

DETECCIÓ DE GUANYS I PÈRDUES DE MATERIAL GENÈTIC EN TUMORS SÒLIDS



TESI DOCTORAL
Gemma Armengol Rosell
2000

DETECCIÓ DE GUANYS I PÈRDUES DE MATERIAL GENÈTIC EN TUMORS SÒLIDS

Memòria presentada per na Gemma Armengol Rosell per assolir el títol de Doctora en Biologia Humana per la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, desembre 1999.

La Dra. M^a Rosa Caballín Fernández, Catedrática de Biologia Animal, i professora del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA

Que na Gemma Armengol Rosell ha realitzat el treball *Detecció de guanys i pèrdues de material genètic en tumors sòlids* per obtenir el Doctorat en Biologia Humana sota la seva direcció.

Aquest treball s'ha realitzat en el Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, desembre de 1999.

Dra M^a Rosa Caballín

Gemma Armengol

És ben veritat que aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajuda de molta gent. A tots, moltíssimes gràcies.

GRÀCIES, GRACIAS, THANK YOU, KIITOS

Mai aquestes paraules havien significat tant per mi.

Gemma

INDEX

1. Introducció	1
1.1. Neoplàsia	1
1.1.1. Oncogens	3
1.1.2. Gens supressors de tumors	6
1.1.3. “Gens mutadors”	7
1.2. Tècniques d’identificació de mutacions genètiques	8
1.3. Tumors de la família Ewing	12
1.4. Càncer de pàncreas	14
2. Objectius	19
3. Material i Mètodes	20
3.1. Material biològic	20
3.2. Extracció de DNA	20
3.3. Hibridació Genòmica Comparada	21
3.3.1. Marcatge de la sonda	21
3.3.2. Hibridació	21
3.3.3. Rentats post-hibridació	22
3.3.4. Anàlisi d’imatges i interpretació dels resultats	23
3.4. Anàlisi estadística	26
3.5. Cultius cel·lulars i anàlisi citogenètica	26
3.6. Southern blot	27
3.6.1. Obtenció i marcatge de la sonda	27
3.6.2. Transferència, hibridació i detecció	27
3.7. Pèrdues d’heterozigositat	29
3.8. Hibridació in situ fluorescent	30
3.8.1. Obtenció de les preparacions	30
3.8.2. Hibridació dual	31
3.8.3. Rentats post-hibridació i detecció del senyal	31

4. Resultats i discussió	34
4.1. Aplicació de la CGH	34
4.2. Optimització de la CGH	35
4.3. Canvis genètics recurrents als ET mitjançant CGH	36
4.4. Estudi d'una mescla de DNAs de tumors de la mateixa entitat clínico-patològica mitjançant CGH	38
4.5. Estudi d'adenocarcinoma de pàncreas per CGH i avaluació de l'amplificació de <i>MYC</i> , <i>FES</i> i <i>IGF1R</i>	39
4.6. Estudi de metàstasis pancreàtiques	41
5. Conclusions	43
Referències	46

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. NEOPLÀSIA

Un dels avenços més importants de la genètica en la passada dècada ha estat la demostració de que el càncer és, en essència, una malaltia genètica. Malgrat això, hi ha dues diferències clau entre el càncer i les altres malalties genètiques. Primer, el càncer és, majoritàriament, causat per mutacions somàtiques, mentre que totes les altres malalties genètiques de mamífers (exceptuant les que impliquen gens mitocondrials) estan causades només per mutacions germinals. Segon, cada neoplàsia individual sorgeix no d'una única mutació, sinó de l'acumulació de varies mutacions adquirides.

Com que cada neoplàsia esdevé a partir d'un únic progenitor cel·lular (creixement clonal) es suposa que les mutacions es produeixen de forma seqüencial sobre gens reguladors del creixement cel·lular en una cèl·lula i els seus descendents. La cèl·lula ha d'acumular un nombre suficient de mutacions per esdevenir maligna, el que li permet envair els teixits circumdants i metastatitzar altres òrgans (aquestes últimes propietats per sí soles distingeixen els tumors malignes dels tumors benignes).

El comportament de les poblacions cel·lulars malignes pot ser descrit en termes Darwinians: variabilitat genètica deguda a mutacions seguida de selecció. Hi ha un equilibri dinàmic mantingut per pressions selectives on qualsevol canvi en el medi ambient del tumor trastornaria l'equilibri de forma que es seleccionaria el perfil genètic més viable.

I és que l'evolució per selecció natural afecta tant a les cèl·lules individuals com a tot l'organisme. Les cèl·lules d'un organisme multicel·lular col·laboren per allò que els és millor, però només en un cert grau. A llarg termini, les cèl·lules deixen descendència i cooperen entre elles per tal de fer un organisme capaç de reproduir-se, i per tant, es pot dir que han desenvolupat un genoma que les programa per cooperar. Malgrat això, a curt termini, si una cèl·lula té una mutació que li confereix un avantatge reproductiu, esdevindrà un clon pròsper. Els seus descendents es faran els amos de l'organisme, sempre i quan no es previngui amb controls que s'hauran desenvolupat seguint els interessos del conjunt de l'organisme.

Així doncs, la neoplàsia és el resultat natural d'aquesta selecció entre les cèl·lules somàtiques. Probablement, la neoplàsia és el pas final normal de qualsevol organisme multicel·lular que viu suficients anys, encara que alguns organismes afortunats aconseguen posposar aquest destí. Durant un bilió d'anys d'evolució, s'han desenvolupat molts mecanismes de control sofisticats, de manera que la neoplàsia resulta només quan es perden varis controls independents. Un dels principals controls d'alt nivell és l'apoptosi, un mecanisme pel qual les cèl·lules potencialment canceroses cometen suïcidi pel que s'anomena mort cel·lular programada. Les cèl·lules canceroses amb èxit han de desenvolupar maneres d'inactivar o d'evitar aquests mecanismes.

El canvi d'una cèl·lula normal a una cèl·lula cancerosa maligna requereix probablement de tres a sis mutacions específiques en una cèl·lula (Vogelstein i Kinzler, 1993). La probabilitat de que una sola cèl·lula experimenti tantes mutacions independents és negligible. Malgrat tot, hi ha dos mecanismes generals que poden fer que la progressió sigui més probable: algunes mutacions afavoreixen la proliferació cel·lular, creant una àmplia població de cèl·lules diana per la següent mutació (Figura 1); algunes mutacions afecten l'estabilitat de tot el genoma, augmentant la taxa de mutació global.

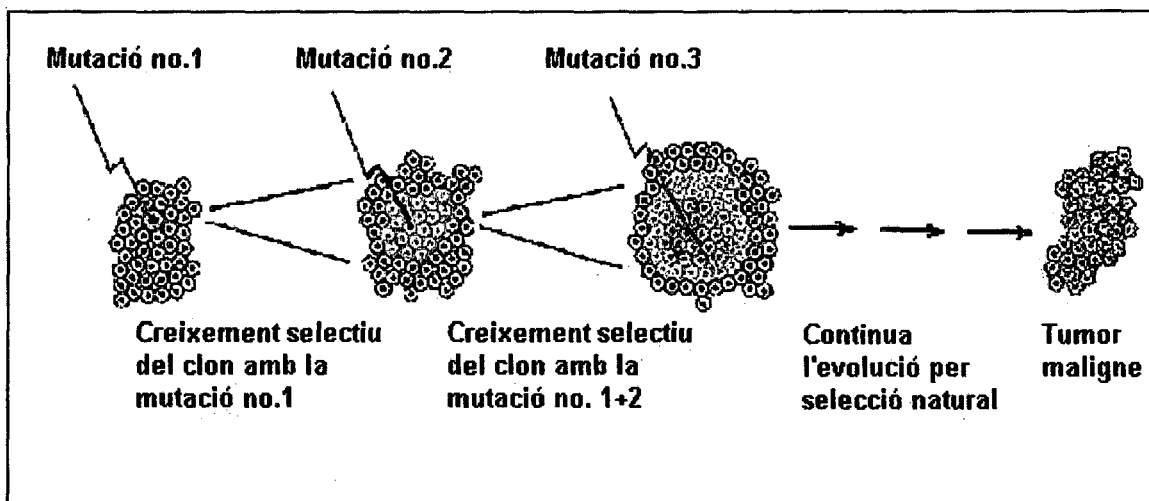


Figura 1. Esquema de l'evolució tumoral afavorida pel creixement selectiu dels clons mutats. Cada mutació successiva confereix a la cèl·lula un avantatge en el creixement de manera que s'extén el clon proporcionant una diana de cèl·lules major per la següent mutació.

Hi ha tres grups de gens que es troben freqüentment mutats en el càncer :

- **Oncogens.** Aquests són gens l'acció dels quals promou positivament la proliferació cel·lular. Les versions normals no mutades s'anomenen pròpiament *proto-oncogens*. Les versions mutades són actives de forma excessiva o inadequada. Un sol al·lel mutat pot afectar el fenotip de la cèl·lula.
- **Gens supressors de tumors.** Els productes d'aquests gens inhibeixen la proliferació cel·lular. Les versions mutades a les cèl·lules canceroses han perdut la seva funció. Ambdós al·lells d'un gen supressor de tumor han d'estar inactivats per canviar el comportament de la cèl·lula.
- **Gens "mutadors".** Són responsables del manteniment de la integritat del genoma i de la fidelitat en la transferència de la informació. La pèrdua de funció d'ambdós al·lells fa que la cèl·lula sigui propensa a l'error. Entre els errors a l'atzar hi pot haver mutacions als oncogens i als gens supressors de tumors.

1.1.1. Oncogens

Els oncogens són versions mutades de gens involucrats en una varietat de funcions cel·lulars normals, relacionades tot sovint amb el cicle cel·lular. La transició d'una cèl·lula de G_0 a l'inici del cicle cel·lular està regulada per unes substàncies anomenades factors de creixement. Diferents tipus de cèl·lules requereixen diferents factors de creixement per estimular la divisió cel·lular. Aquests factors de creixement estimulen les cèl·lules a dividir-se per la unió a receptors específics de factors de creixement en un procés anomenat transducció del senyal. La transducció del senyal és un camí complex amb molts passos des de la membrana cel·lular, a través del citoplasma, fins al nucli, amb bucles de retroalimentació positiva i negativa per aconseguir la correcta proliferació i diferenciació cel·lular.

Els oncogens es poden classificar segons la localització cel·lular i la funció de les proteïnes per les quals codifiquen en el camí de transducció dels senyals (Figura 2):

- factors de creixement secretats (ex. *SIS*) ;
- receptors de la membrana cel·lular, normalment proteïnes amb activitat tirosin quinasa o que tenen dominis tirosin quinasa (ex. *ERBB*, *FMS*);

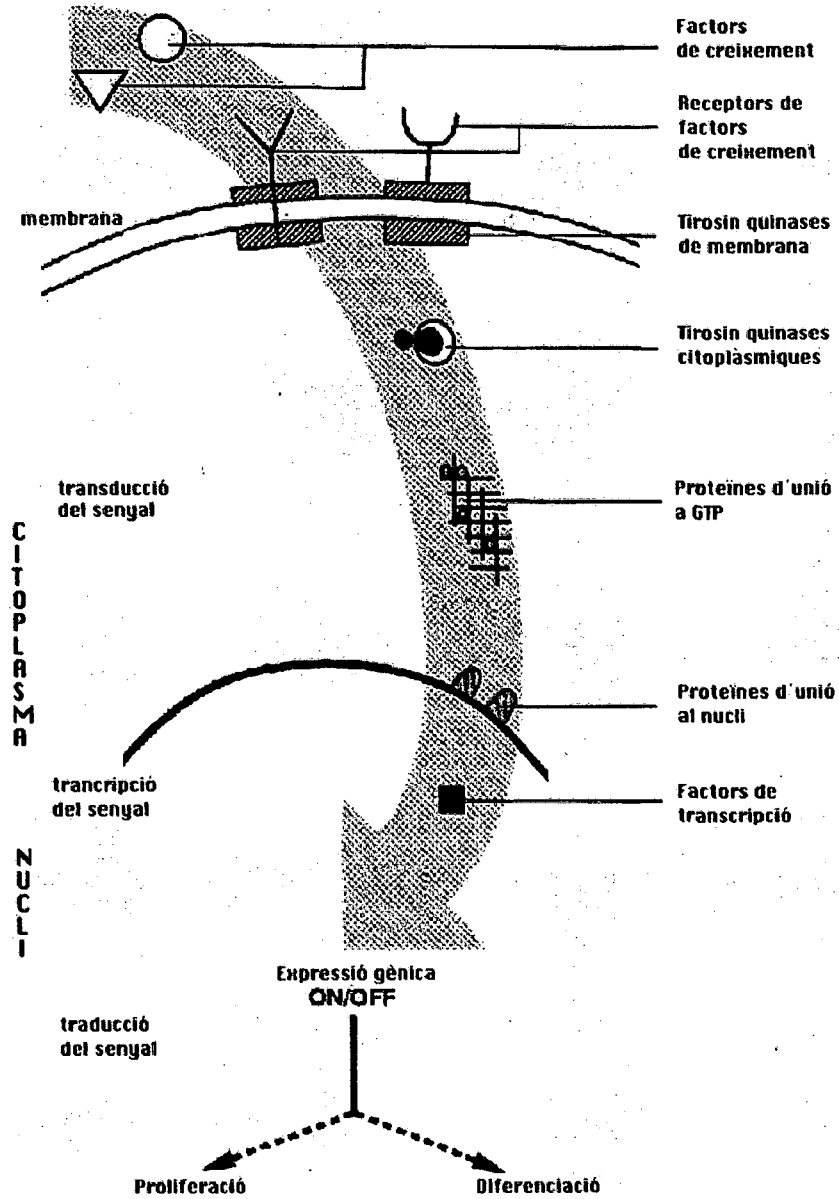


Figura 2. Esquema dels passos de la transducció del senyal i transcripció des de la membrana cel·lular fins al nucli.

- components dels sistemes de transducció de senyals intracel·lulars, que inclouen proteïnes d'unió al GTP associades a proteïnes tirosin quinases (ex. família *RAS*) o proteïnes capaces de fosforilar l'aminoàcid tirosina (ex. *ABL*);
- proteïnes nuclears d'unió al DNA, que inclouen factors de transcripció (ex. *MYC*, *JUN*);
- components de la xarxa de ciclines i quinases dependents de ciclines que governen el progrés a través del cicle cel·lular, per exemple *PRADI* (Kamb, 1995; Müller, 1995). Codifiquen per components dels punts de control del cicle cel·lular, que assegurin l'ordre dels esdeveniments i que integren la reparació del DNA amb la progressió del cicle cel·lular. Aquests gens, quan estan mutats, augmenten la inestabilitat genètica.

L'activació dels oncogens implica un guany de funció. Aquest pot ser quantitatiu (augment en la producció d'un producte inalterat o producció en tipus cel·lulars inadequats) o qualitatiu (producció d'un producte subtilment modificat com a resultat d'una mutació o producció d'un producte nou procedent d'un gen quimèric format a partir d'una reorganització cromosòmica). Aquests canvis són dominants i normalment afecten només a un sol al·lel del gen.

Els mecanismes d'activació dels oncogens poden ser:

- **Amplificació.** Moltes cèl·lules canceroses contenen múltiples còpies d'oncogens normals des del punt de vista estructural. Centenars de còpies extra poden ser presents. És un mecanisme que es sap que confereix una major supervivència quan les cèl·lules s'enfronten a estrès ambiental. En alguns casos, les seqüències de DNA amplificat en cèl·lules tumorals de mamífers, poden ser reconegudes en el cariotip per la presència de material cromosòmic extra separat dels altres cromosomes (diminuts dobles) o com a insercions dins dels cromosomes normals (regions de tinció homogènia, HSRs). Els esdeveniments genètics productors de HSRs poden ser complexos, ja que normalment contenen seqüències derivades de cromosomes diferents (Pinkel, 1994). El resultat de l'amplificació és un gran augment del nivell d'expressió gènica.
- **Mutacions puntuals.** L'oncogenicitat d'alguns proto-oncogens ve donada per mutacions puntuals en la seqüència nucleotídica.

- Gens quimèrics nous produïts per reorganitzacions cromosòmiques (translocacions o inversions). Les translocacions, per exemple, poden unir seqüències genòmiques d'un gen d'un cromosoma a un altre gen d'un altre cromosoma, creant un gen de fusió nou. Aquest gen quimèric és expressat i produeix un enzim amb propietats anormalment transformadores. Els productes d'aquest nous gens són normalment factors de transcripció (o a vegades tirosin quinases) que prenen la seva especificitat de diana d'un dels gens components, i ho aparellen a un domini d'activació o d'unió a lligand de l'altre component.
- Transposició a un domini actiu de cromatina. Algunes translocacions específiques de tumor no creen nous gens quimèrics, sinó que posen l'oncogen en un entorn de cromatina que és transcrit activament en aquell tipus cel·lular i mancat dels mecanismes de control normals. Així l'oncogen és expressat inadequadament a un nivell molt elevat.

