentosa 1 (intracellular signaling cascade)
	<i>Terf1</i>	Telomeric repeat binding factor 1
9q22	<i>Src</i>	Oncogene
	<i>Erec5</i>	Excision repair cross-complementing (rodent repair deficiency)
9q22-32	<i>Gas10</i>	Growth arrest, specific 10
9q31-32	<i>Stat1</i>	Signal transducer, activator of transcription 1
	<i>Col3a1</i>	Procollagen, type 3, $\alpha$ 1 (cell adhesion)
9q33	<i>Pax 3</i>	Paired box 3, transcription factor

Примечание. Данные для локуса 6q11-16 взяты из работ: Karlsson et al., 2001; Adamovic et al., 2005; остальные — из Базы данных по геному крысы (RGD: <http://rgd.mcw.edu>).

рака (табл. 5). Неслучайное вовлечение этих районов в СПХ при иммортализации и трансформации клеток очевидно.

Хромосома 9, по данным литературы, чаще теряется полностью или утрачиваются ее районы — 9q31-qter в клетках линии РС-12 (феохромцитомы) и 9q34-qter в клетках саркомы Рауса (Levan, Mitelman, 1975; Мамаева, 2002; Stevens et al., 2005). В клетках аденокарциномы эндометрия, напротив, копируется большая часть хромосомы — 9cen-q36 (Hamta et al., 2005). В наших линиях она также копируется и участвует в клональных СПХ (линия K51-2) либо только перестраивается с вовлечением локуса 9q13 (линия K51-4) на ранних пассажах культивирования, как и хромосома 7 (табл. 2) (Ярцева и др., 1996). В клетках линии Fwa 3 наблюдается трисомия хромосомы 9 без вовлечения в СПХ (Глазко и др., 1989; Ярцева и др., 1996). Район 9q13-22 также содержит ряд генов, осуществляющих важные клеточные функции (табл. 5). Таким образом, разрыв хромосомы 9 в локусе q13, копирование или потеря всей хромосомы либо ее районов может изменять регуляцию пролиферации клеток или приводить к увеличению дозы генов, участвующих в прогрессии трансформированного или опухолевого фенотипа.

Хромосома 8 редко изменяется как численно, так и структурно в клетках наших линий, но в иммортализованной линии IE5 и ее производных — злокачественно трансформированных линиях tr F8, tr B4, tr C2 и tr A4E5 — наблюдается специфическая, единственная для этих линий клональная сбалансированная транслокация t(8;10)(8q22;10q12). Возможно, при этом структурно нарушается ген *MLL* (mixed-lineage leukemia gene), который у крысы находится в локусе 8q22, а у человека — в хромосоме 11 (11q23). Хромосомный локус, содержащий ген *MLL*, часто вовлекается в транслокации на многие хромосомы в клетках острого миело- и лимфолейкоза человека, а также в клетках некоторых сарком, в результате чего он участвует в образовании многих гибридных генов и является геном-партнером более 60 различных генов. Белок *MLL* входит в состав мультипротеинного суперкомплекса, который обладает транскрипционной, ацетилазной и деацетилазной активностью. *MLL* также обладает метилтрансферазной активностью и метилирует гистон H3-K4 (Daser, Rabbitts, 2004; Chen et al., 2010). Локус 10q12 содержит также ген опухолевого супрессора *Tsc2*, кодирующий белок туберин, мутации в котором приводят к синдрому туберозного склероза и предрасположенности к образованию опухолей. Белок *TSC2* принадлежит комплексу *TSC1/TSC2*, состоящему из белков туберина и хамартина, которые регулируют активность комплекса *mTORC1*, последний в свою очередь регулирует транскрипцию, трансляцию, биогенез рибосом в клетке, рост и размер клеток и другие процессы (Зубова и др., 2012). В результате вовлечения локусов 8q22 и 10q12 в транслокацию t(8;10) можно предположить образование гибридного гена *MLL/TSC* и его роль в иммортализации клеток линии IE5, утративших ген LT-антигена вируса полиомы, которым они были трансфицированы. Прогрессия процесса трансформации до высокозлокачественного состояния клеток в линиях tr F8, tr B4, tr C2 и tr A4E5 определяется, вероятно, генами *E6* и *E7* вирусов папилломы человека HPV 16 и HPV 18. Ген *E7*, как было показано Журбицкой с соавторами (1999), сохраняется в геноме клеток tr F8 и tr B4, и в этих клетках выявляются E7 РНК и E7 белок.

Кроме копирования целых нормальных хромосом или их районов в опухолевых и трансформированных клетках крысы наблюдается противоположный процесс — потери как целых хромосом 5, 10, 15 и 17, так и их плеч 3p, 15q и 17q или определенных районов некоторых других хромосом.

