

# CITOGENETIKA V ONKOLOGIJI

Nadja Kokač Vokač

Splošna bolnišnica Maribor

## Povzetek

Molekularna citogenetika igra pomembno vlogo v genetiki raka, pri diagnostiki in ugotavljanju specifičnih kromosomskih sprememb. Je eno osnovnih orodij v odkrivanju genov, pomembnih v patogenezi rakastih bolezni. V poznih 80. letih prejšnjega stoletja so se razvile številne tehnike, ki temeljijo na metodi fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH). Najpomembnejše med njimi so interfazni FISH, večbarvni FISH (M-FISH, SKY) in primerjalna genomska hibridizacija (PGH). V zadnjem času pa se uveljavlja tehnologija mikromrež. Digitalna kariotipizacija, PGH na mikromrežah in tehnika oligonukleotidnih mikromrež, so tehnike, ki so prevzele vodilno vlogo v raziskavah raka.

V Laboratoriju za medicinsko genetiko mariborske bolnišnice smo razvili vse osnovne molekularno citogenetske metode, razen čip tehnologije. Molekularne citogenetske tehnike uporabljamo pri diagnostiki levkemij in limfomov ter nekaterih solidnih tumorjih. V tem prispevku je prikazana uporaba FISH-a, interfaznega FISH-a, večbarvnega FISH-a in PHG pri posameznih primerih levkemij. Razpravljamo tudi o pomnožitvah onkogenega Her2 pri diagnostiki raka dojke ter pogostejših kromosomskih preureditvah pri raku mehurja.

## FISH – fluorescenčna in situ hibridizacija

Metode FISH na interfaznih jedrih so prinesle revolucionarno možnost v citogenetski diagnostiki in predvsem v kliničnih aplikacijah. Tehnike temeljijo na edinstveni sposobnosti vezave enojne DNA verige – DNA sonde na komplementarno tarčno mesto v genomu. Sondo vizualiziramo z direktnim označevanjem s fluorokromi konjugiranimi na nukleotide ali indirektno z imunološkim barvanjem molekul biotina oz digoxigenina vezanega na nukleotide. Tarčna sekvenca je vidna tako v metafazi kot v interfazi celičnega ciklusa.

Poznamo tri vrste DNA sond, ki nudijo različne aplikacije: centromerno specifične, lokus specifične in kromosomsko specifične DNA sonde.

Visoka senzitivnost, specifičnost in hitrost FISH preiskav omogoča klinično uporabnost v citogenetiki in patologiji (1,2). Glavna omejitev metode je v detekciji samo specifičnih strukturnih ali številčnih kromosomskih sprememb,

ki pa se da preseči z drugimi tehnikami kot so M-FISH, SKY, CGH in Array-CGH.

## **Specifične kromosomske preureditve in njihova vloga pri diagnostiki levkemij**

Vloga kromosomskih sprememb v patologiji je bolj poznana pri hematoloških malignih stanjih kot pri solidnih tumorjih. Tako uravnotežene kot neuravnotežene kromosomske preureditve so opisane pri različnih malignih stanjih in igrajo specifično vlogo pri razvoju napredovanju bolezni. Predpostavlja se, da imajo uravnotežene spremembe direktno vlogo v onkogenezi, medtem ko so neuravnotežene spremembe bolj posledica sekundarnega napredovanja tumorjev (3).

Posledica uravnoteženih kromosomskih sprememb so pogosto himerični celični proteini, ki imajo ključno vlogo v malignem procesu. Njihova vloga je lahko v stimulaciji celične rasti in tirozin kinazni aktivnosti, kot je v primeru translokacije t(9;22) pri KML, zaradi BCR/ABL fuzije in translokacije t(8;21) pri AML, zaradi AML1/ETO fuzije. Antiapoptotično deluje spremenjena aktivnost BCL2 gena kot posledica t(14;18) pri folikularnem B-celičnem limfomu. V primeru translokacije t(15;17) pa je spremenjeno delovanje PML in RARA proteinov. PML se inaktivira in vodi v izgubo proapoptotične aktivnosti, spremenjeno delovanje receptorja za retinoično kislino pa blokira mieloidno diferenciacijo (4,5,6).