1.1.2. Gens supressors de tumors

Al contrari que els oncogens, el gens supressors de tumors són una classe de gens cel·lulars la funció normal dels quals és suprimir la proliferació cel·lular inadequada. Així doncs, són reguladors negatius de la proliferació cel·lular i la seva inactivació per mutació resulta en la pèrdua d'un "fre" crucial en el creixement tumoral. El fet de que les mutacions dels gens supressors de tumors resultin en una pèrdua de funció significa que són recessius a nivell cel·lular. És a dir, com que el defecte en un al·lel pot ser complementat pel producte de l'al·lel normal restant, ambdues còpies del gen supressor de tumor han d'estar inactivades per contribuir a la tumorigènesi. Aquest requeriment ja va ser postulat per Knudson (1971) en el seu estudi de retinoblastoma. Per altra banda, en alguns casos, aquests gens poden presentar un al·lel mutat a la línia germinal, resultant en una predisposició a tumor, de manera que una mutació somàtica posterior, portaria a la iniciació del procés tumoral (Figura 3).

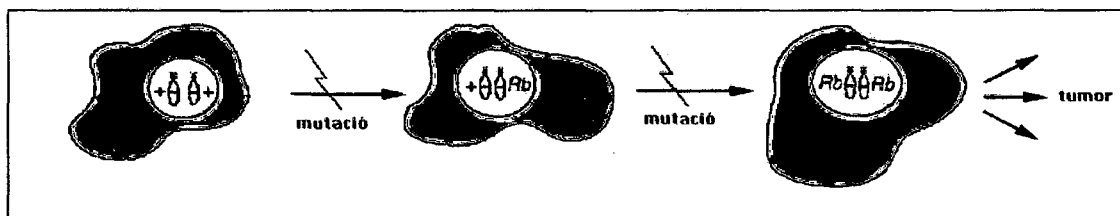


Figura 3. Hipòtesi de Knudson. La primera cèl·lula correspon a una cèl·lula somàtica en una persona normal. La segona correspon a les cèl·lules somàtiques que han sofert una mutació en una persona normal o a totes les cèl·lules somàtiques en una persona amb retinoblastoma familiar. La tercera cèl·lula correspon a una cèl·lula fundadora del tumor.

S'han postulat un nombre de mecanismes per la mutació dels gens supressors de tumors: deleció, pèrdua d'un cromosoma sencer o reorganitzacions estructurals desequilibrades, així com mutacions puntuals que poden resultar en l'acabament prematur de la traducció proteica, conduint a la producció d'una proteïna truncada que ha perdut la seva capacitat funcional.

L'acció bioquímica dels productes gènics dels gens supressors de tumors és més difícil de veure que la funció dels productes dels oncogens. Alguns tenen papers simples, com l'*APC* i el *DCC*, que probablement són molècules d'adhesió cel·lular. Altres estan involucrats en el complex control de la progressió del cycle cel·lular, com a reguladors negatius (inhibidors de les quinases dependents de ciclins).

1.1.3. Gens "mutadors"

Els oncogens i gens supressors de tumors actuen directament sobre els punts de control del cycle cel·lular que funcionen malament en el càncer. En canvi, els gens mutadors tenen un paper general en assegurar la integritat de la informació genètica. Mutacions en aquests gens condueixen a una replicació alterada o a una reparació del DNA ineficaç.

És ben sabut que les cèl·lules canceroses mostren una inestabilitat genètica general. Les cèl·lules tumorals tenen típicament cariotips anòmals, amb múltiples pèrdues, guanys i reorganitzacions cromosòmiques, algunes de les quals semblen no estar connectades directament amb el càncer. Dues malalties, el càncer de colon no polipòsic i l'ataxia telangiectasia, han proporcionat gens sospitosos de

ser els responsables de la inestabilitat a nivell de DNA (ex. *MSH2*, *MLH1*, *ATM*). Els individus portadors de mutacions en aquests gens de reparació de DNA estan predisposats a patir càncer, presumiblement per un augment de la inestabilitat genòmica.

1.2. TÈCNiques D'IDENTIFICACIÓ DE MUTACIONS GENÈTIQUES

El desenvolupament del bandeig cromosòmic ara fa 30 anys (Caspersson i col., 1968) va proporcionar una eina eficaç per l'anàlisi global dels complements cromosòmics. Durant molts anys, la citogenètica ha estat l'únic mètode disponible per analitzar els canvis genètics a la neoplàsia, ja que permet una valoració general dels canvis cromosòmics que s'observen en metafases de preparacions cromosòmiques. Malgrat tot, els estudis cariotípics, en particular de tumors sòlids, estan sovint obstaculitzats per problemes tècnics i metodològics, com per exemple la pobra morfologia dels cromosomes i qualitat dolenta de les bandes, cariotips complexos, i el baix índex mitòtic de les cèl·lules neoplàsiques en cultius de curt termini. A més, els cariotips obtinguts amb patrons de bandes G tot sovint no proporcionen informació dels clons dominants del tumor *in vivo*, probablement degut a la contaminació per cèl·lules no neoplàsiques o a la selecció dels clons amb major capacitat proliferativa en cultiu. S'han publicat pocs articles d'anàlisis citogenètiques de tumors sòlids primaris en comparació amb les leucèmies.

El ràpid desenvolupament de les tècniques d'hibridació *in situ* amb fluorescència (FISH) i la generació de nombroses sondes de DNA específiques de cromosoma han proporcionat noves possibilitats per complementar les tècniques de bandeig cromosòmic (Lichter i col., 1991). Aquestes tècniques han incrementat la capacitat d'identificar aberracions cromosòmiques en rapidesa i precisió (Nederlof i col., 1990; Ried i col., 1992). A més, la citogenètica interfàsica ha permès la valoració d'aberracions cromosòmiques estructurals i numèriques directament en el nucli cel·lular (Lichter i col., 1991). Malgrat això, en l'estudi de mostres tumorals és necessari un coneixement previ de les aberracions esperades per seleccionar el DNA usat com a sonda.

La genètica molecular també ha aportat altres tècniques útils en la recerca de desequilibris genètics en el DNA genòmic. La consistent pèrdua de segments cromosòmics d'origen patern o matern en una població cel·lular tumoral pot ser detectada per pèrdues d'heterozigositat d'al·lels de marcadors de DNA (Bishop, 1987). Els estudis de pèrdua d'heterozigositat (LOH) són un indicador clau de l'existència de gens supressors de tumors. Fent un cribatge de mostres aparellades de sang i tumor amb marcadors espaiats al llarg del genoma, es poden identificar mitjançant la reacció en cadena de la DNA polimerasa (PCR) o per Southern blot, aquelles regions comuns de deleció en les quals poden existir possibles gens supressors de tumors. Alguns d'aquests gens són específics d'un tumor (ex. LOH a 5q21 prop del gen *APC* a càncer de colon), mentre que altres són comuns a molts tumors (ex. LOH a 17p prop del gen *TP53*). Evidentment, si el DNA constitucional (sang) és homozigot per un marcador en particular, aquell marcador no dona informació sobre la pèrdua al·lèlica del tumor. Utilitzant primers específics de seqüències de DNA microsatèl·lit altament polimòrfics es minimitza la proporció de mostres no informatives. Malgrat això, és necessari utilitzar un gran nombre de marcadors polimòrfics. A més, pel que fa a les regions d'amplificació, que són regions candidates per possibles oncogens, la PCR amb marcadors microsatèl·lits dona només informació limitada, degut al caràcter semiquantitatiu de la PCR. En aquest cas és més útil emprar una altra tècnica de biologia molecular: el Southern blot. És un mètode que serveix per detectar i quantificar seqüències de DNA, basat en una hibridació d'àcids nucleics sobre un filtre. Altre cop, però, es necessita conèixer les alteracions per construir les sondes de DNA.

Recentment s'ha desenvolupat una nova estratègia per a detectar guanys i pèrdues de material genètic, tan freqüents a les mostres tumorals. Aquesta tècnica és coneguda com hibridació genòmica comparada (CGH) (Kallioniemi i col., 1992). La CGH, desenvolupada ara fa 7 anys, és la primera eina de citogenètica molecular que permet una anàlisi global del genoma i ha esdevingut una de les tècniques més útils en el cribatge de genomes. La CGH permet detectar canvis en el nombre de còpies de seqüències de DNA, i proporciona un mapa d'aquelles regions cromosòmiques que es guanyen o es perden en el DNA d'una mostra. En genètica clínica, la CGH s'està utilitzant cada

vegada més com a complement a la citogenètica convencional en el diagnòstic de reorganitzacions cromosòmiques desequilibrades, de cromosomes marcadors i en determinar l'origen de material extracromosòmic (diminuts dobles) i de HSRs. La CGH pot identificar en un sol experiment aquelles regions que s'hagin guanyat o amplificat (indicadores de la presència d'oncogens), així com regions delecionades o perdudes (que poden ser indicadores de gens supressors de tumors). Els canvis genètics trobats en les malalties hematològiques són sovint equilibrats, resultant en esdeveniments de reorganització cromosòmica no detectables per CGH. En els tumors sòlids, al contrari, predominen les reorganitzacions genòmiques desequilibrades, especialment en carcinomes, fent d'aquests tumors unes dianes ideals per l'anàlisi per CGH.

A la CGH, que està basada en una hibridació *in situ* modificada, el DNA problema i un DNA de referència normal marcats diferentment (per exemple, verd i vermell, respectivament), són hibridats simultàniament sobre extensions cromosòmiques provinents d'individus normals. Les diferències en el nombre de còpies entre el genoma problema i el de referència es veuen com a diferències en la intensitat de fluorescència verd:vermell. Els guanys de DNA i amplificacions en el DNA problema es veuen com a regions cromosòmiques amb una proporció de fluorescència incrementada, mentre que pèrdues i delecions resulten en una proporció reduïda. La quantificació de les raons de fluorescència del DNA problema respecte el DNA de referència es porta a terme mitjançant un sistema d'anàlisi d'imatges digitals.

Els avantatges de la CGH són que es requereix únicament DNA (en poca quantitat, 1 µg), que pot ser fàcilment obtingut a partir de teixit fresc, congelat o, fins i tot, de teixits arcaics fixats en parafina. No es necessita cultiu ni preparació de metafases de la mostra que s'analitza. A més, no es depèn del coneixement previ de la naturalesa de les aberracions genètiques o de la disponibilitat de les sondes per aquestes regions. Un sol experiment produeix dades de totes les regions del genoma. Però la CGH també té algunes limitacions. Les reordenacions cromosòmiques equilibrades no es poden detectar. No facilita informació del tipus de reordenacions. Com que els desequilibris cromosòmics només poden ser detectats quan estan presents a la majoria de cèl·lules de la mostra, la CGH no pot

ser aplicada per estudiar la variabilitat clonal de les mostres sotmeses a estudi. Però, per altra banda, serveix per distingir desequilibris cromosòmics produïts a l'atzar en unes poques cèl·lules del tumor d'aquelles anomalies majoritàries (du Manoir i col., 1993).

La tècnica està limitada per la resolució de la diana d'hibridació, els cromosomes metafàsics. Els canvis genètics es detecten i es mapen en cromosomes quan la regió cromosòmica afectada sobrepassa les 5-10 Mb. Canvis que afectin regions més petites només són detectables en el cas de que siguin amplificacions d'alt nivell (ex. amplificació de 10 vegades d'1 Mb; Forozan i col., 1997). En molts casos, això ja és suficient per proporcionar un punt d'inici per la recerca de nous gens implicats en el càncer. Així, la CGH és sobretot una eina per identificar aberracions genètiques prèviament desconegudes. Un cop les regions cromosòmiques alterades estan identificades, llavors els mètodes moleculars específics són preferibles. La combinació de la CGH amb altres assajos genètics moleculars és molt útil en el marc de la recerca oncològica. Per exemple, els resultats de la CGH tot sovint mapen canvis genètics a regions cromosòmiques que ja contenen gens coneguts. Així, els mètodes moleculars específics són altament recomanables per validar les troballes de CGH i per proporcionar dades sobre la implicació de gens diana individuals. Per exemple, la FISH, la LOH, i el Southern són de gran utilitat en limitar les regions implicades indicades per CGH, i en senyalar amb precisió gens específics del desenvolupament cancerós. Fins i tot, gràcies a les troballes de la CGH combinada amb la FISH i la seqüenciació gènica, s'han identificat dos nous gens tumorals que prèviament no havien estat mapats (Anzick i col., 1997; Chen i col., 1998).

Les aplicacions de la CGH en genètica del càncer inclouen la caracterització de punts "calents" per reorganitzacions genòmiques desequilibrades, la definició de nous gens implicats en alteracions en el nombre de còpies, l'anàlisi de la progressió i evolució clonal del càncer, així com la subclassificació i l'avaluació pronòstica del càncer.

13. TUMORS DE LA FAMÍLIA EWING

Els tumors de la família Ewing (ET) comprenen el sarcoma d'Ewing, el neuroepitelioma perifèric, l'estesioneuroblastoma i el tumor d'Askin. Pertanyen al grup de tumors malignes de cèl·lules rodones petites blaves. Els ET es caracteritzen per una elevada expressió de la proteïna de superfície cel·lular MIC2, que s'ha trobat en el 95% dels casos, i per una única aberració citogenètica present en 83% dels ET, la t(11;22)(q24;q12) (Turc-Carel i col., 1988; Ambros i col., 1991). A més, s'han trobat translocacions variants (afectant altres cromosomes diferents de l'11) i translocacions complexes (afectant altres cromosomes a més de l'11 i del 22) en 4% i 5% dels ET, respectivament. Degut a la seva elevada freqüència, la t(11;22) serveix com a criteri de diagnòstic inequívoc pels ET.

Donada l'evidència de que la translocació que presenten és idèntica i indistingible entre els diferents grups de tumors, es pot concloure que aquests neoplasmes probablement comparteixen un tipus cel·lular i histològic comú, però que simplement s'aturen en distints períodes de diferenciació, anàlogament al que passa amb els subtipus de leucèmies i limfomes. Hi ha evidències que suggereixen que els ET deriven del neuroectoderm encara que poden exhibir variabilitat en la diferenciació neural i la localització tissular. El seu patró d'expressió proto-oncogènica idèntica i altament reproduïble també dóna suport a aquestes evidències d'un origen comú (McKeon i col., 1988). La classificació dels ET mitjançant tècniques histopatològiques convencionals es fa difícil donada la similitud de les característiques morfològiques i citològiques d'aquest grup.

El sarcoma d'Ewing és el tumor ossi més freqüent en nens més petits de 10 anys i el tercer tumor maligne ossi en adults. Es localitza fonamentalment en l'os (els ossos tubulars llargs i els ossos de la cintura pèlvica són els llocs més freqüents), però també pot aparèixer en els teixits tous (mesènquima). Histològicament, el sarcoma d'Ewing és un tumor maligne primitiu caracteritzat per cèl·lules petites, densament empaquetades i uniformes amb nucli arrodonit, sense les vores citoplasmàtiques perceptibles i sense nucleols prominents. Mostra un comportament clínic agressiu i tendeix a metastatitzar ràpidament. Aquest neoplasma abans era considerat com invariablement fatal,

però avui en dia és curable en aproximadament la meitat dels pacients tractats amb una combinació de cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia (Crist i Kun, 1991).

Encara que no es coneix un marcador específic de diferenciació morfològica, les cèl·lules del sarcoma d'Ewing expressen antígens de diferenciació o poden ser induïdes a expressar característiques morfològiques típiques de diferenciació neural. Això suggereix la proximitat a un altre tumor, el neuroepitelioma perifèric, que té característiques clares de diferenciació neural (Covazzana i col., 1987). Aquesta relació ve recolzada per l'alt nivell d'expressió de l'antigen MIC2 en el sarcoma d'Ewing i el neuroepitelioma perifèric, en oposició a la manca d'expressió de MIC2 en altres categories de tumors de cèl·lules rodones petites (Ambros i col., 1991). El neuroepitelioma perifèric és un tumor rar que normalment afecta a pacients de més de 20 anys, encara que pot donar-se a qualsevol edat. El tumor afecta més freqüentment les extremitats, el tronc (llavors s'anomena tumor d'Askin de la paret toràctica), i el retroperitoneu, però a vegades es presenta com un tumor ossi primari. L'estesioneuroblastoma és una malaltia molt poc freqüent que s'origina en les cèl·lules mare neuroectodèrmiques de l'epiteli olfactori.

Els ET pertanyen al grup de tumors de cèl·lules rodones petites, que inclouen, a més dels ET, el rhabdomiosarcoma, alguns tipus de limfoma, el neuroblastoma i altres entitats menys freqüents. La distinció fenotípica entre aquests diferents tumors pot ser difícil. Encara que el diagnòstic correcte s'aconsegueix sovint sense grans dificultats, és ben sabut que tumors desdiferenciats de cada categoria poden presentar una imatge microscòpica virtualment idèntica. Estudis ultraestructurals, immunohistoquímics, citogenètics i, fins i tot, moleculars poden ser necessaris per aconseguir un diagnòstic correcte. Això és d'una extrema importància perquè pot tenir implicacions terapèutiques i de pronòstic. La identificació d'una anomalia citogenètica recurrent, la translocació equilibrada $t(11;22)(q24;q12)$ en els ET, ha proporcionat un marcador genotípic. Aquesta translocació dona com a resultat un factor de transcripció quimèric que conté el domini de transactivació del gen *EWS* (22q12) i el domini d'unió al DNA del gen *FLI-1* (11q24) (Delattre i col., 1992). Posteriors estudis han mostrat que en alguns casos el gen *EWS* pot estar fusionat amb altres membres de la família ETS

(translocacions variants) incloent *ERG* al cromosoma 21 (Zucman i col., 1993), *ETVI* al cromosoma 7 (Jeon i col., 1995), *EIAF* al cromosoma 17 (Kaneko i col., 1996) o *FEV* al cromosoma 2 (Peter i col., 1997). Aproximadament un 90% dels casos d'ET presenten una translocació equilibrada implicant la banda q12 del cromosoma 22, ja sigui mitjançant translocacions simples, variants o complexes (Mitelman, 1994).

