

Cytogenetyka nowotworów w pierwszej kolejności ma za zadanie identyfikację aberracji chromosomowych typowych dla danej choroby lub jej etapu. Drugim etapem badań jest określenie przydatności aplikacyjnej ustaleń cytogenetycznych. W kolejnym etapie badań własnych nad cytogenetyką płaskonabłonkowych nowotworów krtani z wykorzystaniem linii komórkowych podjęto próbę ustalenia struktury chromosomów uprzednio opisywanych jako chromosomy markerowe, a więc o nieustalonym pochodzeniu. Posługiwano się techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization – FISH) z wykorzystaniem molekularnych sond „malujących”. Pochodzenie pięciu chromosomów markerowych zinterpretowano w następujący sposób: jeden chromosom okazał się izochromosomem, złożonym z krótkich ramion chromosomu 5 [i(5p)]; trzy dalsze były wynikiem translokacji niezrównoważonych pomiędzy chromosomami 2 i 17 [der(2)t(2,17)], chromosomami 12 i 21 [der(12)t(12,21,?)], chromosomami 5 i 11 z dodatkową duplikacją fragmentu długiego ramienia chromosomu 11 [der(11)t(5,11)(q14,q24)dup(11)(q23q24)]. Piąty zidentyfikowany chromosom markerowy był wynikiem rzadkiej w nowotworach translokacji zrównoważonej [t(13,15)(p21q12)]. Uzyskane ustalenia cytogenetyczne w większości przypadków, zwłaszcza wobec izochromosomu i(5p), mają analogie w wynikach innych zespołów. Wszystkie rearanżacje dowodzą niestabilności materiału genetycznego w raku krtani, zwłaszcza regionu centromerowego.

**Słowa kluczowe:** chromosomy markerowe, technika FISH, płaskonabłonkowy rak krtani.

# Zastosowanie techniki FISH do ustalenia pochodzenia chromosomów markerowych występujących w komórkach linii wyprowadzonych z nowotworów krtani

*Application of the FISH technique to identify marker chromosomes detected in cell lines derived from laryngeal cancer*

Małgorzata Jarmuż<sup>1</sup>, Krzysztof Szyfter<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

<sup>2</sup>Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Akademia Medyczna w Poznaniu

## WSTĘP

W komórkach nowotworowych występują liczne anomalie liczby i struktury chromosomów, co implikuje nieprawidłowy przekaz informacji genetycznej. Zjawisko to jest dobrze rozpoznane w chorobach nowotworowych układu krwionośnego. Wiedza na temat aberracji chromosomowych guzów litych pozostaje jednak ograniczona ale ze względu na możliwości jej wykorzystania w kierunku diagnostycznym jest przedmiotem intensywnych badań [1–3]. W przypadku nowotworów głowy i szyi kierunek badań wyznaczyła hipoteza sformułowana w zespole D. Sidransky'ego (Baltimore, USA), łącząca przebieg choroby nowotworowej z progresywnym profilem uszkodzeń chromosomów, które próbuje się powiązać z określonymi etapami choroby nowotworowej głowy i szyi [4].

W badaniach własnych skupiono się na etapie przechodzenia nowo-

tworów krtani do stadium przerzutów. Analiza pierwotnego materiału klinicznego uzyskanego w wyniku laryngektomii wykazała klonalny charakter przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych [5], powtarzalność profilu delecji materiału genetycznego w guzach przerzutuujących i nieprzerzutuujących [6] oraz udział delecji fragmentu chromosomu 13 zawierającego gen *Rb* w przechodzeniu guza w fazę przerzutowania [7]. Jednocześnie do badań prowadzonych wspólnie z Kliniką Otolaryngologii Uniwersytetu w Turku (Finlandia) wykorzystano zestaw kilkunastu linii komórkowych wyprowadzonych z nowotworów krtani o zróżnicowanej charakterystyce klinicznej i histologicznej. Określenie kariotypów tych linii, traktowanych jako model progresji nowotworów krtani pozwoliło na powiązanie części aberracji chromosomowych z przebiegiem choroby [8, 9]. W kariotypach linii