Poleg translokacij so pomembne številčne spremembe, amplifikacije in delecije, ki povzročajo presežke in primanjkljaje v genomu in so vzrok za nekontrolirano proliferacijo. Pri mielodisplastičnem sindromu (MDS) se pri 50% bolnikov pojavljajo delecije 5q- ali primanjkljaji celotnih kromosomov 5 in 7 ter dodatni kromosom 8. Spremembe so z izjemo 5q- vezane na slabo prognozo (7). Pravtako je slab prognostičen znak delecija 17p pri B celični KLL, ki vodi v agresivno obliko bolezni, medtem ko je delecija 13q relativno dober prognostičen znak (8).

Odkrivanje citogenetsko pomembnih klonov je ključno za spremljanje bolezni, terapijo in ugotavljanje relapsa. FISH se uporablja za ugotavljanje uspešnosti terapije pri spremljanju pojavljanja fuzijskih genov ABL/BCR in PML/RARA.

Uporabnost FISH-a se kaže tudi pri drugih vrstah levkemij in limfomov. Tabela 1 prikazuje najpogostejše citogenetske spremembe, ki imajo diagnostično vrednost pri hematoloških malignih stanjih.

## **Solidni tumorji**

Vrednost citogenetske analize pri vrednotenju pojavljanja bolezni se je pokazala tudi pri solidnih tumorjih.

Pri raku mehurja nam diagnostiko karcinoma tranzicijskih celic omogoča določitev številčnih sprememb kromosomov 3, 7 in 17 ter delecije gena p16

**Tabela 1.** Najbolj pogosti in pomembni citogenetski markerji pri levkemijah in limfomih, kjer je FISH metoda izbire za diagnostiko in sledenje bolezni.

t(9;22)(q34;q11.2)		BCR-ABL	Kronična mieloična levkemija
t(8;21)(q22;q22)		AML1/ETO	AML z (8;21) (M2, M4-FAB)
inv(16)(p13q22) t(16;16)(p13q22)	or	CBFb/MYH11	AML (M4Eo-FAB)
t(15;17)(q22;q12)		PML/RARa	APL (M3-FAB)
11q23 rearrangements		MLL	AML z 11q23 nepravilnostmi
5q-		Možen supresorni gen	5q- sindrom: MDS
t(8;14)(q24;q32) t(8;22)(q24;q11) or t(2;8)(p12;q24)	or	c-MYC	Burkitt limfom
t(14;18)(q32;q21)		BCL-2	Folikularni limfom
t(11;14)(q13;q32)		BCL1,cycline D1	Limfom plaščnih celic
t(2;5)(p23;q35)		ALK	T-elični anaplastični limfom

na 9p21 kromosomu. FISH analiza daleč presega pomen drugih testov, vključno s citopatologijo (11).

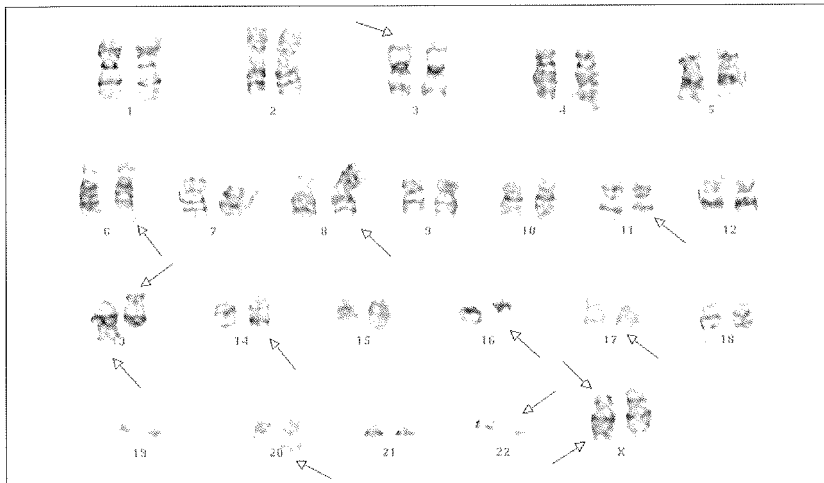
V Laboratoriju za medicinsko genetiko SBM smo v letu 2005 pregledali 36 bolnikov, pri 6-tih smo našli številčne kromosomske spremembe, pri enem pa delecije p16 genov.