A més d'aquestes translocacions, hi ha també aberracions cromosòmiques secundàries recurrents, encara que manquen de l'especificitat del canvi primari: la trisomia 8, la trisomia 12 i la translocació desequilibrada $der(16)t(1;16)(q12;q11.2)$. Com que l'aparició d'aquests canvis addicionals està associada a l'activació i expressió de múltiples gens, és probable que les anomalies secundàries no només contribueixin a la progressió del tumor sinó que, de fet, siguin la base d'aquesta progressió. D'aquesta manera podrien servir com a criteri per valorar l'agressivitat de la malaltia.

1.4. CÀNCER DE PÀNCREAS

L'adenocarcinoma de pàncreas és un dels càncers humans més agressius i és la cinquena causa de mort per càncer en els països occidentals (Niederhuber i col., 1995; Brand i Tempero, 1998). La seva incidència ha augmentat durant els darrers 50 anys. La majoria dels pacients moren durant el primer any després del diagnòstic i amb dolor visceral incurable, icterícia extrema (augment de la bilirubina circumdant) i caquèxia severa (amagriments intensos, astènia, anèmia, apatia...). A més, aquest tumor es caracteritza per una elevada capacitat metastàtica i/o invasiva. Les raons per les quals la malaltia és tan agressiva són poc conegudes.

L'epidemiologia del càncer pancreàtic proporciona poques pistes sobre la seva etiologia o patogènia. La seva incidència augmenta amb l'edat, i és més comú en homes que en dones i en població d'origen africà que en població d'origen caucàsic (almenys a Nord Amèrica). Hi ha algunes associacions febles de rellevància incerta amb la urbanització, els carcinògens ocupacionals, el consum d'alcohol i cafè, la presència de càlculs biliars, la pancreatitis crònica i la diabetis (Hall i Lemoine, 1993). Malgrat això, el tabac és, de lluny, el factor de risc més important, sent la incidència

de la malaltia més del doble en fumadors que en no fumadors (Williamson, 1988; Boyle i col., 1989). Pot ser que l'augment en la freqüència de la malaltia durant els últims 50 anys sigui un reflex de l'augment de fumadors. L'efecte dels factors nutricionals resta poc clar, encara que s'ha postulat una associació amb dietes riques en greixos (Boyle i col., 1989).

El pàncreas està format per tres grans elements : les cèl·lules endocrines que formen els illots de Langerhans, les cèl·lules acinars que produeixen enzims secretors i un sistema de conductes anastomitzats que drenen les secrecions cap a l'intestí prim. En l'humà, els tumors de les cèl·lules endocrines són rars i normalment donen símptomes atribuïbles a un excés en la producció d'hormones. Els tumors de les cèl·lules acinars són també molt rars. Els tumors més comuns del pàncreas són aquells amb un fenotip ductal. Aquests són difícils de diagnosticar perquè els símptomes clínics apareixen tard en el curs de la malaltia i tenen tendència a ser no específics. La majoria de pacients tenen la malaltia disseminada en el moment del diagnòstic. Les opcions terapèutiques són poques, amb poca evidència de resposta a la quimioteràpia i la radioteràpia. La cirurgia és, de moment, el millor tractament del que es disposa, però la malaltia afecta principalment a persones de mitjana o avançada edat, en molts dels quals procedir a cirurgia radical és desaconsellable. A més, la resecció quirúrgica només es du a terme quan el tumor està localitzat, mentre que els tumors avançats que estan extesos i que afecten a altres òrgans, que són la majoria, no són considerats per la resecció (Hall i Lemoine, 1993). Els pacients amb tumors localitzats que pateixen una resecció tenen una taxa de supervivència als 5 anys propera al 20%. La supervivència s'ha correlacionat amb l'absència de metàstasis als nòduls limfàtics, una grandària del tumor inferior a 2 cm i l'absència d'invasió de vasos sanguinis. També s'ha correlacionat amb el contingut en DNA de les cèl·lules tumorals, amb un avantatge de supervivència per aquells pacients amb tumors diploids per sobre dels que tenen tumors aneuploids (Griffin i col., 1995). El desenvolupament de noves modalitats en el tractament, així com propostes en el diagnòstic i la prevenció, requereixen la comprensió dels mecanismes moleculars, que són el fonament del complex procés de la tumorigènesi

pancreàtica. En comparació amb altres tumors, el coneixement sobre la biologia molecular del càncer pancreàtic és molt limitat.

Però l'anàlisi genètica de l'adenocarcinoma de pàncreas presenta un problema tècnic seriós ja que els tumors tot sovint presenten una reacció estromal, produint un tumor altament desmoplàsic. El tumor primari conté una barreja de cèl·lules estromals i inflamatòries no neoplàsiques. Els estudis genètics són difícils de dur a terme de forma convincent sense fer una microdissecció acurada de les cèl·lules tumorals separant-les dels elements estromals fibròtics, o bé fent servir protocols d'enriquiment per "xenografts" (Hahn i col., 1995; Reyes i col., 1996). Els "xenografts" es construeixen per transplantament de cèl·lules tumorals humanes en el pàncreas de ratolins atímics (implantació ortotòpica), els quals desenvolupen el tumor sense reacció desmoplàsica.

L'anàlisi citogenètica és particularment difícil d'aconseguir en les mostres de càncer pancreàtic. Fins ara s'han estudiat 116 carcinomes primaris de pàncreas, dels quals només 84 presentaven cariotips amb anomalies clonals (Johansson i col., 1992; Bardi i col., 1993; Griffin i col., 1995; Gorunova i col., 1998). En general, els cariotips eren complexos (més de tres alteracions) i contenien anomalies numèriques i estructurals. Molts dels tumors tenien almenys un cromosoma no identificat (marcador). Les aberracions numèriques més comuns eren, en ordre decreixent, -18, +7, -17, +20, -12, +8, -6, +11 i -Y. Els desequilibris cromosòmics causats per reorganitzacions estructurals afectaven freqüentment els cromosomes 1 (pèrdues a 1p però especialment guanys a 1q), 3 (pèrdues a 3p i guanys a 3q), 8 (en particular guanys de 8q), 17 (sobretot guany de 17q però també pèrdua de 17p) i pèrdues a 18q. Segons aquests estudis, els punts de trencament de les aberracions estructurals s'acumulaven als següents braços cromosòmics : 1p, 1q, 6q, 7q, 11q, 17q i 19q. Els cariotips anòmals es trobaven més freqüentment en els carcinomes poc diferenciats i anaplàsics, que en els tumors moderadament i ben diferenciats. Els pacients els tumors dels quals contenien aberracions numèriques i estructurals tenien una supervivència significativament més curta que aquells pacients amb tumors amb poques reordenacions citogenètiques (Johansson i col., 1994). No s'ha descrit fins ara cap anomalia equilibrada recurrent.

D'acord amb les delecions identificades citogenèticament, les anàlisis de LOH en carcinomes de pàncreas mostraven pèrdua al·lèlica a 1p, 3p, 6p, 6q, 8p, 9p, 10q, 12q, 13q, 17p, 18p, 18q, 21q i 22q (Seymour i col., 1994; Hahn i col., 1995). Aquestes dades estarien a favor de la presència de gens supressors de tumors en aquests braços cromosòmics. Malgrat tot, encara no es coneix exactament quins gens supressors de tumors són essencials per la carcinogènesi pancreàtica, i com la seva inactivació s'afegeix a les mutacions de varis oncogens.

Una varietat de gens candidats han estat rastrejats per mutacions i/o canvis en el nivell d'expressió, donant lloc a la identificació de vàries anomalies. La primera en ser descoberta va ser l'alta freqüència (85%) de mutacions al codó 12 de l'oncogen *KRAS* (Almoguera i col., 1988 ; Hruban i col., 1993). Aquestes mutacions es produeixen en un estat primerenc de la tumorigènesi (Lemoine i col., 1992), potser fins i tot en lesions preneoplàsiques (Yanagishawa i col., 1991 ; Caldas i col., 1994a; DiGiuseppe i col., 1994). Per altra banda, els gens supressors de tumors *TP53* (17p13) i *CDKN2* (9p21) estan inactivats molt freqüentment (42% i 85%, respectivament) per mutació i/o delecio al·lèlica (Ruggeri i col., 1992 ; Caldas i col., 1994b ; Pellegata i col., 1994 ; Redston i col., 1994). En càncers preinvasius s'han trobat anomalies en *TP53* (Barton i col., 1991). A més, recentment s'ha observat que una proporció significativa de casos de càncer pancreàtic primari tenen mutat un possible gen supressor de tumor nou, el *DPC4* (18q21; Hahn i col., 1996). Malgrat romandre alguna controvèrsia, la majoria dels investigadors troben poca evidència de la participació d'altres gens supressors de tumors, com *APC*, *RBI*, *DCC*, i gens que codifiquen per enzims de reparació del DNA, almenys a poblacions occidentals (McKie i col., 1997). Hi ha una proporció significativa de casos que sembla que no presentin les anomalies genètiques més freqüents, del que se'n dedueix que encara no es coneixen tots els gens involucrats en la transformació de cèl·lules epitelials pancreàtiques.

Finalment, investigacions prèvies de CGH en 81 tumors primaris i línies cel·lulars de carcinomes pancreàtics han revelat guanys freqüents de 7p, 8q, 11q, 14q, 17q, i del cromosoma 20, així com pèrdues de 3p, 6q, 9p, 18q, i 21q (Solinas-Toldo i col., 1996; Fukushige i col., 1997; Mahlamäki i

col., 1997; Curtis i col., 1998). Aquestes regions poden contenir nous possibles proto-oncogens i gens supressors de tumors, pressumiblement involucrats en la patogènia dels tumors pancreàtics. Els candidats més probables inclouen *MYC* (8q24) i ciclina *DI* (11q13), com a oncogens, i *FHIT* (3p14.2), *CDKN2A* (p16) o *CDKN2B* (p15) ambdós a 9p21 i *DCC* o *MADR2* (18q21), com a gens supressors. Pel què fa als guanys en el cromosoma 20, Fukushige i col. (1997) van analitzar cinc línies cel·lulars pancreàtiques mitjançant FISH amb sondes del cromosoma 20 per definir més acuradament l'augment en el nombre de còpies. Van trobar que 20q estava augmentat entre 5 i 8 còpies per cèl·lula. A més, es van observar guanys a 20q tant en estadis primerencs com en estadis avançats del carcinoma i amb la mateixa freqüència. Aquests resultats suggerien que els gens d'aquesta regió podrien tenir una funció important en els primers estadis de la carcinogènesi pancreàtica.

2. OBJECTIUS

- 5.1. Posar a punt la tècnica de CGH.
- 5.2. Fer un estudi de les regions amplificades i/o delecionades en diferents tumors sòlids mitjançant CGH.
- 5.3. Comprovar la significació clínica d'alguns d'aquests canvis en el nombre de còpies de DNA.
- 5.4. Estudiar més detalladament aquelles regions anòmales mitjançant mètodes moleculars més específics (FISH, LOH, Southern blot...) i intentar delimitar les regions i reconèixer els gens implicats.
- 5.5. Analtizar l'evolució clonal de la progressió metastàtica del càncer mitjançant CGH.

2. MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Es van estudiar 37 mostres d'ET, vuit "xenografts" de tumors pancreàtics i set metàstasis pancreàtiques originades als ratolins. Per desenvolupar els "xenografts", es van implantar i perpetuar vàries peces tumorals en ratolins atòmics a l'Hospital de la Sta. Creu i St. Pau de Barcelona (Reyes i col., 1996). Les dades clíniques dels pacients estan representades a les corresponents taules dels articles I, II i IV. Totes les mostres van ser analitzades mitjançant CGH (com a control per la CGH es va utilitzar DNA obtingut a partir de sang perifèrica d'individus normals). A partir dels resultats obtinguts, en alguns tumors es van estudiar més detalladament determinades regions sospitoses d'estar implicades en el procés tumorigènic. Les tècniques emprades van ser Southern (en un ET i en vuit tumors pancreàtics), FISH amb sondes de seqüència única (en set tumors pancreàtics) i LOH (en cinc tumors pancreàtics). Pels estudis de LOH es va fer servir com a control DNA obtingut a partir de sang perifèrica dels malalts estudiats.

3.2. EXTRACCIÓ DE DNA

Es va procedir a l'aïllament de DNA a partir de les mostres d'ET, dels "xenografts" de tumors pancreàtics i de les metàstasis, així com de la sang perifèrica d'individus normals i de cinc dels malalts amb càncer de pàncreas. Sempre es seleccionava la part del tumor on la proporció de cèl·lules malignes fos majoritària (Kallioniemi i col., 1994) mitjançant talls histològics o bé *de visu*. L'extracció de DNA es va realitzar mitjançant mètodes estàndard, basats en la digestió amb proteinasa K i l'extracció amb fenol i cloroform. Algunes mostres provenien de teixits fixats en parafina en les quals es feia un procés previ de deparafinització i, posteriorment, digestió amb proteinasa K, i RNasa.

3.3. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA

Es va aplicar la CGH en les 37 mostres d'ET, en vuit "xenografts" de tumors pancreàtics i en set metàstasis pancreàtiques. A més, es va fer un estudi mesclant els DNAs de 17 mostres d'ET (tots amb les mateixes característiques clínicopatològiques) per fer-ho servir com a DNA tumoral en un experiment de CGH (article III).

3.3.1. Marcatge de la sonda

El DNA tumoral es va marcar amb Fluoresceïna i el DNA normal amb Texas Red mitjançant reaccions de "nick-translation". En un bany a 15°C es posava a incubar durant 45-60 min una mescla que contenia 1 µg de DNA, dCTP 200 µM, dGTP 200 µM, dATP 200 µM, Tris 500 mM (pH 7.8), MgCl₂ 50 mM (el magnesi és un cofactor necessari per l'enzim DNA polimerasa), mercaptoetanol 100 mM, 100 µgml⁻¹ de BSA (albúmina sèrica bovina) lliure de nucleases, 1 nmol de Fluoresceïn-12-dUTP o Texas Red-5-dUTP (DuPont), 8 U de DNA polimerasa I (Promega), 0.2 ng de DNasa / 2 U de DNA polimerasa (Life Technologies), i aigua tridestil·lada estèril fins arribar als 50 µl. La reacció s'aturava amb una incubació a 75°C durant 10 min per desnaturalitzar els enzims. Després de la reacció es comprovava la grandària dels fragments amb un gel d'agarosa a l'1.4%. La grandària òptima era de 500 pb a 2000 pb. Si els fragments de la sonda eren massa curts es disminuïa la quantitat de DNasa i/o el temps d'incubació. Si els fragments eren massa grans s'augmentava la quantitat d'enzim i/o el temps d'incubació. El fet d'aturar la reacció desnaturalitzant els enzims permetia continuar la reacció si els fragments eren massa grans. Els DNAs marcats poden ser guardats a -20°C.

3.3.2. Hibridació

Les mateixes quantitats de DNA tumoral i DNA normal (800ng) i 10-20 µg de DNA Cot-1 (Life Technologies) eren precipitats junt amb 2 volums d'etanol pur fred i 0.1 volums d'acetat de sodi 3 M, mitjançant una centrifugació a 13.000 rpm durant 30 min a 4°C. El DNA Cot-1 és un DNA ric en seqüències repetitives, la funció del qual és bloquejar aquestes seqüències del DNA a hibridar. Si no s'afegís Cot-1, les seqüències de DNA que són comuns a tots els cromosomes podrien hibridar en

qualsevol d'ells i ens emmascararien els resultats. El botó es dissolia en 10 µl de 50% de formamida desionitzada / 10% de dextrà sulfat / 2xSSC (20xSSC = NaCl 3 M / Na₃citrat·2H₂O 0.3 M, pH 6.5) i es deixava a 37°C durant un mínim de dues hores per permetre la total dissolució.

Les preparacions amb metafases de limfòcits s'obtenien a partir de cultius de sang perifèrica d'un individu normal. Les preparacions eren seleccionades en un microscopi de contrast de fases: els cromosomes havien d'aparèixer relativament foscos (ni de color gris clar ni birefringents), ben estesos, relativament llargs, i sense citoplasma ni restes cel·lulars. Es deixaven envellir entre 2 setmanes i 2 mesos a temperatura ambient en un ambient sec. El dia abans de fer la hibridació el material dels portaobjectes es post-fixava mitjançant una incubació amb Carnoy (3 metanol:1 àcid acètic) a 4°C durant tota la nit. El dia de la hibridació les extensions eren deshidratades en una sèrie d'etanols al 70%, al 85% i al 100% 5 min a cada un. Després es desnaturalitzaven a 68-69°C durant 2 min en una solució de formamida (70% de formamida / 2xSSC, pH 7), es deshidrataven en una sèrie d'etanols freds durant 2 min i es tractaven amb proteïnasa K (0.1 µgml⁻¹ en Tris-HCl 20 mM / CaCl₂ 2 mM, pH 7) a 37°C durant 7.5 min, per tal d'eliminar les restes de membranes i citoplasma cel·lulars i així facilitar l'accés de la sonda. Les condicions de desnaturalització i tractament amb proteïnasa K variaven lleugerament depenent de la qualitat de les preparacions i de la seva edat, de manera que s'ajustaven per cada grup de portaobjectes. Després, les extensions eren deshidratades altra vegada. La sonda es desnaturalitzava a 75°C durant 5 min, s'aplicava als portaobjectes i es deixava hibridant durant 2-3 dies a 37°C en una cambra humida. Tant a la desnaturalització de la sonda com a la dels portaobjectes hi havia la presència de formamida, que permet desnaturalitzar el DNA a temperatures més baixes per tal de que els cromosomes no perdin la seva morfologia i el DNA no s'alteri en excés.