Характерной перестройкой для опухолевых клеток является утрата короткого плеча хромосомы 3 (Maeda et al., 1980; Herens et al., 1992; Popescu et al., 1999), которое содержит рибосомные гены. Часто длинное плечо 3q присоединяется к длинному или короткому плечу хромосом 11 и 12, которые, как и хромосома 3, являются ядрышкообразующими. Так, в клетках линии K3D эритробластной лейкемии, индуцированной у крыс инъекцией ДМБА, выявлены транслокации t(3;12)(3q12; 12p?11) и повышенная транскрипция гена *Abl* по сравнению с родительской линией K2D, не имеющей этой транслокации. Линия K2D в отличие от K3D способна к индуцированной эритробластной дифференцировке. Такахаши с соавторами (Takahashi et al., 1986) методом гибридизации *in situ* показали локализацию гена *c-Abl* в нормальной хромосоме 3 и в t(3;12) и получили ДНК клон, содержащий *c-Abl*, гибридизованный с гДНК. Вероятно, прогрессия трансформированного фенотипа клеток K3D и активация транскрипции *Abl* мРНК связана с появлением транслокации t(3;12)(3q12;12p?11). В пренеопластических клетках печени (клеточная линия CL-52) перестройки хромосомы 3 происходят также с потерей короткого плеча 3p, и авторы рассматривают делецию 3p в качестве одной из причин малигнизации этих клеток (Kerler, Rabes, 1996).

В клетках наших линий K51-5 на пассаже 57 и K51-4 и K51-5 на пассаже 100 перестройки хромосомы 3 также происходят с потерей короткого плеча (рис. 1, 3). Возможно, короткое плечо 3p содержит опухолесупрессорный ген, как полагают Попеску с соавторами (Popescu et al., 1999). Кроме того, при транслокации хромосом 11 или 12 на плечо 3q могут активироваться гены *Vav2* или *Abl1* в локусах 3q11-12 и 3q12 соответственно и способствовать прогрессии трансформации клеток.

В клетках карциномы легкого, индуцированной радонном, с помощью CGH-анализа обнаружены потери района 5q11-33 (Dano et al., 2000). В клетках спонтанной аденокарциномы эндометрия матки у крыс выявлена делеция 5q31~33 с потерей локусов *Cdk2A* и *Cdk2B* (Adamovic et al., 2008). Локус *Cdk2A* кодирует опухолевые супрессоры p16<sup>INK4A</sup>, а также p19<sup>ARF</sup> или p14<sup>ARF</sup> у человека. Белок p16<sup>INK4A</sup> ингибирует фосфорилирование белка RB1 циклин D-зависимыми киназами CDK4 и CDK6, тем самым предотвращая высвобождение транскрипционного фактора E2F, который участвует в активации работы генов, занятых в репликации. Белок p19<sup>ARF</sup> инактивирует онкоген *Mdm2*, связываясь с ним, что приводит к активации гена *p53* и апоптозу или старению клеток в зависимости от сайта фосфорилирования (Sherr, 1998). Предполагают, что делеции локуса *Cdk2A* являются ранним событием при развитии аденокарциномы эндометрия матки. У человека этот локус находится в хромосоме 9 (9p21) и утрачивается во многих опухолях эпителиального происхождения на ранних стадиях трансформации клеток (Россо, Sidransky, 2001).

Кроме того, моносомия хромосомы 5 или делеция района 5q21.3-24 выявляется в кариотипе поверхностного эпителия яичника крыс на ранних этапах спонтанной трансформации *in vitro*. После 20-го пассажа эти клетки

обладают способностью пролиферировать независимо от субстрата (в мягком агаре). В локусе 5q22-23 картирован ген *Sai1* — ингибитор независимого от субстрата размножения клеток, и потеря одного его аллеля способствует росту клеток в мягком агаре (Godwin et al., 1992; Lu et al., 1997). По данным литературы, достаточно часто утрачиваются хромосомы 15 и 17, а в наших линиях в основном их длинные плечи (рис. 1; табл. 3) (Levan, Mitelman, 1975; Brett et al., 1986; Dano et al., 2002). В локусе 15q12 находится опухолевый супрессорный ген *Rb1*, в районе 15q12-22 — ген *Tnfsf11* из суперсемейства факторов некроза опухолей, член 11, и утрата одного аллеля этого гена может способствовать иммортализации и трансформации ЭФ крысы.