Poznana je tudi tesna povezava med Her2/neu gensko amplifikacijo na kromosomu 17q in slabo prognozo pri metastazirani obliki raka dojke. Her2/neu amplifikacija se odlično odziva na specifično terapijo s trastuzumabom (Herceptin), ki je humano protitelo proti Her2 proteinskem receptorju. Bolnice zdravljene z dodatno terapijo s Herceptinom kažejo dober odgovor in visoko preživetje. Zato je zgodnje ugotavljanje Her2/neu amplifikacij bistveno pri prognozi in zdravljenju bolezni. Prednost FISH-a pred imunohistokemično analizo (ICH) pa je v visoki specifičnosti in senzitivnosti metode, saj po ICH dobimo visok odstotek lažno pozitivnih in tudi lažno negativnih primerov. V našem laboratoriju smo v letu 2005 testirali 64 ICH 2+ pozitivnih primerov in potrdili Her2 amplifikacijo le pri 21-tih.

## M-FISH (Multicolour FISH)

Poleg klasične FISH tehnike so se razvile številne druge metode, ki izhajajo iz FISH-a in omogočajo dodatne aplikacije. M-FISH uporablja tehniko označevanja celotnih kromosomov. S kombinacijo 5 različnih barvil lahko dosežemo diferencialno označevanje vsakega kromosoma z drugo barvo in simultano analizo vseh kromosomov. M-FISH se uporablja za analizo marker kromosomov, derivativnih kromosomov in kompleksnih kariotipov. Omejitve tehnike so v resoluciji subtilnih delecij in amplifikacij, nezmožnosti odkrivanja intrakromosomskih inverzij in insercij (13,14,15). Z M-FISH je bilo odkritih nekaj diagnostično pomembnih preureditev, kot je t(5;11) pri 7% otroških AML (16). Resnič-

na vrednost M-FISH-a je v analizi kompleksnih kariotipov, kot je primer pacienta AL (Slika 1), ki smo ga analizirali v našem laboratoriju s pomočjo Ochtachrome Multiprobe Device System (Cytocell), ki uporablja simultano analizo vseh kromosomov s pomočjo kombinacije treh različno obarvanih kromosomov na 8 poljih.



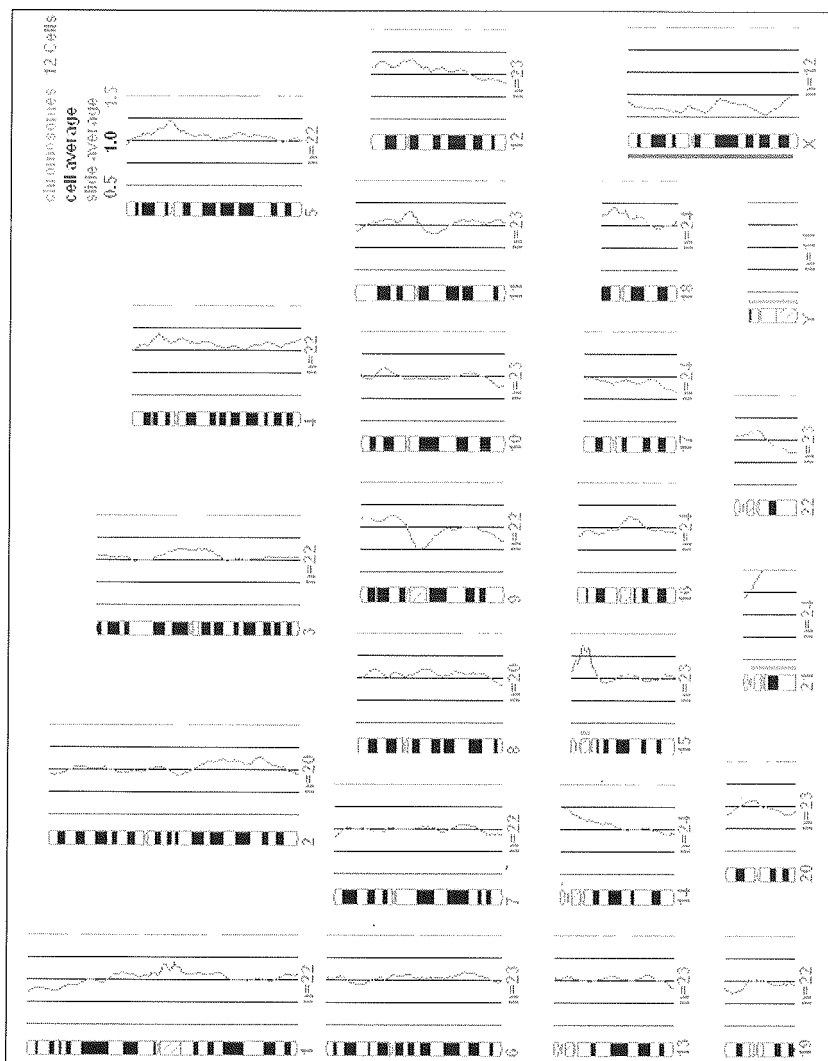
**Slika 1.** Kompleksni kariotip primera akutne levkemije.