3.3.3. Rentats post-hibridació

Després de la hibridació, es realitzaven una sèrie de rentats per tal d'eliminar l'excés de sonda que no havia hibridat, així com la sonda que havia hibridat de forma inespecífica. L'eficàcia dels rentats es pot controlar variant la concentració de formamida, la concentració de sals i la temperatura. A major concentració de formamida, menor concentració de sals o major temperatura, hi ha un nombre més

gran de fragments híbrids no perfectes que es dissocien. Cal anar amb compte, però, de no dissociar els híbrids perfectes. Els portaobjectes es rentaven 3x10 min en 50% de formamida / 2xSSC (pH 7), 2x10 min en 2xSSC i 10 min en 0.1xSSC, tot a 45°C. Després d'això, es rentaven 10 min en 2xSSC, 10 min en un tampó PN (Na₂HPO₄ 0.1 M / 0.1% de Nonidet P-40, pH 8 tamponat amb NaH₂PO₄ 0.1 M) i 10 min en aigua destil·lada, tot a temperatura ambient. Els cromosomes eren contratenyits amb 5 µgml⁻¹ de 4', 6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) i muntats en 7 µl d'una solució "antifade" *Vectashield* (Vector Laboratories), per tal d'evitar la pèrdua progressiva de color. Les preparacions es guardaven en una capsula on no entrés la llum perquè no es perdés la fluorescència.

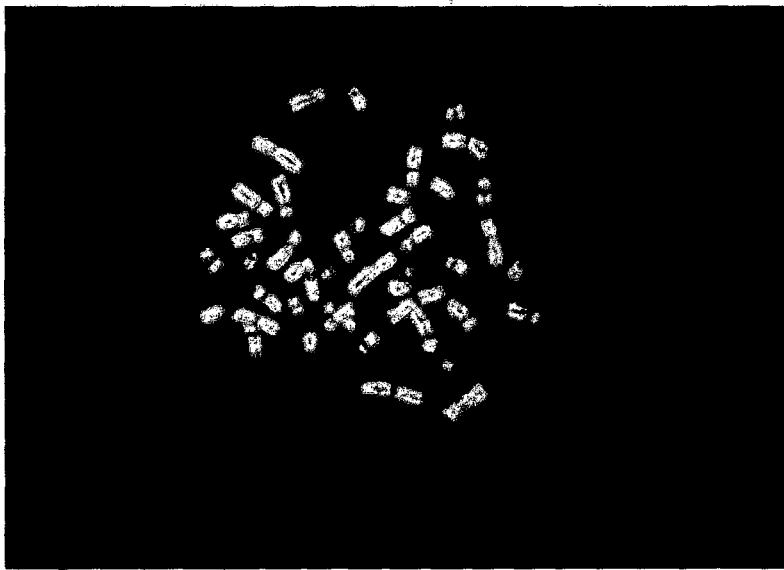
3.3.4. Anàlisi d'imatges i interpretació dels resultats

Les hibridacions es van analitzar en un microscopi d'epifluorescència d'alta qualitat amb una càmera CCD monocroma integradora d'alta sensibilitat acoblada a un sistema d'anàlisi d'imatges digitals. Es van utilitzar dos sistemes d'anàlisi: Metasystems (MetaSystems) i Cytovision (Applied Imaging) que tenen uns paquets de software automatitzats per analitzar la CGH. A la Figura 4 es pot observar una metafase hibridada amb DNA tumoral (verd) i DNA normal (vermell).

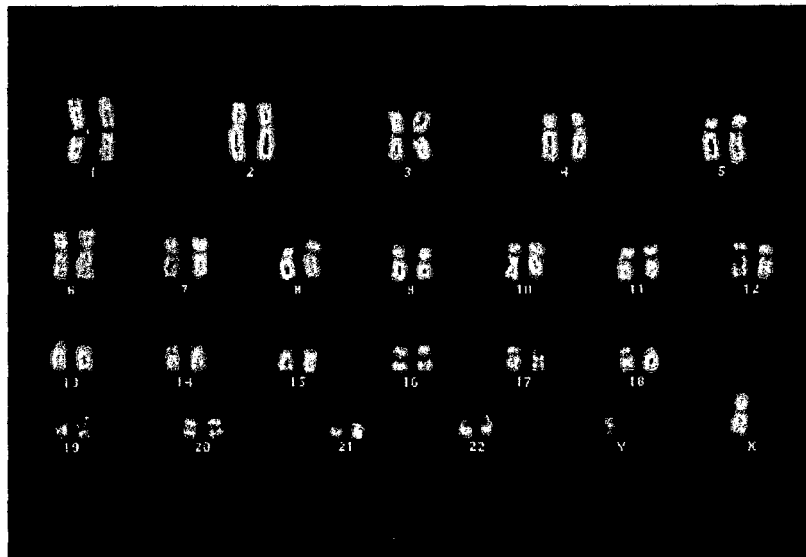
Per cada metafase es capturaven imatges en blanc i negre dels tres fluorocroms (DAPI, Fluoresceïna i Texas Red) de forma seqüencial. La inclusió del DNA genòmic normal, detectat amb un color diferent que el DNA tumoral, proporciona un control intern d'intensitat de la hibridació a cada punt del genoma. Les imatges òptimes han de presentar una hibridació homogènia i uniforme amb senyals d'hibridació intensos. El sistema d'anàlisi redueix al màxim el soroll de fons i integra les intensitats de fluorescència pel verd i pel vermell per tot el cromosoma. Les raons de fluorescència verd respecte vermell eren calculades per cada cromosoma des del telòmer del braç curt (p) fins al telòmer del braç llarg (q). Donat que la intensitat de fluorescència absoluta depèn de múltiples factors, és necessari realitzar una mena de normalització o estandarització. Es tracta d'igualar aproximativament les intensitats mitjanes de les imatges de Fluoresceïna i Texas Red per totes les metafases, de manera que la proporció corregida verd:vermell s'iguali aproximadament a 1.0. En el nostre cas es va fer la mitjana a partir de les dades de cinc a deu metafases per mostra, per tal de millorar la relació del

senyal respecte el soroll de fons. A la pantalla de l'ordinador es mostraven els perfils de la mitjana de les raons de fluorescència per tots els cromosomes. Les regions cromosòmiques amb una proporció de fluorescència verd (tumor):vermell (normal) superior a 1.25 van ser considerades com a guanys de seqüències del DNA tumoral i les regions amb una relació per sota de 0.75, com a pèrdues (du Manoir i col., 1995). Es van prendre aquests límits considerant una trisomia (proporció 1.5) o una monosomia (0.5) d'un genoma diploid en un 50% de les cèl·lules. Així doncs, segons els límits dels perfils de les intensitats de fluorescència que s'estableixin, el percentatge mínim de cèl·lules que cal que tinguin l'anomalia per ser detectades per CGH varia. En el cas de límits 1.25 pels guanys i 0.75 per les pèrdues, es detecten aquelles anomalies presents almenys en un 50% de les cèl·lules. Aquest percentatge varia, però, depenent de la ploidia del tumor, el nombre de còpies perdudes o guanyades, la grandària de la regió afectada i la possible compensació d'un guany amb una pèrdua presents en la mateixa regió. En el cas de que s'estableixin els límits a 1.17 i 0.85, es detecten les anomalies presents almenys en un 30% de les cèl·lules tumorals, amb les mateixes consideracions. La selecció d'uns o altres límits s'ha de fer en funció de la ploidia del tumor i de la qualitat de les hibridacions, ja que s'ha de tenir en compte que els controls negatius no poden passar mai d'aquests límits (du Manoir i col., 1995). Aquests valors de tall, doncs, es comprovaven en experiments de controls negatius amb DNA normal. Es va incloure un control negatiu en cada experiment de CGH com a control de qualitat.

A més, una proporció de fluorescència per sobre de 1.5 es va definir com a amplificació d'alt nivell, i una proporció per sota de 0.5 va ser considerada com a pèrdua en homozigosi o una pèrdua en quasi tota la població cel·lular. Les regions d'heterocromatina (1q12, 9q12, 16q11, 13p, 14p, 15p, 21p, 22p i Yq12) es van excloure de l'anàlisi per estar bloquejades pel DNA Cot-1. Els perfils de 1p32-pter, 16p, 17p i els cromosomes 19 i 22 s'han interpretat amb compte, perquè són considerades àrees problemàtiques (Kallioniemi i col., 1994). Es creu que això és degut a la seva composició de bases, ja que són regions molt riques en GC.



A



B

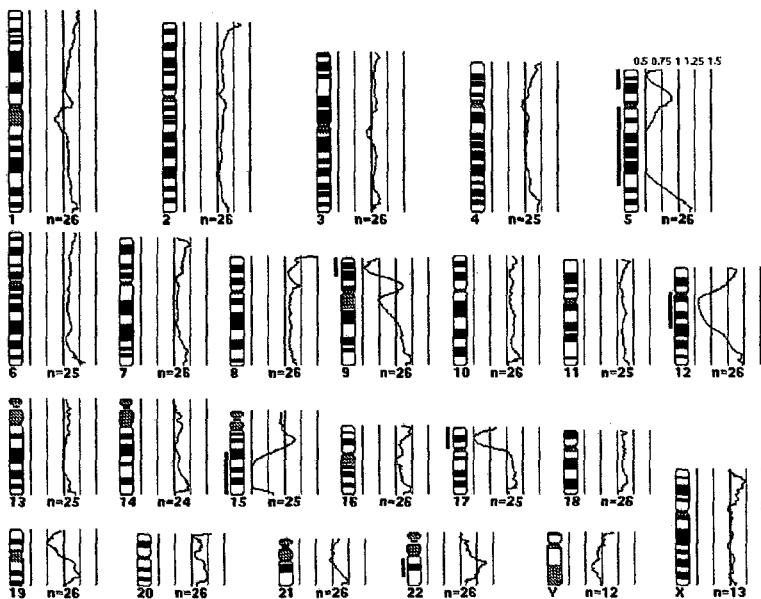


Figura 4. Hibridació genòmica comparada corresponent a una metàstasi hepàtica de l'adenocarcinoma de pàncreas NP18. Es pot observar guany de material genètic a 22 q i pèrdues a 5p, 5q, 9p, 12q, 15q i 17p. A, Metafase; B, Cariotip; C, Idiograma.

C

3.4. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Es va avaluar estadísticament com les anomalies detectades per CGH en els ET afectaven l'evolució dels pacients (supervivència global, supervivència lliure de metàstasis i recaigudes locals). Les variables estudiades van ser: anomalies més freqüents detectades per CGH (cromosomes 1, 6, 8 i 12), i algunes dades clíniques, com la mida del tumor i la seva localització (extremitats vs. no extremitats). Es va construir una taula de supervivència per tenir una indicació de la distribució dels individus que no havien sobreviscut al llarg del temps. La distribució dels temps de supervivència estava dividida en un nombre específic d'interval·ls. La taula permetia calcular la funció de supervivència, com a proporció acumulada de casos que han sobreviscut fins a un interval de temps determinat. Per estimar la funció de supervivència directament a partir dels temps de supervivència es va utilitzar la funció de Kaplan-Meier, que no depèn de l'agrupament de les dades. Es va comparar la supervivència dels individus amb i sense l'alteració en qüestió mitjançant el test no paramètric de log-rank, ja que els temps de supervivència no estan distribuïts normalment. Amb el valor que s'obtenia es va avaluar la significació estadística de les diferències entre els grups de dades ($p < 0.05$). Es va procedir igual amb les altres variables.

Per altra banda, també es va avaluar el nombre total d'aberracions per tumor. En aquest cas, i donat que s'assumeix proporcionalitat entre la variable i el temps de supervivència, es va realitzar una anàlisi de regressió de Cox. Aquest model assumeix que el temps de supervivència és una funció de la variable estudiada. La significació estadística es va obtenir gràcies al test de Wald.

3.5. CULTIUS CEL·LULARS I ANÀLISI CITOGENÈTICA

Els mètodes utilitzats per l'anàlisi citogenètica convencional de 16 mostres d'ET estan descrits per Tarkkanen i col. (1993).

3.6. SOUTHERN BLOT

Es va realitzar l'anàlisi mitjançant Southern blot d'un ET que havia mostrat un alt nivell d'amplificació a 1q21-q22 per CGH. Es volia avaluar l'amplificació de dos gens localitzats a 1q21-q22, el *SPRR3* i el *FLG*, que prèviament s'havien trobat amplificats en algunes mostres de sarcoma. La metodologia emprada va ser la descrita per Forus i col. (1993). La intensitat del senyal de cada banda es va quantificar amb un densitòmetre de làser Molecular Dynamics. Per corregir una possible càrrega desigual de les mostres es van rehibridar els filtres amb una sonda control corresponent al gen *APOB*.

També es van analitzar vuit tumors de pàncreas mitjançant Southern blot per estudiar l'amplificació del gen *IGF1R* (15q25-qter). La metodologia es descriu a continuació.

3.6.1. Obtenció i marcatge de la sonda

El c-DNA del gen *IGF1R* (American Type Culture Collection, ATCC) venia incorporat en un plasmidi d'Escherichia coli. Es va procedir a l'aïllament del DNA mitjançant una extracció estàndard de DNA plasmídic a gran escala. Després es va tallar el fragment corresponent al gen i es va recuperar en un gel d'agarosa. Es va purificar el DNA amb el GENE CLEAN II kit (Bio 101 Inc.). Tot seguit es va marcar amb digoxigenina mitjançant "random primed" (Dig DNA labeling kit, Boehringer Mannheim). La sonda marcada es va quantificar amb un kit de detecció no radioactiu (Boehringer Mannheim). Es feia un banc de dilucions d'un DNA control marcat i de la sonda suposadament marcada considerant que, com a mínim, s'havia duplicat la quantitat de DNA de la qual partíem. Es col·locava una gota (2µl) de cada dilució sobre una membrana de niló ("dot spot") i es procedia a la detecció immunològica colorimètrica. La quantitat de sonda marcada es determinava buscant *de visu* les intensitats de color de cada dilució que es corresponien amb les del control i multiplicant el valor de la dilució pel valor de la concentració del DNA control.

3.6.2. Transferència, hibridació i detecció

El DNA genòmic aïllat dels vuit tumors de pàncreas es va digerir amb Pst i Hind III separadament, es van córrer en un gel d'agarosa al 0.8% i es van transferir a un filtre de niló carregat positivament

segons la tècnica convencional de Southern blot. La membrana es va hibridar amb la sonda de c-DNA per *IGF1R* marcada amb digoxigenina i amb pEFD145 (3p21, ATCC), també marcada amb digoxigenina, com a sonda control per calibrar per una càrrega de mostres desigual. El DNA era fixat al filtre amb radiació UV durant tres minuts per cada cara. La detecció es va dur a terme segons Engler-Blum i col. (1993) i el filtre es va exposar a un hiperfilm ECL (Amersham) durant 5-10 min (Figura 5). Els senyals d'hibridació es van quantificar amb un densitòmetre (programa Intelligent Quantifier BioImage, densitòmetre SkanJet 4C/T de Hewlet Packard). El nivell d'amplificació es va calcular a partir de la següent fórmula:

$$\frac{I_{IGF1R \text{ en el tumor}}}{I_{IGF1R \text{ en el teixit normal}}}$$

$$\frac{I_{pEFD145 \text{ en el tumor}}}{I_{pEFD145 \text{ en el teixit normal}}}$$

on I és la intensitat del senyal.

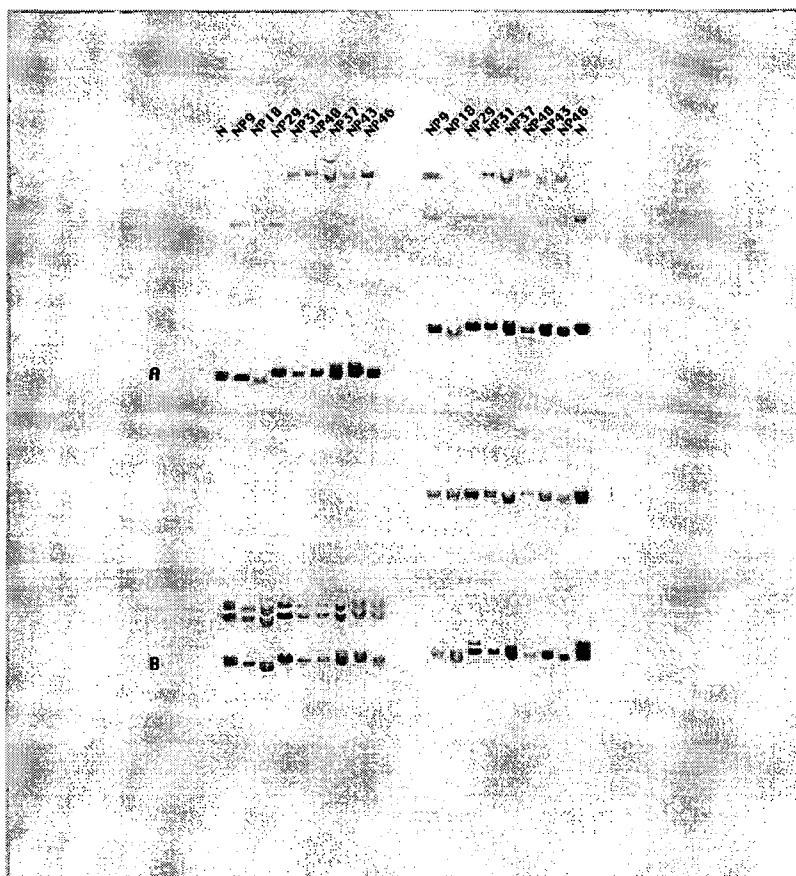


Figura 5. Hibridació de Southern de DNA de mostres de teixit tumoral pancreàtic. El DNA total es va digerir amb els enzims Pst (esquerra) i Hind III (dreta). A. Hibridació amb la sonda IGF1R. B. Hibridació amb pEFD145 com a sonda control. N, teixit normal.