Спонтанная иммортализация и трансформация клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, вероятно, происходят при непосредственном участии ХП, как в наших спонтанно трансформированных линиях LRec, Fwa 3 и К-22. В то же время клетки линий К51, Mos и Mos+Neo, вероятно, иммортализованы клеточными онкогенами, а ХП необходимы для адаптации клеток к условиям культуры и, возможно, более медленной прогрессии трансформации, которая в этих клетках может происходить при постепенном накоплении геномных нарушений. Таким образом, сопоставление «горячих точек» хромосом и генов, локализованных в них, в кариотипах трансформированных клеток крысы показывает, что хромосомы повреждаются в этих местах не случайно. В них локализованы гены, отвечающие за регуляцию пролиферации, репарацию ДНК, апоптоз, клеточную адгезию, дифференцировку клеток и другие важные клеточные функции. Наиболее информативны результаты исследований ХП в клетках опухолей, спонтанно возникающих у линейных крыс без действия канцерогенов или других агентов, а также в клетках, спонтанно трансформированных *in vitro*.

### Заключение

Сбалансированные ХП, приводящие в результате к образованию гибридных (слитых) генов, кодирующих ростовые и транскрипционные факторы, а также киназы, выявлены всего лишь в 20 % всех злокачественных новообразований гемобластозов и опухолей (Mitelman, 2007). Доказано, что они имеют важное значение, но недостаточны для инициации трансформации клеток. В результате делеций хромосом утрачиваются опухолевые супрессорные гены, регулирующие пролиферацию клеток, и утрата хотя бы одного аллеля этих генов приводит к иммортализации клеток. Оба типа перестроек рассматриваются в качестве первичных изменений кариотипа при трансформации клеток.

Анеуплоидия, которая приводит к дисбалансу генетического материала, также является важной характеристикой кариотипа опухолевых и трансформированных клеток — преобладающая часть солидных опухолей и гемобластозов имеет анеуплоидное число хромосом. Существует предположение о том, что анеуплоидия возникает раньше СПХ в результате нерасхождения хромосом в митозе, что приводит к нарушению стабильности кариотипа и к появлению мутаций и СПХ (Nicholson, Dusberg, 2009).

Наши данные свидетельствуют о том, что анеуплоидия является одним из возможных вариантов первичного изменения кариотипа. Появление в иммортализованных

клетках ЧПХ и СПХ означает наличие мутаций или эпигенетических изменений в генах, контролирующих стабильность генома, генах репарации ДНК и генах, регулирующих контрольные точки клеточного цикла.

Одним из механизмов эпигенетических изменений является метилирование ДНК. Впервые метилирование CpG островков генов промоторов при раке было показано в работе Байлина с соавторами (Baylin et al., 1985). В дальнейшем многочисленные исследования выявили различия в метилировании генов в нормальных и раковых клетках, которые заключаются в гипометилировании генома раковой клетки, локальном гиперметилировании генов опухолевых супрессоров (*p16* и *Rb*), а также повышенной чувствительности к мутациям *meCpG*-островков. В пренеопластических клетках обнаружено гиперметилирование генов репарации ДНК: *MLH1*, *GST Pi* и др., а также гена *CHFR*, регулирующего контрольные точки клеточного цикла и хромосомную стабильность и плоидность клетки (Baylin, Jones, 2010).

Совмещение и сопоставление цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, интенсивно проводимые в последнее десятилетие, должны привести к пониманию сложных механизмов опухолевой трансформации клеток и способствовать поиску новых способов терапии злокачественных новообразований, специфических для каждого типа опухоли.

Авторы выражают искреннюю признательность Т. В. Поспеловой (Институт цитологии РАН) за консультацию и обсуждение полученных результатов.

### Список литературы

- Арцыбашева И. В. 1989. Получение линий спонтанно трансформированных эмбриональных клеток крысы и исследование их фенотипических и генотипических особенностей: Автореф. канд. дис. Л. 20 с. (Artsibasheva I. V. 1989. Establishment of spontaneously transformed cell lines from rat embryos and analysis their phenotypic and genotypic features. PhD abstract. Leningrad. 20 p.)
- Безбородкина Н. Н., Оковитый С. В., Кудрявцев Б. Н. 2008. Гетерогенность гепатоцитов и ее роль в углеводном обмене печени. В кн.: Углеводный метаболизм при хронических поражениях печени. СПб.: Синтез Бук. 43—59. (Bezborodkina N. N., Okovity S. V., Kudryavtsev B. N. 2008. Heterogeneity of hepatocytes and their effects in liver glycogen metabolism. In: Glycogen metabolism in chronic liver injury. St. Petersburg: Sintez Buk. Leningrad. 43—59.)
- Глазко Т. Т., Федорцева Р. Ф., Ярцева Н. М., Василевская С. А. 1989. Особенности изменения кариотипа эмбриональных клеток при спонтанной трансформации в процессе длительного культивирования. В кн.: III Всесоюз. конф. «Генетика соматических клеток в культуре». М. 38—39. (Glazko T. T., Fedortseva R. F., Iartseva N. M., Vasilevskaia C. A. 1989. Features of karyotypic abnormalities of spontaneously transformed embryonic cells during prolonged cultivation. In: III All-Union conference «Genetics of somatic cell in culture». Moscow. 38—39.)
- Журбицкая В. А., Федорова Л. И., Ярцева Н. М., Савельева Л. В., Зеленин А. В., Киселев Ф. Л. 1999. Трансформация иммортализованных эмбриональных фибробластов крысы геном E7 вируса папилломы человека типа 16. Молекуляр. биол. 33 : 282—286. (Zhurbitskaia V. A., Fjodorova L. I., Iartseva N. M., Savel'va L. V., Zelenin A. V., Kisselev F. L. 1999. Transformation of immortalized rat embryonic fibroblasts by the E7 gene of human type 16 papilloma virus. Mol. Biol. (Moscow). 33 : 282—286.)
- Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. 2012. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических, энергитических сигнальных путей в клетке. Цитология.