A primary goal of cancer cytogenetics is to identify chromosomal aberrations typical for a given type of cancer or its stage. Only then is it possible to work on the clinical application of laboratory findings. Our own interest in cytogenetics of laryngeal squamous cell carcinoma was focused within this study on the structure identification of marker chromosomes already established in the cell lines derived from laryngeal cancer. The origin of marker chromosomes is by definition unknown. The fluorescence in situ hybridization (FISH) technique with the use of molecular painting probes was applied. The origin of five chromosomes previously described as marker chromosomes was explained as follows: the first marker chromosome was identified as isochromosome composed of short arms of chromosome 5 [i(5p)]. The next three marker chromosomes resulted from unbalanced translocations between chromosomes 2 and 17[der(2)t(2,17)], chromosomes 12 and 21[der(12)t(12,21,?)] and chromosomes 5 and 11 with additional duplication of a fragment of a long arm of chromosome 11[der(11)t(5,11)q(q14, q24)dup(11)(q23q24)]. Finally, a balanced translocation between chromosomes 13 and 15 was found to be the cause for the formation of the fifth marker chromosome [t(13,15)(p21.q12)]. A balanced translocation is a rare case in solid tumors. The identified marker chromosomes were mostly already described in head and neck tumors and i(5p) is relatively frequent. The found chromosome alterations provide a further proof for instability of genetic material in laryngeal cancer, reaching its peak in the centromere region.

Key words: marker chromosomes, FISH technique, laryngeal squamous cell carcinoma.

komórkowych rozwiązanych za pomocą wybarwienia prążkowego oraz techniką fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH) stwierdzano obecność licznych nieprawidłowych chromosomów, powstających w wyniku rearanżacji materiału genetycznego, które w części można było powiązać z progresją nowotworów. W niektórych kariotypach stwierdzano jednak obecność nietypowych chromosomów określanych jako chromosomy markerowe. Rozwikłanie kolejnych chromosomów markerowych równoznaczne z ustaleniem ich pochodzenia było przedmiotem wykonanych badań.

## MATERIAŁY I METODY

Charakterystykę linii komórkowych wyprowadzonych w Klinice Otolaryngologii Uniwersytetu w Turku (Finlandia) oraz metodykę dalszej hodowli opisano uprzednio [9]. Po 9. pasażu pobierano komórki do analizy kariotypu na podstawie rutynowego wybarwienia prążkowego trypsyną i barwnikiem Giemsa (wzór G) i oddzielnie kwinakryną (wzór Q) [9].

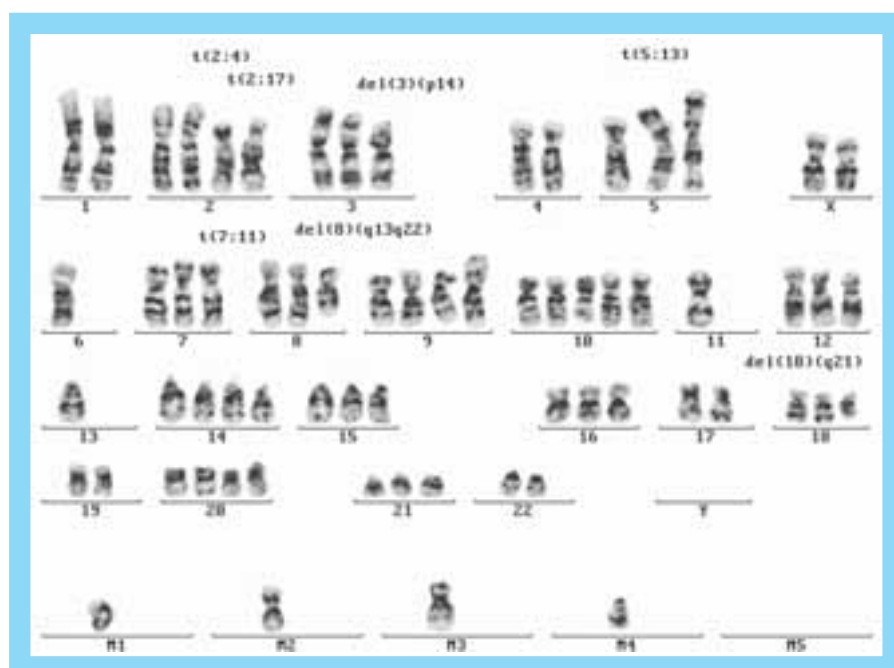
Analizę chromosomów techniką FISH prowadzono wg procedury Pinkela i wsp. [10] z pewnymi modyfikacjami opisanymi uprzednio [9]. Zastosowano następujące sondy DNA:

- ▶ 2 Coatasome (sonda DNA malująca cały chromosom) znakowana digoksygeniną (Oncor),
- ▶ 17 $\alpha$ -satelitarna SpectrumOrange (Vysis),
- ▶ Chromoprobe Multiprobe – System OctaChrome bezpośrednio znakowane (FITC, Texas Red, Aqua) (CytoCell). System pozwala na jednoczesną detekcję sond malujących (po 3 chromosomy na ośmiu polach) do wszystkich 24 chromosomów.