46,X,der(X)t(X;3)(q28;p25)t(X;16)(p14;q12),der(3)t(X;3)(q28;p25),der(6)t(X;6)(p14;q25),  
i(8)(q10),del(11)(q14q23),der(13)t(5;13)(q34;p11),der(13)t(13;14)(q22;q11),inv(14)(q11q32),der(16)t(X;16)(q28;q12),r(17)(p13q21),der(20)t(17;20)(q21;q13),22p+.

## PGH – primerjalna genomna hibridizacija

Možnost primerjave patološkega DNA z normalno DNA na normalnih kromosomih je prelomnega pomena v molekularno-citogenetskih tehnikah. To nam omogoča primerjalna genomna hibridizacija (17). Princip, ki ga PGH uporablja je tudi osnova za najnovejše tehnike mikromrež (array-CGH).

PGH je robustna FISH metoda, ki omogoča analizo celotnega genoma v smislu ugotavljanja presežkov in primanjkljajev, vendar z omejeno resolucijo (2-10 Mb). Prednost metode pred ostalimi je v tem, da ne potrebujemo več deljivih celic in slike patoloških kromosomov. Analiza se dela na testnih normalnih kromosomih kamor hibridiziramo različno obarvano testno in referenčno DNA, ki tekmujeta za vezna mesta. Razlika v barvi hibridizacije ter računalniška analiza nam omogoči prikaz pomika v desno ali levo na krivulji vzdolž kromosoma in s tem ugotavljanje presežkov oz. primanjkljajev v genomu. Področja v genomu z visokim številom amplifikacij so izhodiščna mesta za identifikacijo genov, ki igrajo vlogo v patogenezi (18). Na sliki 2 prikazujemo primer uporabe PGH v našem laboratoriju: analiza bolnika z dendritično levkemijo z visoko amplifikacijo kromosoma 21.



**Slika 2.** Primer PGH profila, ki prikazuje amplifikacijo kromosoma 21 pri bolniku z dendritično levkemijo.

## PGH na mikromrežah (array CGH)

Tehnika PGH je osnova za tehnologijo mikromrež, le da so pri mikromrežah testne kromosome nadomestili čipi s kloni BAC-ov, cDNA ali oligonukleotidov (19), kar omogoča večjo resolucijo, ki je omejena z velikostjo uporabljene sonde. Mikromreže, ki pokrivajo celoten genom vsebujejo klone razporejene

na 1Mbp intervala razdalje. Resolucijo lahko povečamo z visoko-resolucijskimi mikromrežami, ki vsebujejo prekrivajoče se klone BAC-ov (20). Glavna prednost PGH na mikromrežah je v možnosti odkrivanja subtilnih sprememb v celotnem genomu. Prvi rezultati pri analizi limfomov so pokazali kriptične amplifikacije številnih genov (BCL2, CCD1, CCD2, JAK2, FG4MMD2...) (21) ali n.pr. pri AML tandemske duplikacije/amplifikacije MLL gena.