54 (8) : 589—602. (Zubova S. G., Shitikova Zh. H., Pospelova T. V. 2012. TOR-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. Tsitologiya. 54 : 589—602.)

Каминская Е. В., Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф., Вахтин Ю. Б. 1990. Нестабильность кариотипа в потомствах «истинно злокачественных клеток» рабдомиосаркомы RA-2 крысы. Докл. Акад. наук СССР. 310 (1) : 207—210. (Kaminskaia E. V., Iartseva N. M., Fedortseva R. F., Vakhtin Yu. B. 1990. Instability of karyotype in the progeny of rat RA—2 rhabdomyosarcoma «true malignant cells». Dokl. Akad. Nauk SSSR. 310 : 207—210.)

Мамаева С. Е. 2002. Хромосомы нормального кариотипа и постоянных клеточных линий крысы. В кн: Атлас хромосом постоянных клеточных линий хромосом человека и животных. М.: Научный мир. 166—191. (Mamaeva S. E. 2002. Normal chromosomes and chromosomes of permanent cell lines of the rat [Rattus norvegicus]. In: Atlas of chromosomes of human and animal cell lines. Moscow: Scientific World. 166—191.)

Пуговкина Н. А., Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф., Игнатова Т. Н. 1996. Новые линии иммортализованных клеток из трансгенных эмбрионов крысы. I. Получение и характеристика линий клеток из эмбрионов крысы с инъецированным онкогеном одновременно с геном устойчивости к генетицину или без него. Цитология. 38 (4/5) : 530—541. (Pugovkina N. A., Iartseva N. M., Fedortseva R. F., Ignatova T. N. 1996. New immortalized cell lines obtained from transgenic rat embryos. I. Obtaining and characterization of cell lines from rat embryos with ingested *v-mos* oncogene in plasmide pBR322, or *v-mos* oncogene in plasmide pBR322 coupled with gene of resistance to genecitin (G418) in plasmide pSV2 NEO. Tsitologiya. 38 (4/5) : 530—541.)

Федорцева Р. Ф., Ярцева Н. М., Фридлянская И. И. 1983. Кариологическая характеристика перевиваемой крысиной миогенной клеточной линии L6J1. Цитология. 25 (9) : 1096—1097. (Fedortseva R. F., Iartseva N. M., Fridlianskaia I. I. 1983. Karyologic characteristic of permanent rat myogenic cell line L6J1. Tsitologiya. 25 : 1096—1097.)

Яковлева Т. К., Ярцева Н. М., Турилова В. И. 2011. Прогрессия кариотипа клеточных линий остро миелобластного лейкоза человека. Клеточные культуры. Информ. бюл. СПб. Вып. 27 : 34—45. (Iakovleva T. K., Iartseva N. M., Turilova V. I. 2011. Progression of karyotype of acute myeloblastic leukemia cell lines. Cell Cultures. Inf. Bulletin. St. Petersburg. 27 : 34—45.)

Ярцева Н. М., Пуговкина Н. А., Федорцева Р. Ф. 1996. Цитогенетический анализ новых линий иммортализованных клеток, полученных из трансгенных эмбрионов крысы, содержащих онкоген K51. Цитология. 38 (2) : 262—263. (Iartseva N. M., Pugovkina N. A., Fedortseva R. F. 1996. Cytogenetic analysis of new lines immortalized cells obtained from transgenic rat embryos with ingested K51 oncogene. Tsitologiya. 38 : 262—263.)

Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV-304. I. Множественные хромосомные перестройки. Цитология. 50 (7) : 568—575. (Iartseva N. M., Fedortseva R. F. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV-304. I. Multiple chromosomal rearrangements in endothelial cell line ECV-304. Cell Tissue Biol. 2 : 428—435.)

Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф., Арцыбашева И. В. 2007. Перестройки хромосом и их роль в спонтанной иммортализации и трансформации эмбриональных клеток крысы *in vitro*. Цитология. 49 (4) : 311—321. (Iartseva N. M., Fedortseva R. F., Artsybasheva I. V. 2007. Chromosomal rearrangements and their effects in spontaneous immortalization and transformation of rat embryonic cells *in vitro*. Cell Tissue Biol. 1 : 259—271.)

Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф., Арцыбашева И. В., Игнатова Т. Н. 1994. Цитогенетический анализ клеток спонтанно трансформированной линии крысы LRec-1. I. Перестройки хромосом, выявляемые на ранних стадиях трансформации эмбриональных клеток крысы *in vitro*. Цитология. 36 (12) : 1213—1224. (Iartseva N. M., Artsybasheva I. V., Fedortseva R. F., Ignatova T. N. 1994. Cytogenetic analysis of cells of rat spontaneously transformed cell lines LREC. I. The chromosome rearrangements

revealed at early stages of transformation of rat normal embryonic fibroblasts *in vitro*. Tsitologiya. 36 : 1213—1224.)

Adamovic T., Hamta A., Roshani L., Lu X., Rohme D., Helou K., Levani K. K., Levani G. 2008. Rearrangement and allelic imbalance on chromosome 5 leads to homozygous deletions in the CDKN2A/2B tumor suppressor gene region in rat endometrial cancer. Cancer Genet. Cytogenet. 184 : 9—21.

Adamovic T., Trosso F., Roshani L., Andersson L., Petersen G., Rajaei S., Helou K., Levani G. 2005. Oncogene amplification in proximal part of chromosome 6 in rat endometrial adenocarcinoma as revealed by combined BAC/PAC FISH, chromosome painting, Zoo-FISH, and allelotyping. Gene Chromosomes Cancer. 44 : 139—153.

Au W., Soukup S. W., Mandybur T. I. 1977. Excess chromosome # 4 in ethylnitrosourea-induced neurogenic tumor lines of the rat. J. Nat. Cancer Inst. 59 : 1709—1716.

Baylin S. B., Fearon E. R., Vogelstein B., de Bustros A., Sharkis S. J., Burke P. J., Staal S. P., Nelkin B. D. 1987. Hypermethylation of the 5' region of the caltintonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. Blood. 70 : 412—417.

Baylin S. B., Jones P. A. 2010. Эпигенетические детерминанты при раковых заболеваниях. В кн.: Эпигенетика. Ред. Эллис С. Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. М.: Техносфера. 445—464.

Barr F. G. 2001. Gene fusion involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. Oncogene. 20 : 5736—5746.

Berdichevskii F. B., Garanina N. M., Shvets Iu. P., Sustero-vich I. I., Chumakov I. M. 1986. Evolutionary variants of the *mos* gene. Mol. Biol. (Moscow). 20 : 536—545.

Bonde P., Sui G., Dhara S., Wang J., Broor A., Kim I. F., Wiley J. E., Marti G., Duncan M., Jaffee A., Montgomery E., Maitra A., Harmon J. W. 2007. Cytogenetic characterization and gene expression profiling in the rat reflux-induced esophageal tumor model. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 133 : 763—769.

Brett J. G., Godman G. C., Miller D. F. 1986. Phenotypic and karyotypic transition in the spontaneous transformation of a rat cell line. Tissue and Cell. 18 : 27—49.

Charytonowicz E., Cordon-Cardo C., Matushansky I., Ziman M. 2009. Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell? Cancer Lett. 279 : 126—136.

Chen H.-L., Maeda S., Takahashi R., Sugiyama T. 1987. Chromosome marker and enhanced expression of c-Ha-ras in a DMBA-induced erythroleukemia cell line (D5A1). Cancer Genet. Cytogenet. 28 : 301—309.

Chen J., Odenike O., Rowley J. D. 2010. Leukaemogenesis: more than mutant genes. Nature Reviews. Cancer. 10 : 23—36.

Cram L. S., Bartholdi M. F., Ray F. A., Travis G. L., Kraemer P. M. 1983. Spontaneous neoplastic evolution of Chinese hamster cells in culture: multistep progression of karyotype. Cancer Res. 43 : 4828—4837.

Dano L., Guilly M.-N., Muleris M., Morlier J.-P., Altmeyer S., Vielh P., El-Naggar A. K., Monchaux G., Dutrillaux B., Chevillard S. 2000. CGH analysis of radon-induced rat lung tumors indicates similarities with human lung cancers. Genes, Chromosomes, Cancer. 29 : 1—8.