## WYNIKI

Przykładowy kariogram, w którym wykazano występowanie chromosomów markerowych w komórkach linii UT-SCC-22 jest pokazany na ryc. 1.

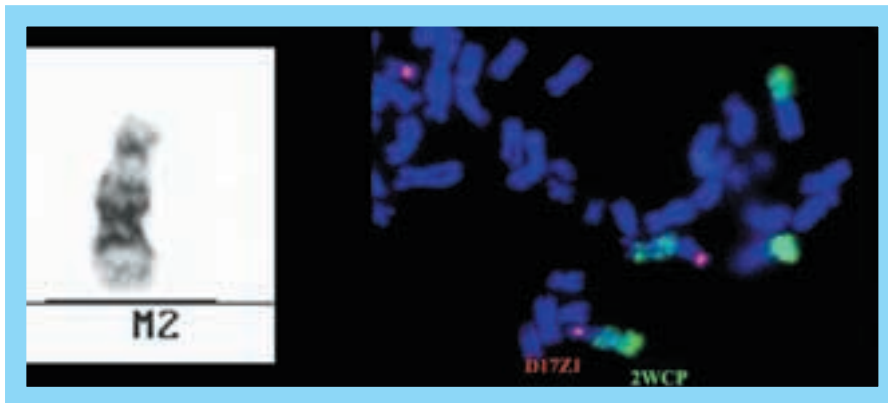
**Chromosom markerowy M1 (38).** Liczba w nawiasie oznacza linię, w której po raz pierwszy zidentyfikowano dany chromosom markerowy. Obecność tego chromosomu stwierdzono w liniach UT-SCC-19A, -29, -34, -38 i 42A. Zastosowanie sond malujących: FITC-green-chromosome 7, Aqua-blue-chromosome 10 i Texas Red-chromosome 5 (System OctaChrome) potwierdziło, że chromosom M1 jest izochromosomem zbudowanym z dwóch par krótkich ramion chromosomu 5 (ryc. 2.), a więc należy go zapisać jako i(5p).



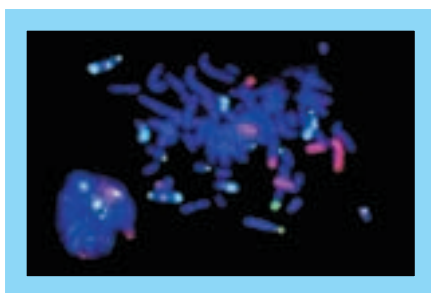
Ryc. 1. Kariotyp komórek linii UT-SCC-22 z widocznym wzorem prążkowym GTG



Ryc. 2. Identyfikacja chromosomu markerowego M1 linii komórkowej UT-SCC-22 jako i(5p)



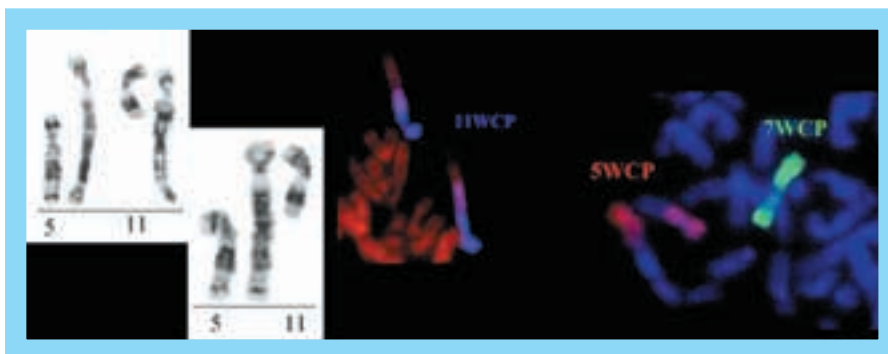
Ryc. 3. Translokacja niezrównoważona rozpoznana za pomocą techniki FISH jako  $der(2)t(2;17)$



Ryc. 4. Translokacja niezrównoważona rozpoznana za pomocą techniki FISH jako  $der(12)t(12,21,?)$

mosom 2 – 2WCP) (ryc. 3.). Zapis:  $der(2)t(2;17)$ .