3.7. PÈRDUES D'HETEROZIGOSITAT

Es van analitzar les pèrdues d'heterozigositat a la regió 10p14-pter en tres tumors de càncer de pàncreas que havien presentat per CGH una pèrdua d'aquesta regió. També es van estudiar dos tumors que no presentaven aquesta pèrdua. Es van analitzar sis marcadors de microsatèl·lits CA amplificats per PCR. Tots els marcadors estaven localitzats a 10p14-pter segons la base de dades Entrez (NCBI, NLM, NIH) ocupant una regió de 24.3 cM (Dib i col., 1996).

Es van utilitzar les següents condicions de PCR: 1x tampó de PCR, MgCl₂ 1.5 mM, dATP 200 µM, dTTP 200 µM, dGTP 200 µM, dCTP 2.5 µM, 0.7 µCi de α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol), 0.5 µM de cada encebador, 55 ng de DNA, 0.0125 U de la polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) i aigua tridestil·lada estèril fins a un volum total de 10 µl. Primer es realitzava un pas de pre-PCR a 94°C durant 10 min per tal d'activar l'enzim. La polimerasa AmpliTaq Gold només és activa a 94°C, de manera que no comença la reacció de polimerització fins que tot el DNA està desnaturalitzat. Això evita que hi hagi hibridacions inespecífiques. Llavors el DNA era amplificat durant 27 cicles: 30 s a 94°C, 75 s a 55°C i 15 s a 72°C per cada cicle, i després de l'últim cicle, 10 min a 72°C, per acabar de polimeritzar les cadenes que podien haver quedat incompletes. Després de la PCR, es feien córrer 4-5 µl de cada mostra en un gel desnaturalitzant de poliacrilamida al 6%, s'assecava el gel i s'exposava a una pel·lícula Kodak XAR.

Els pacients es designaven com a no informatius quan eren homozigots pel locus en qüestió i informatius quan eren heterozigots. Es comparaven els patrons produïts per les parelles de DNA tumoral i normal del mateix individu. Emprant aquesta metodologia, els al·lells no s'observaven com a un únic fragment, sinó que consistien en una escala de fragments, típicament separats per intervals de dos nucleòtids (Figura 6). Això s'explicaria per l'error en l'aparellament degut al lliscament de les cadenes.

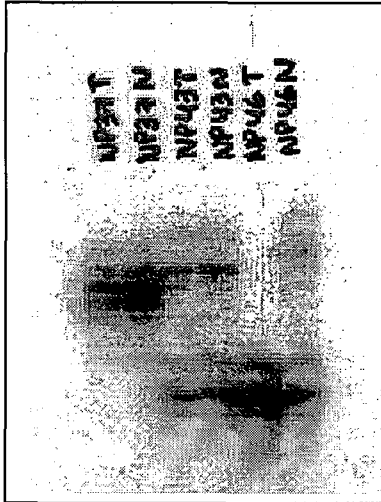


Figura 6. Estudi de pèrdues al·lèliques per al marcador D10S558 en els tumors pancreàtics NP37, NP43 i NP46. En aquest cas el tumor NP37 era homozigot, el tumor NP43 era heterozigot però no mostrava pèrdues al·lèliques i el tumor NP46 si que mostra pèrdua d'un al·lel.

3.8. HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT

La FISH amb les sondes de seqüència única *MYC* i *FES* es va fer servir per examinar alguns gens candidats de les regions que s'havien trobat amplificades per CGH (8q24 i 15q25-q26, respectivament) en set tumors d'adenocarcinoma de pàncreas.

3.8.1. Obtenció de les preparacions

Les preparacions de nuclis interfàsics de tumors es van obtenir a partir de peces congelades de teixits tumorals dels "xenografts". El teixit es triturava mecànicament en 1.5 ml de RPMI i 0.5 ml de sèrum fetal, es centrifugava a 2500 rpm durant 5 min i el botó es dissolia en 1.5 ml d'una solució que contenia sacarosa 250 mM, Na₃citrat 40 mM i 1/20 part de dimetil sulfòxid (DMSO), pH 7.6. S'agitava bé i es tornava a centrifugar. El botó es tripsinitzava durant 10 min en 1.8 ml d'una solució A (2 U de tripsina en un tampó amb àcid cítric 3.4 mM, tetrahydroclorid d'espermina 1.5 mM, Tris 0.5 mM, 0.1% de Nonidet-P40, pH 7.6). Aquesta solució es conserva a -80°C. Després s'incubava 10 min en 1.5 ml d'una solució B (1/5 part de sèrum per inhibir la tripsina i RNasa A 7.2 μM en el mateix tampó que la solució A, pH 7.6). Aquesta solució també es conserva a -80°C. La suspensió de nuclis es filtrava a través d'una xarxa de niló de 53 μm. Després d'una fixació amb metanol i àcid acètic (3:1), les cèl·lules es dipositaven en els portaobjectes, es secaven i es fixaven altra vegada. Les mostres eren post-fixades amb 4% de paraformaldehid / 1x solució PBS (NaCl 137 mM / KCl 2.7 mM / Na₂HPO₄·7H₂O 4.3 mM / KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.4) durant 5 min a 4°C, eren deshidratades en una

sèrie d'etanols, secades altra vegada i escalfades durant 30 min a 70°C. Aquestes extensions es guardaven a -20°C.

3.8.2. Hibridació dual

Es va procedir a fer una FISH de doble color amb una sonda específica pel gen *MYC* (8q24) marcat amb digoxigenina (Oncor) i una sonda centromèrica del cromosoma 8 marcada amb biotina (Oncor) com a control, per una banda; i, per altra banda, el locus *FES* (15q26.1) marcat amb Spectrum Orange (Vysis) i una sonda centromèrica pel cromosoma 15 marcada amb biotina (Oncor). Les hibridacions es van dur a terme de la següent manera. Si les extensions eren molt recents (menys de dues setmanes), primer s'incubaven durant 1 h a 37°C en 2xSSC i després seguia el procés d'hibridació normal. Els portaobjectes es deshidrataven en una sèrie d'etanols durant 2 min i es procedia a la desnaturalització en 70% de formamida / 2xSSC a 70°C durant 2 min. Tot seguit es deshidrataven, s'incubaven en una solució amb proteinasa K 7.5 min a 37°C (1 µgml⁻¹ en Tris-HCl 20 mM / CaCl₂ 2mM, pH 7) i es deshidrataven altra vegada. La sonda centromèrica s'incubava a 37°C durant 5 min i es mesclaven 0.3-0.7 µl de la sonda centromèrica en 5 µl de la sonda de locus específic (*MYC* o *FES*). La mescla de sonda de *FES* i centromèrica s'havia de desnaturalitzar (incubació a 72°C 5 min), mentre que la sonda de *MYC* (de diferent proveïdor) no calia desnaturalitzar-la i solament es feia una incubació a 37°C 5 min. Seguidament, s'aplicava la sonda al portaobjectes i es deixava hibridant tota la nit.

3.8.3. Rentats post-hibridació i detecció del senyal

L'endemà es feien els rentats: 3x5-10 min en 50% de formamida / 2xSSC, 10 min en 2xSSC, 2x5-10 min en 0.1xSSC, tot a 45°C. Després es feia una incubació de 5 min en 4xSSC / 0.2% de Tween 20 a temperatura ambient. Tot seguit es procedia a la detecció immunoquímica. Les sondes marcades amb biotina es detectaven amb el fluorocrom FITC i la sonda marcada amb digoxigenina amb TRITC. La sonda que venia marcada directament amb Spectrum Orange no requeria detecció immunoquímica ni amplificació del senyal. Els portaobjectes s'incubaven durant 30 min a 37°C amb

200 µl de les solucions dels anticossos (prèviament centrifugats a 13000 rpm 2 min) diluïts en 1% de BSA / 4xSSC estèril. Es feien tres etapes successives:

a) Avidina-FITC (Vector Ref. A-2011) ($25 \mu\text{gml}^{-1}$) i anticòs anti-digoxigenina de ratolí (Boehringer Ref. 1333062) (2.7:200)

b) Anticòs anti-avidina biotilada (Vector Ref. BA-0300) ($2.5 \mu\text{gml}^{-1}$) i anticòs anti-ratolí-TRITC de conill (Sigma Ref. T2402) (2:200)

c) Avidina-FITC ($25 \mu\text{gml}^{-1}$) i anticòs anti-conill-TRITC (Sigma Ref. T5268) (2:200).

Gràcies a aquestes rondes el senyal era detectat (l'avidina té gran afinitat per la biotina) i amplificat. Després de cada incubació les preparacions es rentaven 3x5 min en 4xSSC / 0.2% de Tween 20 a 45°C per eliminar els anticossos sense unió específica. Els portaobjectes es contratenyien amb $5 \mu\text{gml}^{-1}$ de DAPI i es muntaven en una solució "antifade".

Opcionalment, quan hi havia molt soroll de fons es podia dur a terme després dels primers rentats una incubació en 5% de BSA / 4xSSC estèril a 37°C durant 45 min, per tal de bloquejar les proteïnes inespecífiques que podrien interferir en la detecció immunoquímica. Després d'aquesta incubació es feia un rentat amb 4xSSC / 0.2% de Tween 20 a 45°C 5 min. Llavors es continuava amb les rondes dels anticossos.

Per cada tumor i per cada hibridació es van contar 200 nuclis. Per cada nucli es contaven el nombre de còpies del gen (*MYC* o *FES*) i el nombre de centròmers dels cromosomes (8 o 15, respectivament).

El nivell d'amplificació es va expressar com el nombre de senyals del gen relatiu al nombre de senyals centromèrics. Els tumors es van classificar en aquells sense amplificació (quan el nombre de senyals del gen era igual al de senyals centromèriques), amb un baix nivell d'amplificació (quan el quocient del nombre de senyals del gen respecte als centromèrics estava entre 1.5 i 3) i amb un alt nivell d'amplificació (quocient > 3) seguint altres treballs publicats (Tanner i col., 1994) (Figura 7).

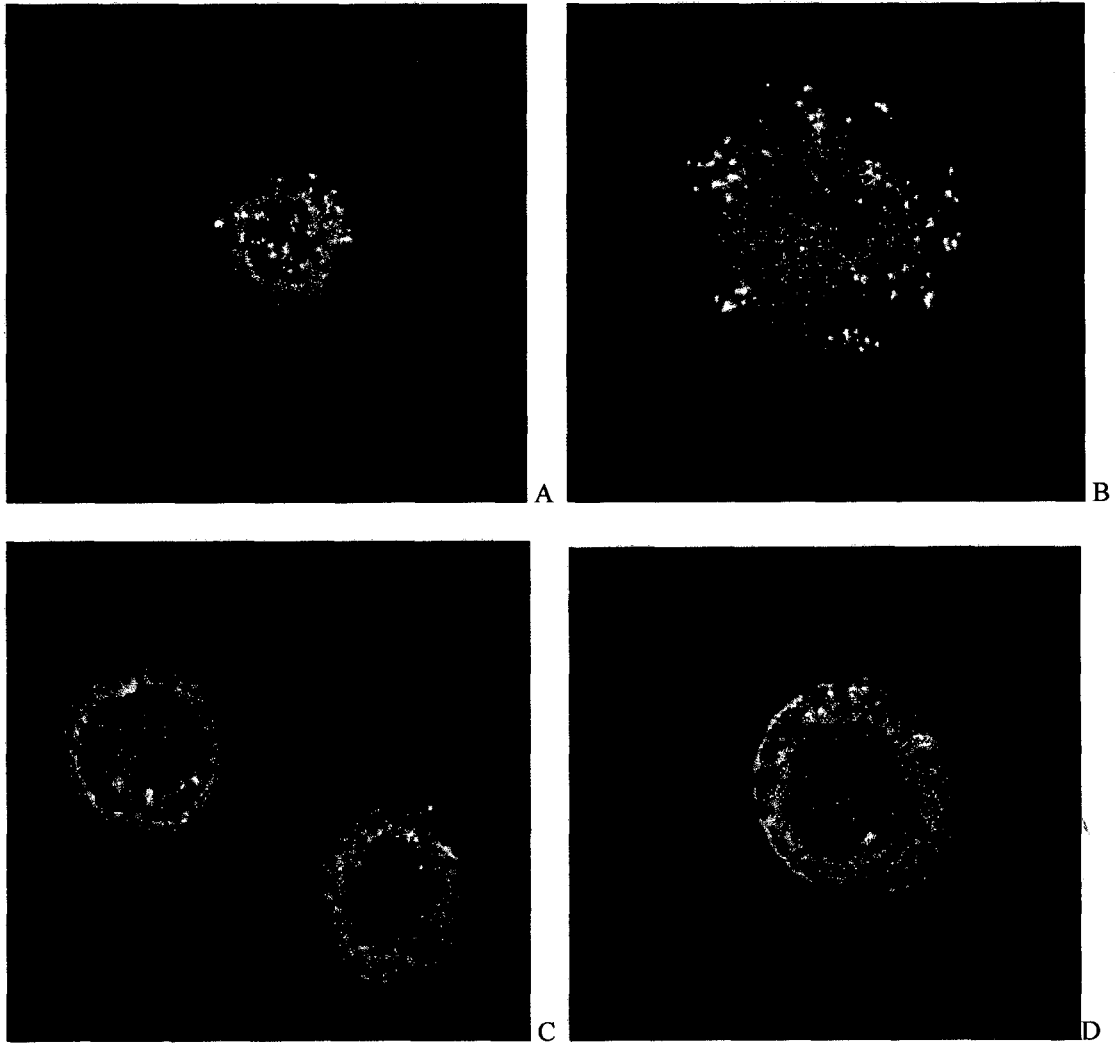


Figura 7. Hibridació in situ fluorescent amb les sondes de locus específic (vermell) dels gens MYC (A i B) i FES (C i D) i els centròmers respectius (verd). A i B, amplificació de MYC a l'adenocarcinoma de pàncreas NP29; C, el nucli de l'esquerra presenta baix nivell d'amplificació de FES i el nucli de la dreta no presenta amplificació al cas NP9; D, baix nivell d'amplificació al cas NP9.

3. ARTICLES

Article I

Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization.

British Journal of Cancer 75: 1403-1409 (1997)

Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization

G Armengol^{1,2}, M Tarkkanen¹, M Virolainen³, A Forus⁴, J Valle⁵, T Böhling⁵, S Asko-Seljavaara⁶, C Blomqvist³, I Elomaa³, E Karaharju⁷, AH Kivioja⁷, MA Siimes⁸, E Tukiainen⁶, MR Caballin², O Myklebost⁴ and S Knuutila¹

¹Department of Medical Genetics, Haartman Institute, PO Box 21, University of Helsinki, FIN-00014, Finland; ²Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; ³Department of Oncology, Helsinki University Central Hospital, Haartmaninkatu 4, FIN-00290 Helsinki, Finland; ⁴Department of Tumor Biology, The Norwegian Radium Hospital, 0310 Oslo, Norway; ⁵Department of Pathology, Haartman Institute, University of Helsinki, Finland; Departments of ⁶Plastic Surgery and ⁷Orthopaedics and Traumatology, Helsinki University Central Hospital, Topeliuksenkatu 5, FIN-00260 Helsinki, Finland; ⁸Department of Pediatrics, Stenbäckinkatu 11, FIN-00290 Helsinki, Finland

Summary Comparative genomic hybridization (CGH) was used to detect copy number changes of DNA sequences in the Ewing family of tumours (ET). We analysed 20 samples from 17 patients. Fifteen tumours (75%) showed copy number changes. Gains of DNA sequences were much more frequent than losses, the majority of the gains affecting whole chromosomes or whole chromosome arms. Recurrent findings included copy number increases for chromosomes 8 (seven out of 20 samples; 35%), 1q (five samples; 25%) and 12 (five samples; 25%). The minimal common regions of these gains were the whole chromosomes 8 and 12, and 1q21–22. High-level amplifications affected 8q13–24, 1q and 1q21–22, each once. Southern blot analysis of the specimen with high-level amplification at 1q21–22 showed an amplification of *FLG* and *SPRR3*, both mapped to this region. All cases with a gain of chromosome 12 simultaneously showed a gain of chromosome 8. Comparison of CGH findings with cytogenetic analysis of the same tumours and previous cytogenetic reports of ET showed, in general, concordant results. In conclusion, our findings confirm that secondary changes, which may have prognostic significance in ET, are trisomy 8, trisomy 12 and a gain of DNA sequences in 1q.

Keywords: Ewing family of tumours; comparative genomic hybridization; 1q; chromosome 8; chromosome 12

Ewing's sarcoma is the most frequent bone tumour in children under 10 years of age and the third most common primary malignant bone tumour in adults. It is most commonly located in the bone, but it can also arise in soft tissues. Ewing's sarcoma is closely related to peripheral neuroepithelioma, Askin's tumour and aesthesioneuroblastoma. These tumours are referred to as the Ewing family of tumours (ET), which characteristically show a high expression of the MIC2 antigen (Ambros et al. 1991).