Daser A., Rabbits T. H. 2004. Etending the repertoire of the mixed-leukaemia gene in leukaemogenesis. Genes and Development. 18 : 965—974.

Douglass E. S., Shapiro D. N., Valentine M., Rowe S. T., Carroll A. G., Raney R. B., Ragab A. H., Abella S. M., Parham D. M. 1993. Alveolar rhabdomyosarcoma with the t(2;13) : cytogenetic finding and clinicopathologic correlations. Med. Pediatr. Oncol. 21 : 83—87.

Edwards P. A. W. 2010. Fusion genes and chromosome translocations in the common epithelial cancer. J. Pathol. 220 : 244—254.

Epstein J. A., Lam P., Jepeal L., Maas R. L., Shapiro D. N., 1995. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. J. Biol. Chem. 270 : 11 719—11 722.

Foudah D., Redaelli S., Donzelli E., Bentivegna A., Miloso M., Dalpra L., Tredici G. 2009. Monitoring the genomic stability of *in*

*vitro* cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chrom. Res.* 17 : 1025—1039.

Funaki K., Everitt J., Bermudez E., Walker C. 1991. Trisomy of rat chromosome 1 associated with mesothelial cell transformation. *Cancer Res.* 51 : 4059—4066.

Gang E. J., Bosnakovski D., Simsek T., To K., Perlingeiro R. C. 2008. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. *Exp. Cell Res.* 314 : 1721—1733.

Gil-Benso R., Martinez-Lorente A., Pellin-Perez A., Navarro-Fos S., Gregori-Romero M. A., Carda C., Callaghan R., Peydro-Olaya A., Lombart-Bosch A. 2001. Characterization of a new rat cell line established from 2'AAF-induced combined hepatocellular cholangiocellular carcinoma. *In vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 37 : 17—25.

Godwin A. K., Testa J. R., Handel L. M., Liu Z., Vanderveer L. A., Tracey P. A., Hamelton T. C. 1992. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implication of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 84 : 592—601.

Goldstein M., Meller I., Issakov J., Orr-Urtreger A. 2006. Novel genes implicated in embryonal, alveolar and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumor. *Neoplasia.* 8 : 332—343.

Gordon A., McManus A., Anderson J., Fisher C., Abe S., Nojima T., Pritchard-Jones K., Shipley J. 2003. Chromosomal imbalances in pleomorphic rhabdomyosarcomas and identification of the alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX-FOXO1. A fusion gene in one case. *Cancer Genet. Cytogenet.* 140 : 73—77.

Hachitanda Y., Toyoshima S., Akazawa K., Tsuneyoshi M. 1998. *N-myc* gene amplification rhabdomyosarcoma detected by fluorescence *in situ* hybridization: its correlation with histological features. *Mod. Pathol.* 11 : 1222—1227.

Hanta A., Adamovic T., Helou K., Levan G. 2005. Cytogenetic aberrations in spontaneous endometrial adenocarcinoma in the BDII rat model as revealed by chromosome banding and comparative genome hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 159 : 123—128.

Heim S., Mitelman F. 1989. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. *Cancer Res.* 52 : 1—44.

Heim S., Mitelman F. 2009. Nonrandom chromosome abnormalities in cancer — an overview. In: *Cancer cytogenetics*. Wiley-Blackwell. 25—43.

Herens C., Alvarez Gonzalez M. N., Barbason H. 1992. Cytogenetic changes in hepatocarcinomas from rats treated with chronic exposure to diethylnitrosamine. *Cancer Genet. Cytogenet.* 60 : 45—52.

Holocek B. U., Kerler R., Rabes H. M. 1989. Chromosomal analysis of a diethylnitrosamine-induced tumorigenic and nontumorigenic rat liver cell line. *Cancer Res.* 49 : 3024—3028.

Ichikawa T., Kyprianou N., Isaacs J. T. 1990. Genetic instability and the acquisition of metastatic ability by rat mammary cancer cells following *v-H-ras* oncogene transfection. *Cancer Res.* 50 : 6349—6357.

Johansson B., Harrison C. J. 2009. Acute myeloid leukemia. In: *Cancer cytogenetics*. Wiley-Blackwell. 45—141.

Karlsson A., Helou K., Walentinsson A., Hedrich H. J., Szpiller C., Levan G. 2001. Amplification of *Mycn*, *Ddx1*, *Rrm2*, and *Odc1* in rat uterine endometrial carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 31 : 345—356.