**Chromosom markerowy M (50).** W wyniku zastosowania sond *malujących*: FITC-green-chromosome 21, Aqua-blue-chromosome 12 i Texas Red-chromosome 8 (System OctaChrome) wykazano, że chromosom powstały z fragmentów chromosomu 12 i 21 zawiera ponadto niezidentyfikowany materiał,



Ryc. 5. Translokacja niezrównoważona rozpoznana za pomocą techniki FISH jako  $der(11)t(5,11)(q14,q24)dup(11)(q23q24)$

**Chromosom markerowy M2 (22).** Chromosom markerowy M2, występujący w linii UT-SCC-22 jest złożony z chromosomu 17, co potwierdza hybrydyzacja z sondą D17Z1 oraz znacznego fragmentu chromosomu 2 (sonda *malująca* cały chro-

który nie pochodzi z chromosomu 6 (ryc. 4.). Zapis:  $der(12)t(12,21,?)$ .

**Chromosom markerowy M1** (42A). Ten duży chromosom markerowy już we wzorze prążkowym GTG wykazywał obecność chro-

somów 5 i 11 (ryc. 5.). Technika FISH z zastosowaniem sond *malujących* chromosomy 5, 7 i 11 wykazała, że środkowa część chromosomu markerowego jest wynikiem duplikacji regionu 11q23-24. Zapis:  $der(11)t(5,11)(q14,q24)dup(11)(q23q24)$ .

### Chromosom markerowy M1 (11).

Mały chromosom markerowy powstał w wyniku, rzadkiej w nowotworach translokacji zrównoważonej pomiędzy chromosomami 3 i 15 (ryc. 6.). Pochodzenie ustalono techniką FISH na podstawie hybrydyzacji z sondami *malującymi* chromosomy 3, 15 i 17 (System OctaChrome). Zapis:  $t(3,15)(p21,q12)$ .

## DYSKUSJA

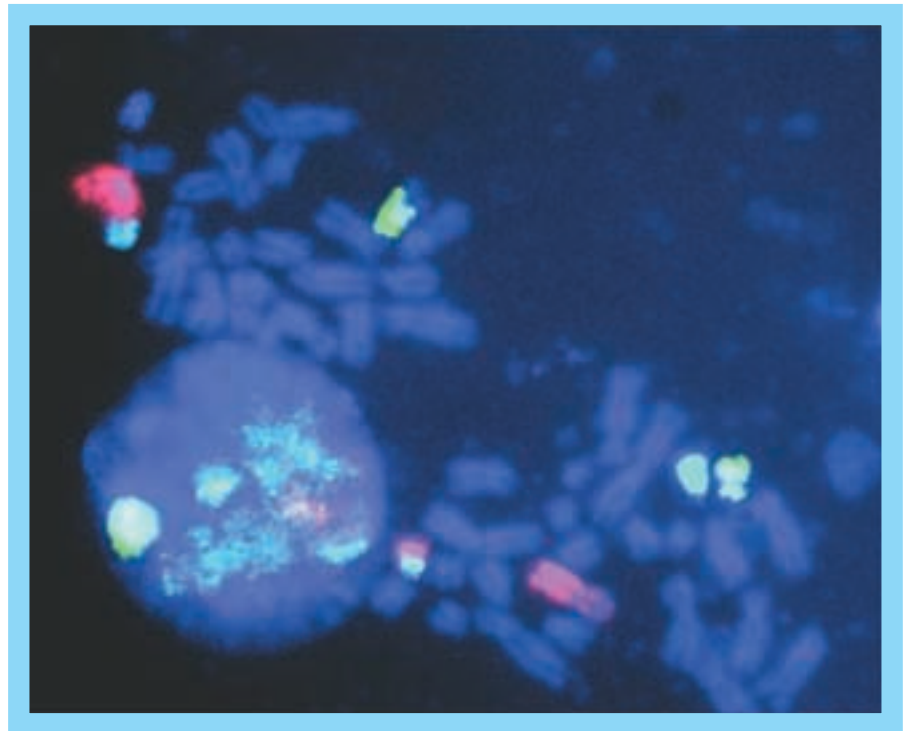
Kariotypowanie komórek guzów litych jest zadaniem trudnym, ale do celów interpretacyjnych musi być doprowadzone do końca, co obejmuje także identyfikację chromosomów markerowych [10]. Pełne opracowanie kariotypu oraz zestawienie go z analogicznymi kariotypami komórek innych nowotworów lub tego samego nowotworu ale o innym zaawansowaniu lub złośliwości albo również odniesienie do czasu przeżycia pozwala na rozwinięcie badań w przynajmniej dwóch kierunkach. Pierwszy nurt pozwala zestawić miejsca rearanżacji chromosomów w lokalizację genów czynnych w procesie kancerogenezy, co nadaje tym badaniom charakter poznawczy. Drugi kierunek zmierza do wyselekcjonowania aberracji chromosomowych o znaczeniu diagnostycznym i prognostycznym, co w znacznym stopniu odpowiada na potrzeby onkologów klinicystów.