A specific chromosomal abnormality, t(11;22)(q24;q12), is consistently found in ET (Turc-Carel et al. 1988). It fuses *EWS*, a previously uncharacterized gene in 22q12, with *FLII* in 11q24 and generates a hybrid transcript (Delattre et al. 1992). In few cases, the *EWS* gene may be fused with other genes, e.g. *ERG* on chromosome 21 or *ETV1* on chromosome 7 (Zucman et al. 1993; Jeon et al. 1995), both members of the ETS family of transcription factors, like *FLII*. The t(11;22) or a variant translocation affecting either 11q24 or 22q12 has been described in 90% of the cases (Mitelman, 1994).

Other chromosomal abnormalities, without the specificity of the primary change, have been detected repeatedly in ET. These secondary changes contribute to tumour progression and may serve as criteria for the aggressiveness of the disease (Mugneret

et al. 1988). The most common additional changes are trisomies 8 and 12, and der(1;16). This derivative chromosome often leads to trisomy for 1q. Trisomy 8 has been observed in 44% of the cases (Mugneret et al. 1988), trisomy 12 in 29% (Hattinger et al. 1996) and der(1;16) in 18% (Douglass et al. 1990).

Conventional cytogenetic analysis is often difficult in ET owing to the low number of mitotic cells, poor chromosome morphology and banding, and the complex nature of chromosomal changes. Our aim was to evaluate the incidence of the above-mentioned and other non-random additional changes in ET by comparative genomic hybridization (CGH). CGH makes it possible to identify genomic imbalances with tumour DNA as the only requirement. This method is based on the hybridization of differentially labelled tumour DNA and normal DNA to normal metaphase spreads (Kallioniemi et al. 1992). In the present study, we applied CGH to a series of ETs.

MATERIALS AND METHODS

Tumour specimens

The study was carried out on 20 samples from 17 patients (two specimens from the same patient in three cases). The tumour samples and the respective clinical data are listed in Table 1. Some samples were from frozen tissues and some from paraffin sections (cases 15, 16 and 17). The DNAs from the paraffin-embedded samples were extracted according to the protocol published by Miller et al (1988) with slight modifications. The proportion of tumour cells in the paraffin sections ranged from 70% to 95%. For the fresh samples, it was not possible to obtain the corresponding

Received 28 July 1996

Revised 20 November 1996

Accepted 4 December 1996

Correspondence to: S Knuutila, Department of Medical Genetics, Haartman Institute, PO Box 21 (Haartmaninkatu 3), University of Helsinki, FIN-00014, Finland

Table 1 Clinical characteristics of 20 specimens of the Ewing family of tumours

Case no.	Age ^a / sex	Primary tumour ^b	Samples		Metastases at diagnosis	Treatment ^d	Survival ^e
			P/R/M ^c	Location			
1a	24/F	Soft tissue	P	Knee region	-	-	46-
1b	24/F	Soft tissue	P	Knee region	-	+(C)	46-
2a	33/M	Soft tissue	P	Calf	+(Lung)	-	55-
2b	33/M	Soft tissue	P	Calf	+(Lung)	+(C)	55-
3	18/F	Soft tissue	P	Shoulder blade region	-	-	63-
4	27/F	Bone	P	Femur	-	-	58-
5	18/M	Bone	M	Humerus	-	+(C)	71†
6a	36/F	Soft tissue	P	Ankle	-	-	67-
6b	36/F	Soft tissue	P	Ankle	-	+(C)	67-
7	18/F	Soft tissue	M	Spine	-	+(C, R)	58†
8	19/F	Bone	P	Pelvis	-	-	31†
9	49/F	Bone	M	Abdominal subcutis	+(*)	-	11†
10	33/F	Soft tissue	P	Subcutis, thigh	-	-	86-
11	36/F	Soft tissue	P	Buttock	-	-	30†
12	12/F	Bone	P	Rib	-	-	52-
13	3/M	Bone	P	Ulna	-	-	38-
14	16/M	Bone	R	Pelvis	+(Gastrointestinal)	-	33†
15	34/M	Bone	R	Humerus	-	+(C, R)	70†
16	18/M	Bone	R	Femur	-	+(C, R)	32†
17	26/F	Bone	P	Rib**	-	-	26†

^aAge at diagnosis in years. F, female; M, male. ^bCase 6, atypical Ewing's sarcoma; case 9, peripheral primitive neuroectodermal tumour; all the other tumours were typical Ewing's sarcomas. ^cP, primary tumour; R, recurrent tumour; M, metastasis. ^dTreatment before the operation. C, chemotherapy; R, radiation.

^eMonths from diagnosis. -, no evidence of disease; †, dead of disease. *Mediastinum, abdominal cavity, caput of pancreas, abdominal subcutis, SI-joint region with destruction of the pelvic bone. **With pleural and soft-tissue infiltration.

histology, but these samples were always taken with great care from representative areas of the tumours. All cases were re-evaluated by two pathologists (MV and TB) and classified as belonging to the Ewing family of tumours based on histology, staining for the *MIC2* gene product (Dako, Glostrup, Denmark) and/or diagnostic findings in the chromosome analysis. Case 6 represents an atypical Ewing's sarcoma, case 9 a peripheral primitive neuroectodermal tumour and the rest typical Ewing's sarcoma (Navarro et al. 1994).

Labelling procedures for CGH experiments

The DNA samples were labelled by direct and indirect methods. Indirect labelling was used for frozen tumour samples and direct for paraffin-embedded tumour samples. In the indirect method, reference DNA from healthy blood donors and tumour DNA were labelled with digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) and biotin-14-dATP (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) respectively. For the direct method, the normal DNA was labelled with Texas red-5-dUTP (DuPont, Boston, MA, USA) and the tumour DNA with fluorescein-12-dUTP (DuPont). Standard nick translation procedures were used in both.

Comparative genomic hybridization

The hybridizations were performed as described by Kallioniemi et al (1994) with some modifications. Briefly, equal amounts of the two DNAs (500 ng) and 10 µg of human Cot-1 DNA (Gibco BRL) were ethanol precipitated and redissolved in 10 µl of 50% formamide/10% dextran sulphate/2 × saline sodium citrate (SSC). Normal lymphocyte metaphase preparations were denatured at 68–69°C for 2 min in a formamide solution (70% formamide/2 × SSC, pH 7), dehydrated

and treated with proteinase K (0.1 µg ml⁻¹ in 20 mM Tris-HCl/2 mM calcium chloride, pH 7) at 37°C for 7.5 min and dehydrated again. The probe mixture was denatured at 75°C for 5 min, applied to the slides and hybridized for 2–3 days at 37°C.

After the hybridization the slides were washed. In indirect labelling, tumour DNA was detected with tetraethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) conjugated to avidin, and normal DNA with fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-digoxigenin. Chromosomes were counterstained with 10 µg ml⁻¹ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in an anti-fade solution.

Digital image analysis

The hybridizations were analysed using an Olympus fluorescence microscope and the *isis* digital image analysis system (MetaSystems, Altussheim, Germany) based on a high-sensitivity integrating monochrome CCD camera and an automated CGH analysis software package.

Interpretation of CGH results and quality control

Ratio profiles were averaged from between five and ten metaphases per sample (up to 20 chromosome homologues). Gains of DNA sequences were defined as chromosomal regions with a fluorescence ratio above 1.17, and losses as regions with a ratio below 0.85. These cut-off values were based on negative control experiments with normal DNAs using both indirect and direct labelling. In these hybridizations, the fluorescence ratios stayed between 0.85 and 1.17. Alternative statistical thresholds based on the *t*-distribution of the ratio value of balanced chromosomes were also applied. Chromosomal imbalances were confirmed by a 99% confidence

interval. A positive control with known aberrations and a negative control were included in each CGH experiment as quality controls. A ratio over 1.5 was considered to represent a high-level DNA amplification. Heterochromatic regions (1q12, 9q12, 16q11, 13p, 14p, 15p, 21p, 22p and Y chromosome) were excluded from the analysis. The profiles of 1p32-pter, 16p, 17p and chromosomes 19 and 22 were interpreted with caution, because they have been known to give false-positive results (Kallioniemi et al, 1994).

Conventional cytogenetic analysis and interphase in situ hybridization

The methods used for conventional and interphase cytogenetics have been described previously (Tarkkanen et al, 1993).

Southern blot analysis

Preparation of filter blots and hybridization were performed as described previously (Forus et al, 1993). Quantitation of signal intensity was done by two-dimensional densitometry on a Molecular Dynamics laser densitometer. The net signals from specific bands were corrected for unequal sample loading by calibration relative to the signal obtained with an *APOB* control probe and compared with signals from control samples with a normal copy number of the gene (leucocytes). The probes used from 1q21-22 were a cDNA from the *SPRR3* gene (Gibbs et al, 1993; Hohl et al, 1995), kindly provided by Dr Backendorf, and pHCS FLG (Presland et al, 1992), containing a part of the coding region from the 3' end of the human filaggrin gene, kindly provided by Drs Fleckman and Presland. A cDNA probe for the *APOB* gene on human chromosome 2, kindly provided by Dr Breslow (Huang et al, 1985), was used to calibrate for unequal sample loading.

Statistical analyses

The 5-year survival in patients with and without copy number increases in 1q21-22 and in chromosomes 8 and 12 in primary tumours was estimated with the Kaplan-Meier method and the statistical significance tested by the log-rank method. The correlation between overall survival and total number of aberrations in CGH was estimated by the Cox proportional hazards model and the statistical significance with the Wald test.

RESULTS

Comparative genomic hybridization

All DNA sequence copy number changes detected by CGH and chromosome banding data have been listed in Table 2. Fifteen out of the 20 samples (75%) presented DNA sequence copy number changes. Thirteen tumours (65%) showed gains of DNA sequences and five (25%) showed losses. These changes were present at one or more chromosomal sites. On average, there were 2.3 aberrations per sample (range 0-9): 1.9 gains (range 0-9) and 0.4 losses (range 0-2). The mean number of aberrations was 1.5 per sample in primary tumours and in the group of tumour recurrences and metastases 4.4. Gains and losses of whole chromosomes or whole chromosome arms were common (71% of all changes). Three tumours showed high-level amplifications (ratio > 1.5). Figure 1 presents the summary of all chromosomal regions with an increased or decreased DNA sequence copy number. The most frequent changes were gains of chromosomes 8 and 12, and gains in the long arm of chromosome 1. Examples of the fluorescence ratio profiles of these chromosomes are illustrated in Figure 2.

Table 2 CGH^a and cytogenetic results in 20 samples of the Ewing family of tumours

Case no. ^b	Cytogenetic data	CGH data ^c
1a	50, XX, +8, t(10;?) (q?,q?), t(11;22)(q24;q12), +12, +14, +21 [21]	+1q21-22, +8, +12, +14q, +21q
1b	45-50, XX, +8, ?t(11;22)(q24;q12), inc [5]/46, XX nca* [3]	Normal
2a	46, XY, t(11;22)(q24;q12) [1]/46, idem, +der(1;16)(q10;p10), -16 [7]	Normal
2b	Not available	Normal
3	46, XX, del(1)(p?33p?35), add(11)(q12), add(22)(q12) [10]	Normal
4	46-47, XX, -1, -2, -5, add(11)(p?15), ?t(11;22)(q24;q12), +?21, +3mar, inc [cp 12]	+4q27-33, +7q, -11q21-25, -16
5	46, XY [3]	+14q22-32
6a	46, XX [10]	-3q
6b	46, XX [1]	-3q13.3-29
7	49-52, XX, del(2)(p?21), +add(5)(q?23), del(6)(q?12q?16), -9, t(11;22)(q24;q12), der(13;13)(q10;q10), add(14)(q?32), -17, ?add(19)(q13), add(20)(q13), +21, +4-5mar [cp8]/44-46, XX, del(1)(p?32p?36), add(4)(p?12), del(9)(q22), -14, add(19)(q13), +1-2mar [cp2]	+1q, +5, +8/8q13-24, +12, +20q11.2-13.1
8	46-48, XX, +3-4mar, inc [14]	-1p13-36, +1q21-31, -9p
9	47, XX, -4, -10, -15, del(22)(q?12), +3-4mar, inc [4]	+1q/1q21-22, -6q14-25, +7p22-q11.2, +9q
10	42-46, XX, -16, +mar1, +mar2 [cp5]/46, XX [5]	+16q
11	47, XX, +mar, inc [cp6]/46, XX [2]	+6, +8
12	46, XX, -1, -11, -22, +mar1, +mar2, +mar3 [cp19]	Normal
13	51-54, +B, +C, +D, +mar, inc [11]/46, XY [11]	+8
14	47, XY, +i(1)(q10), t(11;22)(q24;q12) [10]	+1q
15	Not available	+2p21-q37, +4, +5p12-15.1, +6, +7, +8, +12, +13q14-34, +18q
16	Not available	+8, +12, +21q21-22
17	Not available	+4, +8, +12, +14q13-32

^aCGH, comparative genomic hybridization. ^bCases 1-14 from frozen tumour tissue samples and cases 15-17 from paraffin sections. ^cHigh-level amplifications are shown in bold. *nca, non-clonal aberrations.

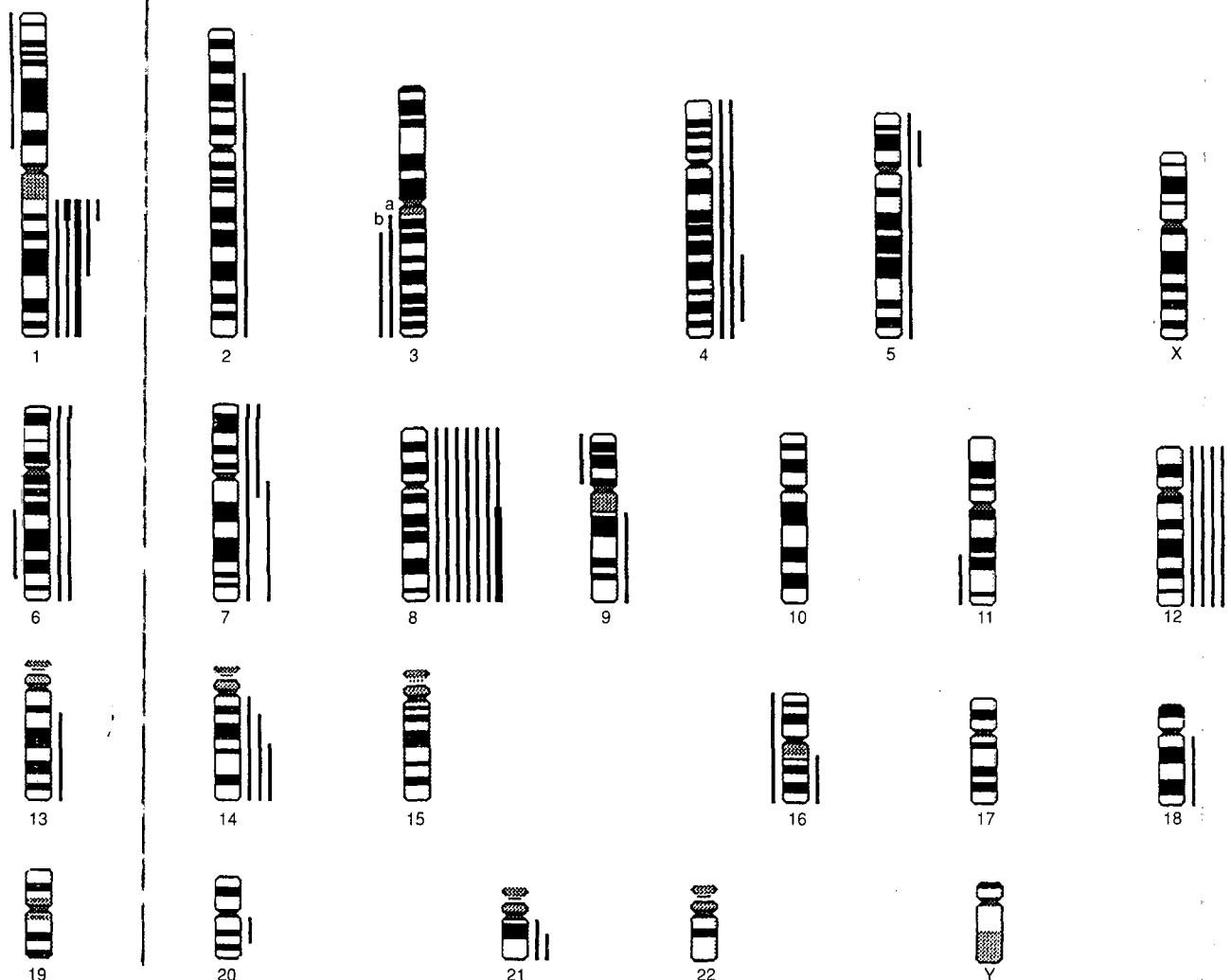


Figure 1 Summary of gains (right) and losses (left) of DNA sequences detected by CGH in 20 samples belonging to the Ewing family of tumours. Two specimens (a and b) are from patient 6. High-level amplifications are represented by thick bars

Chromosome 8 was involved in copy number increases in seven tumours (35%). These gains always affected the entire chromosome. One of the tumours with a gain of the whole chromosome 8 had a high-level amplification in 8q13–24. Five tumours (25%) showed a gain in some region of 1q. Three of these were gains of the whole q-arm (two with a high-level amplification), and the other two showed gains at smaller sites. The minimal common region was 1q21–22, highly amplified in two cases. DNA sequences in the long arm of chromosome 1 and the whole chromosome 8 were simultaneously gained in two samples (cases 1a and 7). Five tumours (25%) presented a gain of chromosome 12, always affecting the entire chromosome. The gain of chromosome 12 was accompanied in all cases by a gain of chromosome 8. Copy number increases were also detected in other chromosomal sites, but at a lower frequency. Regions on 4q and 14q showed gains of DNA sequences in three samples each, whereas other chromosomal regions showed copy number increases only in one or two cases.