Kato H., Nishida J., Honda T., Miyamoto S., Fujinaga K., Wake N. 1992. Chromosome alterations contribute to neoplastic progression of transformed rat embryonal fibroblasts. *Cancer Genet. Cytogenet.* 58 : 39—47.

Kerler R., Rabes H. M., 1996. Karyotype evolution of the clonal rat liver cell line CL 52 during progression *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Genet. Cytogenet.* 87 : 140—147.

Klein G. 1989. Multiple phenotypic consequences of the Ig/Myc translocation in B-cell-derived tumor. *Genes Chrom. Cancer.* 1 : 3—8.

Krishnaveni L., Gosh S. N. 1996. Implication of involvement of rat chromosome # 2 in spontaneous transformation of the Rat-2 cell line. *Cell Biol. Int.* 20 : 331—334.

Lee Y. S., Bigner S. S., Eng L. F., Molnar P., Kuruvilla A., Groothuis D. R., Bigner D. D. 1986. A glial fibrillary acidic protein-expressing and tumorigenic cell line derived from an avian sarcoma virus-induced rat astrocytoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 45 : 704—720.

Levan G., Mitelman F. 1975. G-band analysis in a serially transplanted Rous rat sarcoma. *Hereditas.* 80 : 140—145.

Li Q. X., Liu C. X., Chun C. P., Chang B., Li X. X., Chen Y. Z., Nong W. X., Li H. A., Li F. 2009. Chromosomal imbalances revealed in primary rhabdomyosarcomas by comparative genomic hybridization. *Chin. Med. J.* 122 : 1277—1282.

Lu X. C., Montelius-Alatalo K., Helou K., Klinga-Levan K., Islam Q., Levan G., Rohme D. 1997. Isolation of DNA markers for the Rat Sai1 gene for suppression of anchorage independence by using representational difference analysis. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23 : 63—74.

Maeda S., Uenaka H., Ueda N., Shiraishi N., Sugiyama T. 1980. Establishment and chromosome studies of *in vitro* lines of chemically induced rat erythroblastic leukemia cells. *JNCI.* 61 : 539—546.

Mamaeva S. E. 1998. Karyotypic evolution of cells in culture: a new conception. *Int. Rev. Cytol.* 178 : 1—40.

Mandahl N., Mertens F. 2009. Soft tissue tumor. In: *Cancer cytogenetics*. Wiley-Blackwell. 675—713.

Manolova Y., Manolov G., Keiler J., Levan A., Klein G. 1979. Genesis of the 14q+ marker in Burkitt's lymphoma. *Hereditas.* 90 : 5—10.

Mitelman F., Levan G. 1986. Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5,345 cases. *Hereditas.* 104 : 113—119.

Mitelman F. 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat. Res.* 462 (Issues 2—3) : 247—253.

Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Rev. Cancer.* 7 : 233—245.

Mitelman F., Johansson B., Mertens F. 2008. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. Available at <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/MitelmanHYPERLINK>

Nicholson J. M., Dusberg P. 2009. On the karyotypic origin and evolution of cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 194 : 96—110.

Nowell P. S. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. *Science.* 194 : 23—28.

Ohgaki H., Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 100 : 2235—2241.

Olney H. J., Le Beau M. M. 2009. Myelodysplastic syndromes. In: *Cancer cytogenetics*. Wiley-Blackwell. 141—179.

Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.

Pear W. S., Ingvarsson S., Steffen D., Mönke M., Francke U., Bazin H., Klein G., Samegi J. 1986. Multiple chromosomal rearrangements in a spontaneously arising t(6;7) rat immunocytoma juxtapose *c-myc* and immunoglobulin heavy chain sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83 : 73—76.

Peterson L. F., Zhang D. E. 2004. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene.* 23 : 4255—4262.

Popescu N. C., Greiner J. W. 1999. Recurrent alterations of short arm of chromosome 3 define a tumor suppressor region in rat mammary tumor cells. *Carcinogenesis.* 20 : 2033—2036.

Pories S., Jaros K., Steele G., jr., Pauley A., Summerhays I. C. 1992. Oncogene-mediated transformation of fetal rat colon *in vitro*. *Oncogene.* 7 : 885—893.

Ray F. A., Bartholdi M. F., Kraemer P. M., Cram L. S. 1986. Spontaneous *in vitro* neoplastic evolution: recurrent chromosome changes of newly immortalized Chinese hamster cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 21 : 35—53.

Ren Y. X., Finckenstein F. G., Abdueva D. A., Shahbazian V., Chung B., Weinberg K. I., Triche T. J., Shimada H., Anderson M. J. 2008. Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form

alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Res.* 68 : 6587—6597.

Rocco J. W., Sidransky D. 2001. P16 (MTS-1/CDKN2/INKa) in cancer progression. *Exp. Cell Res.* 264 : 42—55.