Ustalenia dotyczące chromosomów nowotworów głowy i szyi, podobnie jak innych guzów litych, są wynikiem równoległego stosowania cytogenetyki klasycznej i molekularnej, obejmującej techniki wielowariantowej hybrydyzacji *in situ*, porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *comparative genomic hybridi-*

zation – CGH) oraz analizy utraty heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity* – LOH) [3, 10, 11]. Do celów tej pracy uprzednie ustalenia osiągnięte za pomocą cytogenetyki klasycznej oraz techniki CGH uzupełniono o badania techniką FISH z wykorzystaniem odpowiednio dobranych sond malujących. Przydatność linii komórkowych w badaniach progresji nowotworów została już przekonywująco wykazana [8, 12].

Obecność izochromosomu i(5p) opisywano już w nowotworach głowy i szyi [12–14]. Względnie częste występowanie i(5p), i(1q), i(3q) oraz i(8q) oraz translokacji obejmujących regiony centromerowe doprowadziło do sformułowania hipotezy, że główną przyczyną uszkodzeń chromosomów w procesach nowotworowych są właśnie pęknięcia regionów centromerowych [14]. Jednak wcześniejsza sugestia traktująca tworzenie izochromosomów jako wydarzenie drugiego rzędu podczas kancerogenezy wydaje się bardziej prawdopodobna, bowiem nie udało się powiązać obecności izochromosomów z określonym etapem choroby nowotworowej [15]. Chociaż w badanym materiale obecność i(5p) została wykryta najpierw w liniach wyprowadzonych z materiału pozyskanego od pacjentów z krótkim czasem przeżycia, to później zaobserwowano, że częstość występowania i(5p) była jednakowa we wszystkich liniach, niezależnie od złośliwości histologicznej materiału wyjściowego i czasu przeżycia dawców materiału.

Translokację obejmującą fragmenty chromosomów 3 i 15 wykryto w komórkach jednej z linii badanych w zespole T. Careya [16] oraz w materiale pierwotnym pochodzącym z nowotworu dziąsła [17]. Duplikację regionu 11q23-24 aczkolwiek bez translokacji na chromosom 5 opisuje Ch. Jin i wsp. [17]. Uszkodzenia długiego ramienia chromosomu 11 i ich przydatność prognostyczna są przedmiotem odrębnego opracowania przygotowanego do druku.



Ryc. 6. Translokacja zrównoważona rozpoznana za pomocą techniki FISH jako t(3,15)(p21,q12)

Pozostałych zidentyfikowanych chromosomów markerowych nie odnaleziono w opublikowanych pracach, łącznie z obfitym materiałem cytogenetycznym przedstawionym przez Jin i wsp. [18]. Tę rozbieżność można tłumaczyć albo marginalnością występowania opisanych tutaj aberracji albo faktem, że również publikowane kariotypy zawierają niezidentyfikowane dotąd chromosomy markerowe [13, 14, 18].

Na koniec należy wspomnieć, że badania cytogenetyczne przynoszą wiedzę o regionach chromosomowych szczególnie podatnych na uszkodzenia, co dalej pozwala na korelowanie tej wiedzy z informacjami na temat ekspresji onkogenów i supresorowych genów przeciwnowotworowych [19–21].