## Zaključek

Maligni fenotip je rezultat vsaj šestih posamičnih sprememb v celici: neodvisnost signalizacije, izguba apoptoze, odpornost do zaviralcev celične rasti, nesposobnost proliferacije, ohranjanje angiogeneze in zmožnost invazije oz. metastaziranja (22). Sposobnost vpogleda nad celotnim biokemičnim dogajanjem v malignih celicah je ključnega pomena v izvajanju terapije. V tabeli 2

**Tabela 2.** Primerjava različnih citogenetskih tehnik

Primerjava različnih citogenetskih tehnik			
Tehnike	Ločljivost	Prednosti	Omejitve
Klasična citogenetika – proganje kromosomov	10Mb	Rutinska laboratorijska praksa. Pregled celotnega genoma.	Potrebna živa kultura celic in metafazni kromosomi.
Matafazni FISH	1-10Mb	Odkrivanje določenih DNA sprememb. Večja ločljivost kot klasična citogenetika.	
M-FISH	2-3 Mb	Najbolj senzitivna od vseh metafaznih analiz. Pregled celotnega genoma.	
PGH	50kb-10Mb	Zelo visoka senzitivnost. Živa celična kultura ni potrebna. Pregled celotnega genoma.	Tehnična zahtevnost. Potrebna visoko kvalitetna DNA. Potrebni visoko kvalitetni testni kromosomi.
Interfazni FISH	50-100 kb	Zelo visoka senzitivnost in specifičnost. Živa celična kultura ni potrebna. Možna analiza na eni celici.	Ni pregleda čez celi genom.
PGH na mikromrežah	40-100kb 3-4 Mb	Višja senzitivnost in specifičnost kot PGH. Genom-wide scan.	Tehnično zelo zahtevna in draga metoda. Zahteva visoko kvalitetno DNA.
FISH na iztegnjeni DNA molekuli	1-5 kb	Zelo natančna analiza genoma.. Ni potrebna živa celična kultura.	Tehnično izredno zahtevna metoda.

je pregled citogenetskih tehnik, ki se trenutno uporabljajo pri analizi raka ter njihovih prednosti in pomankljivosti. Opisane metode so pomemben del v procesu diagnostike in sledenja bolezni. So tudi osnova za analize v bodočnosti pri kompleksnih študijah na ekspresijskih in proteomskih mikromrežah.

## Viri in literatura

1. Kjeldsen E, Kovarrra S. FISH technique, FISH probes and their applications in medicine and biology: an overview. In: FISH Technology. Rautenstrauss B, Liehr T (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 3-50; 2002.
2. Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. *Am.J.Med.genet.* 2002;115:118-124.
3. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. Secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities: balanced rearrangements vs. Genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155-163.
4. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev.Cancer* 2002;2:647-656.
5. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I et al. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of hematology-dependent recombination repair, prolongation of G2/M phase and protection from apoptosis. *Mol.Cell.Biol.* 2002;22:4189-4201.
6. Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia* 2002;16: 1927-1932.
7. Padau RA, McGlynn H. molecular, cytogenetics and genetic abnormalities in MDS and secondary AML. In: *Myelodysplastic Syndromes and Secondary Acute Myelogenous Leukemia.* Rosa A, Mundle S (Eds), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 111-158; 2001.
8. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:1910-1916.
9. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:895-908.
10. Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:97-111.
11. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G et al. Clinical evaluation of a multitarget fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J.Urol.*2002;168:1950-1954.
12. Sauer T, Wiedswag G, Boudjema G, Christensen H, Karensen R. Assessment of Her2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *APMIS* 2003;111:444-450.
13. Speicher MR, Ballard SG & Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*1996;12:368-375.
14. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-497.

15. Jalal SM & Law ME. Utility of multicolor fluorescent in situ hybridization in clinical cytogenetics. *Genetics in Medicine* 1999; 1:181-186.
16. Johansson B., Mertens F, Mitelman F. Primary vs. Secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities: balanced rearrangements vs. Genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155-163.
17. Brown J, Huang J, Greshock J et al. A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia and apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescent in situ hybridization telomere assay. *Blood* 2002;99:2526-2531.
18. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudor D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821.
19. Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37:348-357.
20. Albertson DG, Pinkle D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003;12 (Spec No 2): R145-R152.
21. Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D et al A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3651-3660.
22. Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H, Kientle D, Wrobel G, Barth TF, Nessling M, Moller P, Dohner H, Lichter P, Bentz M. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2003;22:1425-1429.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
24. Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J.Pharmacol.Toxicol. methods* 2000;44:291-300.