Roschke A. V., Tonon G., Gehlhaus K. S., McTyre N., Bussey K. J., Lababidi S., Scudiero D. A., Weinstein J. N., Kirsch I. R. 2003. Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel. *Cancer Res.* 63 : 8634—8647.

Rowley J. D. 1973. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 243 : 290—293.

Rowley J. D., 1990. The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer.* 65 : 2178—2184.

Sandberg A. 1982. Chromosomal changes in Human cancer: specificity and heterogeneity. In: *Tumor cell heterogeneity.* Baltimore: Acad. Press. 373—397.

Santarius T., Shipley J., Brewer D., Stratton M. R., Cooper C. S. 2010. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature Reviews. Cancer.* 10 : 59—64.

Sato H., Yoshida M. S., Sasaki M. 1989. Resolution chromosome banding in the Norway rat, *Rattus norvegicus.* *Cytogenet. Cell Genet.* 50 : 151—154.

Sherr C. J. 1998. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Develop.* 12 : 2984—2991.

Shimizu T., Kato M. V., Nikaido O., Suzuki E. 1995. A specific chromosome change and distinctive transforming genes are necessary for malignant progression of spontaneous transformation in cultured Chinese hamster embryo cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 86 : 546—554.

Stevens J. W., Patil S. R., Jordan D. K., Kimura J. H., Morcuende J. A. 2005. Cytogenetics of Swarm rat chondrosarcoma. *Iowa Orthop. J.* 25 : 135—140.

Takahashi R., Mihara K., Maeda S., Yamaguchi T., Chen H.-L., Aoyama N., Murao S.-I., Hatanaka M., Sugiyama T. 1986. Secondary activation of c-abl may be related to translocation to the nucleolar organizer region in an *in vitro* cultured rat leukemia cell line (K3D). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83 : 1079—1083.

Taylor B. S., Barretina J., Maki R. G., Antonescu C. R., Singer S., Ladanyi M. 2011. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nature Reviews. Cancer.* 11 : 541—557.

Teixeira M. R., Heim S. 2009. Tumor of the male genital organs. In: *Cancer cytogenetics.* Wiley-Blackwell. 557—577.

Wiener F., Babonits M., Spira J., Bazin H. 1982. Nonrandom chromosomal changes involving chromosome 6 and 7 in spontaneous rat immunocytomas. *Int. J. Cancer.* 20 : 231—239.

Yartseva N., Komissarova E., Zhurbitskaya V., Kisseleva N., Kisselev F. 1997. Cytogenetic analysis of rat cells transformed by human papilloma virus genes. *Oncology Report.* 4 : 629—635.

Zhang S., Zech L., Klein G. 1982. High-resolution analysis of chromosome markers in Burkitt lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 29 : 153—157.

Zhou G.-N., Ljungdahl S., Ruyhme D., Levan G., Shoshan M. C., Linder S. 1997. Co-deletion of the Gun proto-oncogene and the CDKN2A Tumor-suppressor gene in HRAS-transformed rat embryo fibroblast cell lines. *Genes Chrom. Cancer.* 20 : 82—89.

Поступила 3 IX 2013

#### FEATURES OF RAT CELLS KARYOTYPIC ABNORMALITIES IN RAT CELLS IN THEIR TRANSFORMATION *IN VITRO*

N. M. Yartseva,<sup>1,\*</sup> R. F. Fedortseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS and <sup>2</sup> FSBI «The A. M. Nikiforov Russian Center for Emergency and Radiation Medicine» EMERCOM of Russia, St. Petersburg;

\* e-mail: Yartseva@mail.cytspb.rssi.ru

Neoplastic transformation of cells is characterized by karyotypic abnormalities involving aneuploidy, quantitative changes, as well as multiple clonal rearrangements of the number and structure of chromosomes. It is probable that chromosomes are one of the mechanisms of cells immortalization and transformation. Despite many years of study of chromosomal rearrangements, data on primary chromosomal rearrangements in early stages of transformation is still insufficient. We examined karyotypic abnormalities in embryonic rat fibroblasts in both the spontaneous transformation and transformation by oncogenes at different passages *in vitro*. Literature data and results of our cytogenetical analysis of rat cells lines established by different methods of transformation of cells of different tissue origin *in vitro* have shown that cell karyotype at early passages may either be normal or acquire diverse clonal chromosomal abnormalities. At later passages, other chromosomes of karyotype are involved in new rearrangements. Despite this, some of the lines do not acquire the malignant phenotype and remain to be immortalized. The role of instable chromosomes and their loci in immortalization and transformation of cells is discussed.

Key words: chromosomal rearrangements, karyotype, cell lines, transformation.