Regional copy number losses were detected in six different chromosomes, but only in one case each.

Conventional cytogenetic analysis and interphase in situ hybridization

Cytogenetic analysis was performed in 16 samples (Table 2). Three tumours (2a, 3 and 4) have been reported previously (Tarkkanen et al. 1993). Clonal aberrations were detected in 13 cases, of which six had the typical $t(11;22)(q24;q12)$. In three tumours, the aberrations involved chromosome 11 and/or 22, indicating most probably the involvement of 11q24 and/or 22q12. In four cases, the exact characterization of the clonal aberrations was not possible owing to poor chromosome morphology and banding and the scarcity of mitotic cells. The $der(1;16)(q10;p10)$ in case 2a was confirmed by interphase in situ hybridization with a centromere-specific probe for chromosome 1 as reported previously (Tarkkanen et al. 1993). Three signals were observed in 30% of the cells.

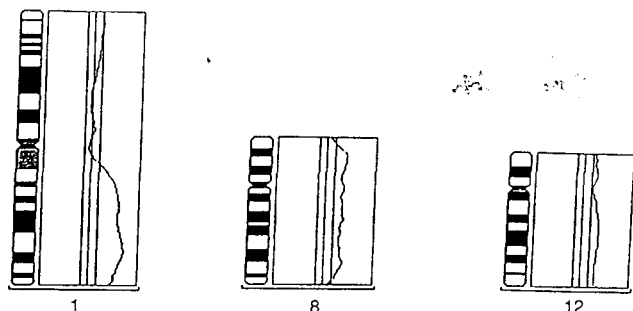


Figure 2 Ratio profiles obtained from the CGH analysis of the Ewing family of tumours. Pictured profiles are those of the chromosomes with the most frequent changes. The line in the middle of the profile indicates the base line ratio (1.0), the lines on the left and right indicate ratio values of 0.85 and 1.17. The aberrations shown are high-level amplification of 1q (case 14), gain of chromosome 8 (case 13) and gain of chromosome 12 (case 17)

Southern blot analysis

Case 9 with a high-level amplification at 1q21–22 was analysed for amplification of two genes in 1q21–22, *SPRR3* and *FLG*, which have previously been found to be amplified in some sarcoma samples (Forus et al. 1996). As shown in Figure 3, both genes were amplified: the signal from *FLG* was 2.7-fold increased compared with the normal sample and the signal from *SPRR3* was 2.1-fold increased (i.e. at least five and four copies respectively).

Statistical analyses

The estimated 5-year survival rate was 78% and 50% in cases without and with a copy number increase at 1q21–22 ($P = 0.57$), 84% and 50% in cases without and with a copy number increase of chromosome 8 ($P = 0.16$), and 78% and 50% in cases without and with a gain of chromosome 12 ($P = 0.3$). There was no statistically significant ($P = 0.24$) correlation between overall survival and the number of aberrations detected by CGH.

DISCUSSION

This study represents the first genome-wide screening of losses and gains of DNA sequences in the Ewing family of tumours (ET). Copy number changes were detected in 15 out of 20 tumours (75%). The most frequent changes include gains of the long arm of chromosome 1 and the whole chromosomes 8 and 12. The low mean number of aberrations, 2.3 per sample, is probably due to the importance of the translocation t(11;22), not detectable by CGH, but may also be caused by normal cell contamination or intratumoural genetic heterogeneity. Copy number changes were detected in all paraffin-embedded tumour samples that are characterized by a high proportion of tumour cells.

A gain of chromosome 8 was observed in 35% of the tumours. This abnormality revealed by CGH confirms previous cytogenetic findings: trisomy 8 has been reported in 44% of the ET (Mugneret et al. 1988). Our CGH results suggest that the main region is smaller and located at 8q13–q24, according to the high-level amplification that was found. This area possibly harbours putative oncogene(s) important in the development and progression of ET. Band 8q24 contains *MYC*, which is known to have an elevated

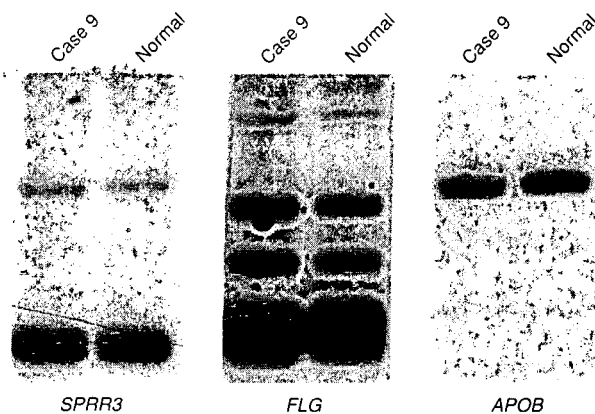


Figure 3 DNA (7 µg) from case 9 was digested with *Hind*III and sequentially hybridized to probes as indicated. Leucocyte DNA was included as a control for normal copy number, and a probe for *APOB* was used to calibrate for unequal sample loading. Signals from *FLG* and *SPRR3* were found to be 2.7-fold and 2.1-fold increased, respectively, when compared with average signals from six normal samples

level of expression in Ewing's sarcoma and related tumours (McKeon et al. 1988). However, it is difficult to establish the role of individual genes when DNA sequence copy number changes affect large regions, because the dosage of numerous genes could be altered simultaneously.

Recurrent gains were also observed in the long arm of chromosome 1 (25%). The gain of DNA sequences in 1q is according to conventional cytogenetic studies of ET. An unbalanced t(1;16) resulting in a non-random derivative chromosome with an extra copy of 1q has been present in 18% of the samples studied (Mugneret et al. 1988; Douglass et al. 1990). By CGH, the minimal common region is 1q21–22. Gains affecting this area have also been reported in different types of soft-tissue sarcoma and in osteosarcoma (Forus et al. 1995a,b; Tarkkanen et al. 1995; Szymanska et al. 1996a). 1q21–22 harbours several genes that may contribute to the development and/or progression of human sarcoma. For example, several members of the S-100 family of calcium-binding proteins are clustered on 1q21, e.g. *CACY* and *CAPL*, the enhanced expression of which is associated with tumour progression or metastasis (Engelkamp et al. 1993). Recently, the amplification of *FLG* and *SPRR3*, located in 1q21, has been reported in some human sarcoma samples (Forus et al. 1996). As shown by the Southern blot analysis, these genes are also amplified in case 9, which by the CGH analysis had a gain in the whole long arm of chromosome 1 with a high-level amplification at 1q21–22.

The present study also revealed gains of the entire chromosome 12 (25%). A recent study reported trisomy 12, detected by conventional cytogenetics and in situ hybridization studies, in 29% of ET (Hattinger et al. 1996). Several oncogenes have been mapped to this chromosome, including *SAS*, *CHOP/GADD153*, *GLI* and *A2MR*, frequently amplified in human sarcomas (Smith et al. 1992; Forus et al. 1993), and *MDM2* and *CDK4*, known to be amplified also in ET (Ladanyi et al. 1995). Even though all these genes are located in a narrow area (12q13–15) (Mitchell et al. 1995), other studies in soft-tissue sarcomas have also shown other regions of chromosome 12 involved in gains of DNA sequences, such as 12q21–22 and 12q24 (Suijkerbuijk et al. 1994; Forus et al.

1995b). Furthermore, microsatellite repeat analysis in the 12q13–22 region shows the presence of separate amplicons (Wolf et al, 1997). These results support our findings of a gain of the whole chromosome 12.

All cases with a gain of chromosome 12 also showed a gain of the whole chromosome 8, this finding suggesting that a simultaneous gain of chromosomes 8 and 12 contributes to the tumorigenesis and progression of ET. In addition, gains of 8q, 1q and 12q have been described previously by CGH in osteosarcoma (Tarkkanen et al, 1995), parosteal osteosarcoma (Szymanska et al, 1996b) and soft-tissue sarcomas (Suijkerbuijk et al, 1994; Forus et al, 1995b; Szymanska et al, 1996a).

Losses were very rare and non-recurrent. There were five times more gains than losses, which, together with the presence of some highly amplified regions, suggests that gains of genetic material are more significant than losses for the development and progression of ET.

In general, the data from CGH and cytogenetic analyses did not show any disagreement. In cases 1a and 14, we obtained exactly the same numerical changes by both methods. In the rest of the samples, the poor quality of the chromosomes made it difficult to determine the exact karyotype. The presence of markers and multiple subclones may explain the differences between CGH and cytogenetics in these samples. Furthermore, an interphase cytogenetic study with a centromere-specific probe for chromosome 1 was performed in one case with der(1;16)(q10;p10), which leads to partial trisomies of 1q and partial monosomies of 16q. The abnormality was present only in 30% of the cells analysed (Tarkkanen et al, 1993). The low frequency of the clone could explain the normal karyotype found by CGH.

Our CGH analysis shows that many loci frequently show copy number changes in ET. However, the critical and primary event in the tumorigenesis of ET is most likely the t(11;22) or a variant translocation. The secondary abnormalities are the gain of chromosomes 8 and 12, and the gain of DNA sequences in 1q, which agree with cytogenetic studies. As one of the known translocations is a likely primary event, it is possible that these additional changes may have prognostic significance. Owing to the limited number of cases in the present study, testing of the statistical significance of the prognostic effect of these changes is associated with a high risk of a type II statistical error. It is of interest to note, however, that copy number increases in 1q and in chromosomes 8 and 12 were all associated with (non-significant) trends to poor survival. To evaluate this further, a larger number of patients needs to be studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona (GA), the Clinical Research Institute of the Helsinki University Central Hospital (MT), the Finnish Medical Society Duodecim (MT), the Foundation of Orthopaedics and Traumatology in Finland (MT), the Finnish Cancer Society (MT, SK) and the Norwegian Cancer Society (AF).

REFERENCES

- Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gagner H and Salzer-Kuntschik M (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer* **67**: 1886–1893
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A and Thomas G (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**: 162–165
- Douglass EC, Rowe ST, Valentine M, Parham D, Meyer WH and Thompson EJ (1990) A second nonrandom translocation, der(16)t(1;16)(q21;q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Cytogenet Cell Genet* **53**: 87–90
- Engelkamp D, Schäfer BW, Mattei MG, Erne P and Heizmann CW (1993) Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6547–6551
- Forus A, Florenes VA, Mælandsmo GM, Meltzer PS, Fodstad Ø and Myklebost O (1993) Mapping of amplification units in the q13–14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include *MDM2*. *Cell Growth Differ* **4**: 1065–1070
- Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad Ø, Myklebost O and van Kessel AG (1995a) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas. II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chrom Cancer* **14**: 15–21
- Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad Ø, Myklebost O and van Kessel AG (1995b) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas. I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21–q22 in soft tissue sarcomas. *Genes Chrom Cancer* **14**: 8–14
- Forus A, Weierman MAJ, Van Kessel AG, Berner J-M, Fodstad Ø and Myklebost O (1996) Characterisation of 1q21–22 amplifications in human sarcomas by CGH and molecular analysis. *Cytogenet Cell Genet* **72**: 148
- Gibbs S, Fijneman R, Wiegant J, Geurts van Kessel A, van de Putte P and Backendorf C (1993) Molecular characterisation and evolution of the SPKR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics* **16**: 630–637
- Hattinger CM, Rimpler S, Strehl S, Ambros IM, Zoubek A, Stark B, Koscielniak E, Gagner H and Ambros PF (1996) Chromosomal aberrations in Ewing tumors: an evaluation by conventional cytogenetics and in situ hybridization techniques. 5th European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours. Baveno, Italy, 173.
- Hohl D, de Viragh PA, Amiguet-Barras F, Gibbs S, Backendorf C and Huber M (1995) The small proline-rich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified cell envelope precursor proteins. *J Invest Dermatol* **104**: 902–909
- Huang LS, Bock SC, Feinstein SI and Breslow JL (1985) Human apolipoprotein B cDNA clone isolation and demonstration that liver apolipoprotein B mRNA is 22 kilobases in length. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6825–6829
- Jeon I-S, Davis N, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT and Shapiro DN (1995) A variant of Ewing's sarcoma translocation t(7;22) fuses the *EW5* gene to the ETS gene *ETV1*. *Oncogene* **10**: 1229–1234
- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818–821
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW and Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chrom Cancer* **10**: 231–243
- Ladanyi M, Lewis R, Jhanwar SC, Gerald W, Huvos AG and Healey JH (1995) *MDM2* and *CDK4* gene amplification in Ewing's sarcoma. *J Pathol* **175**: 211–217
- McKeon C, Thiele CJ, Ross RA, Kwan M, Triche TJ, Miser JS and Israel MA (1988) Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res* **48**: 4307–4311
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNAs from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215
- Mitchell EL, White GR, Santibanez-Koref MF, Varley JM and Heighway J (1995) Mapping of gene loci in the q13–15 region of chromosome 12. *Chrom Res* **3**: 261–262
- Mitelman F (1994) *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*, 5th edn. Wiley-Liss: New York
- Mugneret F, Lizard S, Aurias A and Turc-Carel C (1988) Chromosomes in Ewing's sarcoma. II. Nonrandom additional changes, trisomy 8 and der(16)t(1;16). *Cancer Genet Cytogenet* **32**: 239–245
- Navarro S, Cavazzana AO, Lombart-Bosch A and Triche TJ (1994) Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* **118**: 608–615
- Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunskisiri W and Dale BA (1992) Characterisation of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organisation and identification of an S-100 like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem* **267**: 23772–23781

- Smith SH, Weiss SW, Jankowski SA, Coccia MA and Meltzer PS (1992) SAS amplification in soft tissue sarcomas. *Cancer Res* **52**: 3746–3749
- Suijkerbuijk RF, Olde Weghuis DEM, Van Den Berg M, Pedeutour F, Forus A, Myklebost O, Glier C, C T-C and Van Kessel AG (1994) Comparative genomic hybridization as a tool to define two distinct chromosome 12-derived amplification units in well-differentiated liposarcomas. *Genes Chrom Cancer* **9**: 292–295
- Szymanska J, Tarkkanen M, Wiklund T, Virolainen M, Blomqvist C, Askö-Seljavaara S, Tukiainen E, Elomaa I and Knuutila S (1996a) Gains and losses of DNA sequences in liposarcomas evaluated by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* **15**: 89–94
- Szymanska J, Mandahl N, Mertens F, Tarkkanen M, Karaharju E and Knuutila S (1996b) Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13–15. A combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Genes Chrom Cancer* **16**: 31–34
- Tarkkanen M, Kaipainen A, Karaharju E, Böbling T, Szymanska J, Heliö H, Kivioja A, Elomaa I and Knuutila S (1993) Cytogenetic study of 249 consecutive patients examined for a bone tumor. *Cancer Genet Cytogenet* **68**: 1–21
- Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, Elomaa I, Kivioja A, Nevalainen J, Böbling T, Karaharju E, Hyytinen E, Knuutila S and Kallioniemi O-P (1995) Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **55**: 1334–1338
- Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner J, Volk C, Thiery JP, Olschwang S, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM and Mazabraud A (1988) Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases and remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* **32**: 229–238
- Wolf M, Aaltonen LA, Szymanska J, Tarkkanen M, Blomqvist C, Berner J-M, Myklebost O and Knuutila S (1997). Complexity of 12q13–22 amplicon in liposarcoma – microsatellite repeat analysis. *Genes Chrom Cancer* **18**: 66–70
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G and Delattre O (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* **12**: 4481–4487

Article II

Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors

Cancer Genetics and Cytogenetics (en premsa)



Clinical Correlations of Genetic Changes by Comparative Genomic Hybridization in Ewing Sarcoma and Related Tumors

M. Tarkkanen, S. Kiuru-Kuhlefelt, C. Blomqvist, G. Armengol, T. Böhling, T. Ekfors, M. Virolainen, P. Lindholm, O. Monge, P. Picci, S. Knuutila, and I. Elomaa

ABSTRACT: Our previous comparative genomic hybridization (CGH) study of Ewing sarcoma and related tumors showed that DNA sequence copy number increases of 1q21~q22 and of chromosomes 8 and 12 were associated with trends toward poor survival (Armengol et al., *Br J Cancer* 1997, 75, 1403-1409). These trends were not statistically significant. In the present study, we analyzed 28 primary Ewing sarcomas and related tumors by CGH to study whether these (or other) changes have prognostic value in these tumors. Twenty-one tumors (75%) had changes with a mean of 1.9 changes per tumor. The most frequent aberration was gain of chromosome 8 in 10 tumors (36%). Five tumors (18%) had copy number increases at 1q21~22 and 5 had gain of 7q. Copy-number increase of 6p21.1~pter, gain of chromosome 12, and loss of 16q were seen in 11%. Copy-number increases of 1q21~q22 and of chromosomes 8 and 12 were associated with trends toward worse outcome, but the differences did not reach statistical significance. A novel finding is the association of copy-number increase at 6p with worse distant disease-free ($P = 0.04$) and overall survival ($P = 0.004$). To confirm this finding and to see whether copy-number increases of 1q21~q22 and of chromosomes 8 and 12 have definite prognostic value, a larger material needs to be studied. © Elsevier Science Inc., 1999. All rights reserved.