#### PIŚMIENICTWO

1. Akervall J, Wennerberg J, Mertens F. *Chromosomal abnormalities in squamous cell carcinoma of the head and neck*. In: *Genetics in Otorhinolaryngology*. K. Kitamura & K. P. Steel (red.), Adv Otorhinolaryngol, Karger, Basel 2000; vol. 56: 261-7.
2. Wysocka B, Limon J. *Znaczenie kliniczne badań cytogenetycznych w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi*. *Otolaryng Pol* 2000; 54: 529-32.

3. Gollin S. *Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas (scc) of the head and neck: window to the biology of disease*. *Head & Neck* 2001; 23: 238-53.
4. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-92.
5. Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K. *Chromosome alterations reflect clonal evolution in scc of larynx*. *Med Sci Monitor* 2002; 8 (7): BR279-BR282.
6. Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K, Knuutila K. *Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma*. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 253-7.
7. Kujawski M, Rydzanicz M, Sarlomo-Rikala M, Szyfter K. *Rearrangement involving the 13q chromosome arm committed to the progression of laryngeal scc*. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 137: 54-8.
8. Jarmuż M, Szyfter K, Grenman R, Golusinski W, Szyfter W. *Przydatność analizy uszkodzeń chromosomów w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów krtani w ocenie przebiegu raka krtani*. *Otolaryng Pol* 2000; 54: 567-72.
9. Jarmuż M, Golusinski W, Grénman R, Szyfter K. *Analysis of chromosome aberrations in cell lines derived from laryngeal cancer in relation to tumor progression*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002; 259: 269-73.
10. Limon J, Mitelman F. *Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka*. *Pat Pol* 1994; 45: 1-15.

11. Bockmühl U, Schlüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. *Chromosomal alterations during metastasis formation of head & neck scc*. Genes Chromos Cancer 2002; 33: 29-35.
12. Carey ThE, Worsham MJ, Van Dyke DL. *Chromosomal biomarkers in the clonal evolution of head & neck squamous neoplasia*. J Cell Biochem 1993; suppl. 17F: 213-22.
13. Jin Y, Mertens F, Jin Ch, Akervall J, Wennerberg J, Gorunova L, Mandahl N, Heim S, Mitelman F. *Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary scc of the head and neck*. Cancer Res 1995; 55: 3204-10.
14. Hermsen MAJA, Joenje H, Arwert F, Welters MJP, Braakhuis BJM, Bagnay M, Westerveld A, Slater R. *Cetromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral scc*. Genes Chromos Cancer 1996; 15: 1-9.
15. Mertens F, Johanson B, Mitelman F. *Isochromosomes in neoplasia*. Genes Chromos Cancer 1994; 10: 221-30.
16. Carey ThE, Van Dyke DL, Worsham MJ. *Nonrandom aberrations and clonal populations in head and neck cancer*. Anticancer Res 1993; 13: 2561-8.
17. Jin Ch, Jin Y, Wennerberg J, Akervall J, Dictor M, Mertens F. *Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in scc of the head and neck*. Cancer Genet Cytogenet 2002; 85-96.
18. Jin Ch, Jin Y, Wennerberg J, Akervall J, Grenthe B, Mandahl N, Heim S, Mitelman F, Mertens F. *Clonal chromosome aberrations accumulate with age in upper aerodigestive tract mucosa*. Mutat Res 1997; 374: 63-72.
19. Field JK. *Genomic instability in scc of the head & neck*. Anticancer Res 1996; 16: 2421-32.
20. Partridge M, Emilion G, Pateromichalakis S, Langdon J. *Location of candidate tumour suppressor gene loci at chromosomes 3p, 8p and 9p for oral scc*. Int J Cancer 1999; 83: 318-25.
21. Weaver DA, Kei TK, Hukku B, DeMuth JP, Crawford EL, McRaven JA, Girgis S, Willey JC. *Localization of tumour suppressor gene candidates by cytogenetic and short tandem repeat analyses in tumorigenic human bronchial epithelial cells*. Carcinogenesis 2000; 21: 205-11.

**ADRES DO KORESPONDENCJI**

dr Małgorzata Jarmuż

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32

60-479 Poznań

tel. 0 (prefiks) 61 823 30 11

faks 0 (prefiks) 61 823 32 35

e-mail: maljar@yahoo.com