INTRODUCTION

Ewing sarcoma is a highly malignant primitive tumor characterized by uniform, densely packed small cells with round nuclei [1]. Tumors very closely related to Ewing sarcoma are atypical Ewing sarcoma, primitive neuroecto-

dermal tumor (PNET), and esthesioneuroblastoma. These tumors can arise in bone or soft tissue. With current treatment regimens, 5-year disease-free survival rates are more than 50% [2, 3]. The most important clinical prognostic parameters are tumor size [4], location [5], and histologic response to chemotherapy [6]. Patients with metastatic disease at presentation have a poor prognosis [3, 5].

The characteristic translocation t(11;22)(q24;q12) is seen in more than 80% of Ewing sarcoma and related tumors by cytogenetics [7]. The translocation fuses *EWS* (22q12) with *FLI1* (11q24), a member of the ETS family of transcription factors [8, 9]. The translocation results in the expression of a chimeric protein that acts as a more potent transcription activation factor than normal *FLI1* [10]. In some tumors, *EWS* fuses with other ETS members: *ERG* (21q22) [11], *ETV1* (7p22) [12], *E1AF* (17q21) [13], and *FEV* (2q33) [14]. Fusion of different ETS genes to *EWS* leads to a similar tumor phenotype, and no correlations between different translocation partners and clinical features or prognosis have been detected. Several *EWS-FLI1* and *EWS-ERG* transcript types, with different breakpoints resulting in different exon-exon combinations, were reported [11]. In two recent studies, fusion type I [9] was associated with a better prognosis [15, 16].

From the Laboratory of Medical Genetics (M. T., S. K.-K., S. K.) and the Department of Oncology (C. B., I. E.), Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland; the Department of Medical Genetics (M. T., S. K.-K., S. K.) and the Department of Pathology (T. B., M. V.), Haartman Institute, University of Helsinki, Helsinki, Finland; the Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal, i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona (G. A.), Barcelona, Spain; the Department of Pathology (T. E.), and the Department of Oncology (P. L.), Turku University Central Hospital, Turku, Finland; the Department of Oncology, Haukeland University Hospital (O. M.), Bergen, Norway; and the Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituto Ortopedico Rizzoli (P. P.), Bologna, Italy.

Address reprint requests to: Maija Tarkkanen, M.D., Ph.D., Laboratory of Medical Genetics, Helsinki University Central Hospital and Department of Medical Genetics, Haartman Institute, P. O. Box 21, FIN-00014 University of Helsinki, Finland.

Received August 20, 1998; accepted January 28, 1999.

Table 1 Clinical and histopathological characteristics of 28 Ewing sarcomas and related tumors analyzed by CGH

Case number ^a	Sex/Age	Histology	Location	Bone vs. soft tissue tumor	Tumor size ^b	Stage at diagnosis	Outcome ^c
1 (1) F	F/24	ES ^d	Knee region	Soft tissue	18 × 7 × 6	M1	52 NED
2 (2) F	M/33	ES ^d	Calf	Soft tissue	10 × 20	M1	61 NED
3 (3) F	F/18	ES	Shoulder blade region	Soft tissue	9 × 11 × 3	M0	71 NED
4 (4) F	F/27	ES ^d	Femur	Bone	10 × 15	M0	64 NED
5 (6) F	F/36	aES	Ankle	Soft tissue	10 × 7 × 3	M0	68 NED
6 (8) F	F/19	ES	Pelvis	Bone	7 × 5	M0	31 DOD
7 (10) F	F/33	ES	Subcutis, thigh	Soft tissue	7 × 3	M0	86 NED
8 (11) F	F/36	ES	Buttock	Soft tissue	15 × 8 × 10	M0	30 DOD
9 (12) F	F/12	ES	Rib	Bone	4.4 × 4.4	M0	52 NED
10 (13) F	M/2	ES	Ulna	Bone	6.5	M0	38 NED
11 (17) P	F/26	ES	Rib ^e	Bone	6	M0	26 DOD
12 P	M/18	ES	Thigh	Soft tissue	20 × 10 × 5	M0	54 NED
13 P	F/21	ES	Forearm	Soft tissue	8 × 7 × 6	M1	5 DOD
14 P	M/30	ES	Calf	Soft tissue	—	M0	33 DOD
15 P	F/49	ES	Thigh	Soft tissue	10 × 8 × 5	M1	2 DOD
16 P	F/26	PNET	Back	Soft tissue	20 × 10 × 7	M0	17 DOD
17 P	M/17	ES	Calf	Soft tissue	4 × 3	M0	12 NED
18 F	F/20	ES ^d	Knee region	Soft tissue	8 × 12	M1	14 DOD
19 P	F/29	ES	Retroperitoneum	Soft tissue	7	M0	10 NED
20 P	M/28	ES	Tibia	Bone	6 × 4	M1	8 DOD
21 P	M/8	ES	Femur	Bone	6 × 6	M0	48 NED
22 P	F/32	ES	Spine	Soft tissue	6 × 3	M1	25 DOD
23 P	F/8	ES	Femur	Bone	10 × 8	M0	68 NED
24 P	F/27	ES	Sacrum	Bone	9 × 6	M1	19 DOD
25 F	M/28	PNET	Hand	Soft tissue	1.5	M0	5 NED
26 P	M/18	PNET ^d	Tibia	Bone	15 × 6	M0	31 NED
27 P	F/24	ES	Sacrum	Bone	10 × 12	M0	65 NED
28 P	F/2	ES	Radius	Bone	3.5 × 9	M0	65 NED

Abbreviations: DOD, dead of disease; ES, Ewing sarcoma; aES, atypical Ewing sarcoma; F, fresh sample; M0, no distant metastases at diagnosis; M1, distant metastases at diagnosis; NED, no evidence of disease; P, paraffin sample; PNET, primitive neuroectodermal tumor.

^aCorresponding case numbers from [20].

^bSize in centimeters.

^cSurvival in months.

^dt(11;22)(q24;q12) by cytogenetics.

^eWith pleural and soft-tissue infiltration.

Secondary changes common in Ewing sarcoma and related tumors are trisomy 8, trisomy 12, and der(1;16), the last with different breakpoints reported but leading often to trisomy of 1q and monosomy of 16q. Trisomy 8 was reported in 44–56% of the cases [17–19] and trisomy 12 in 29% [18] and 33% [17]. Der(1;16) was detected in 17–18% [18, 19]. These changes were also detected in our first comparative genomic hybridization (CGH) study of Ewing sarcoma and related tumors; copy-number increases of chromosome 8, chromosome 12, and of 1q21~q22 were detected with frequencies of 35%, 25%, and 25% [20]. Whether these secondary aberrations have prognostic significance is not known. In our previous study, statistical analysis was carried out with 11 patients [20]. The estimated 5-year survival rates were 78% and 50% in cases without and with a gain at 1q21~22 ($P = 0.57$), 84% and 50% without and with a gain of chromosome 8 ($P = 0.16$), and 78% and 50% without and with a gain of chromosome 12 ($P = 0.3$) [20]. In the present study, we increased the number of patients and evaluated whether secondary aberrations detected by CGH have prognostic value in Ewing sarcoma and related tumors.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Tumor Specimens

Twenty-eight samples of Ewing sarcoma and related tumors from 28 patients were obtained for the analysis (Table 1). Sixteen samples were obtained from the Helsinki University Central Hospital, five from the Rizzoli Institute, two from the Turku University Central Hospital, and five from the Scandinavian Sarcoma Group. The samples were obtained from primary tumors before the initiation of therapy.

The cases were classified as Ewing sarcoma and related tumors on the basis of a combined cytologic, histologic, and immunohistologic examination. *MIC2* gene product staining (Dako, Glostrup, Denmark) and cytogenetic analysis were performed when possible. Reports on 11 patients (cases 1–11 in Table 1) were published previously [20]. Histologically, 24 cases were classified as typical Ewing sarcoma, one as atypical Ewing sarcoma, and three as PNET [21]. Sixteen tumors were of soft tissue origin and 12 of bone.

Sixteen samples were from paraffin sections and 12 were fresh samples (Table 1). DNA from paraffin sections

was extracted as described by Miller et al. [22]. The proportion of tumor cells in paraffin sections ranged from 50% (= 50–75%) to almost 100% (= 75–100%). For the fresh samples, it was not possible to obtain the corresponding tumor cell proportion, but the samples were taken with care from representative areas of the tumors.

Patients 1–6, 8, 11, 17–22, and 24–28 were treated according to the SSG IX protocol in Ewing sarcoma, activated by the Scandinavian Sarcoma Group in 1990 [3]. Patients 9 and 10 received ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide [23]. Patients 13–15 were treated according to the VAC regiment [24]. Patients 12 and 16 were treated according to the VAC-VAI regimen [25]. Patient 23 was treated according to the SSG IV protocol [2,26]. Patient 7 was treated by surgery only.

Comparative Genomic Hybridization

CGH was performed as described earlier [20, 27]. Briefly, tumor DNA was labeled with fluorescein isothiocyanate-12-dUTP (DuPont, Boston, MA), and reference DNA was labeled with Texas red-5-dUTP (DuPont) by nick translation to obtain DNA fragments ranging from 600 to 2,000 base pairs. The hybridization mixture contained 800 ng of labeled tumor DNA, 800 ng of labeled reference DNA, and 20 µg of Cot-1 DNA in 10 µL of hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2 × SSC). The hybridization was started after 5-minute denaturation, at 75°C, of the hybridization mixture and 2-minute denaturation of the metaphase spread slides in 70% formamide/2 × SSC at 68°C.

After 2–3 days of hybridization at 37°C, the slides were washed three times in 50% formamide/2 × SSC (pH 7), twice in 2 × SSC, and once in 0.1 × SSC at 45°C, followed by 2 × SSC, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1% NP40 (pH8), and distilled water at room temperature for 10 minutes each. The slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) and mounted with an antifading medium (Vectashield, Vector Laboratories).

The hybridizations were analyzed with the use of an Olympus fluorescence microscope and the ISIS digital image analysis system (Metasystems GmbH, Altlussheim, Germany) based on an integrated high-sensitivity monochrome charge-coupled device (CCD) camera and automated CGH analysis software. Three-color images—red for reference DNA, green for tumor DNA, and blue for counterstaining—were acquired from six to nine metaphases of good quality from each sample. The green and red fluorescence intensities were calculated, and the red-to-green ratio profiles along the chromosome axis were displayed. Chromosomal regions were interpreted as overrepresented when the green-to-red ratio exceeded 1.17 (gains) and as underrepresented with the ratio less than 0.85 (losses). These cutoff values were derived from negative control experiments in which two differentially labeled normal DNAs were hybridized against another. In these negative controls, the normal variation did not exceed the cutoff limits of 1.17 and 0.85. Copy-number increases higher than 1.5 were interpreted as high-level amplifications (for a review on amplifications detected in different neo-

plasms by CGH, the 1.5 threshold, and the sensitivity of CGH, see [28], also available at http://www.helsinki.fi/~lgl_www/CMG.html). The results were confirmed by using a 99% confidence interval.

A negative control from peripheral blood of a healthy donor and a positive control from a tumor with known DNA copy-number changes were included in each CGH experiment.

Statistical Analysis

The most frequent aberrations and the total number of aberrations per tumor detected by CGH were tested for prognostic significance. Distant disease-free survival (DDFS) and overall survival (OS) rates (evaluated from the time of diagnosis) were estimated in accord with the Kaplan-Meier method. Associations of copy-number changes, tumor size (largest diameter > 8 cm or ≤ 8 cm), and tumor location with OS, DDFS, and local recurrence were tested with the log-rank test. The statistical significance of the total number of aberrations was tested with a Cox regression analysis.

RESULTS

Outcome of the Patients

Seventeen (61%) of the patients are alive with no evidence of the disease after a median follow-up of 60 months (range, 10–86 months). Eleven patients (39%) died of the disease after a median follow-up of 19 months (range, 2–33 months). Eight patients had distant metastases at the time of the diagnosis: six of these patients died of the disease after a median of 11 months of follow-up, and two patients are alive with no evidence of disease.

Comparative Genomic Hybridization

Twenty-one of 28 tumors (75%) had changes in CGH. Nineteen tumors (68%) had gains of DNA sequence copy number, and seven (25%) had losses. Three high-level amplifications were detected. On average, there were 1.9 changes per tumor (range 0–5): 1.6 gains (range 0–5), and 0.4 losses (range 0–2). In the tumors with aberrations, the mean number of changes per tumor was 2.6. Gains and losses of whole chromosomes or chromosome arms were common (85% of all changes). A summary of the changes detected by CGH is shown in Fig. 1, and the copy-number karyotypes are shown in Table 2.

The most frequent changes was a gain of whole chromosome 8, present in 10 tumors (36%; Table 3). Five tumors (18%) had copy-number increases at 1q, with the minimal common region of 1q21~22. Gains of chromosomes 1q and 8 were simultaneously present in three tumors. Five tumors (18%) had a gain of 7q. Changes seen in three tumors each (11%) were copy-number increase of 6p21.1~pter, gain of whole chromosome 12, and loss of 16q.

Prognostic Implications of the Aberrations Detected by CGH and of Tumor Size and Location

Patients without and with a copy-number increase at 6p21.1~pter had a 5-year DDFS of 63% and 0% ($P = 0.04$)

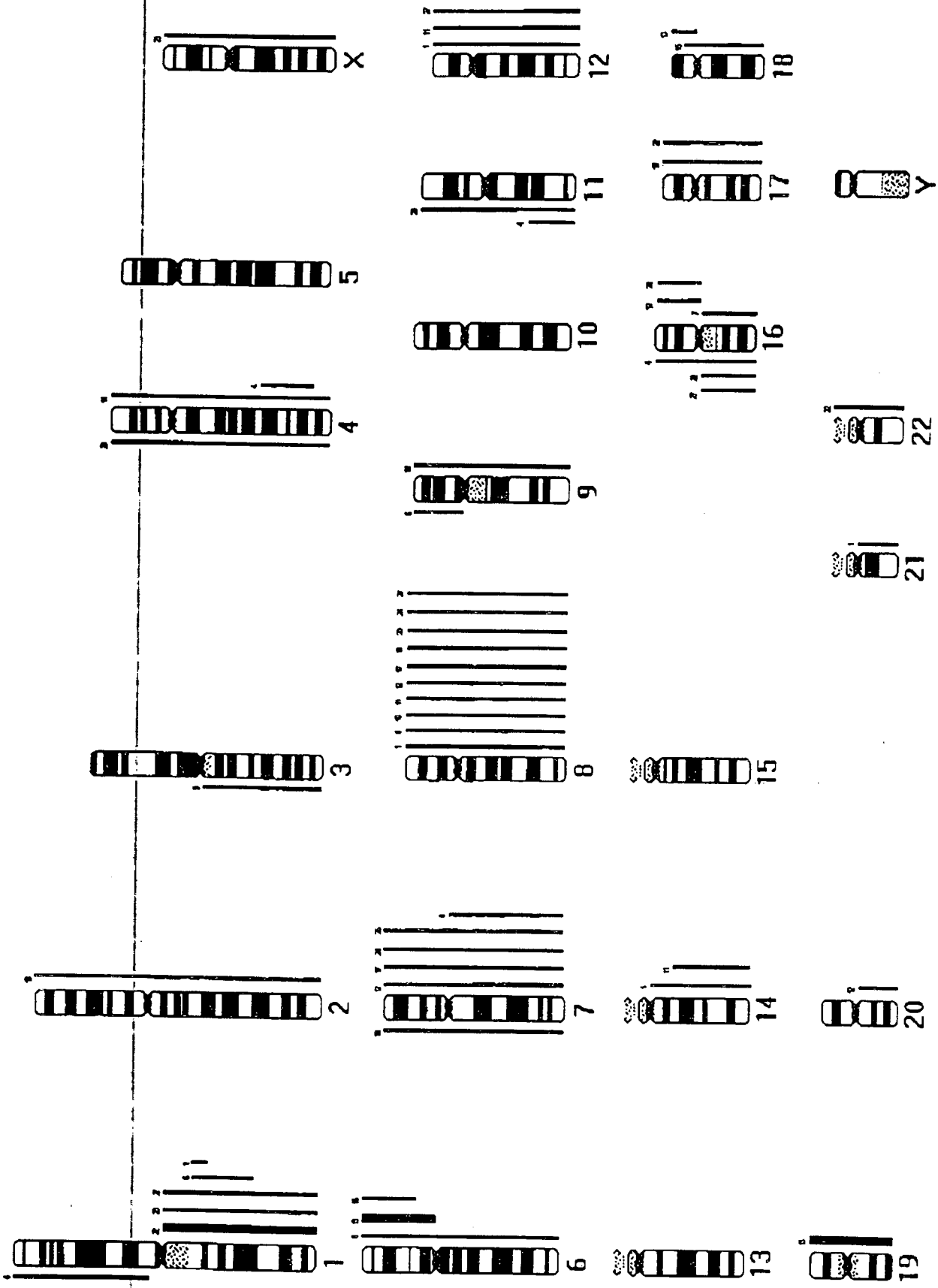


Figure 1 Summary of gains, high-level amplifications, and losses of DNA sequence copy number in 28 samples of Ewing sarcoma and related tumors analyzed by CGH. Losses are shown on the left and gains are shown on the right side of the chromosomes. Each line represents a genetic aberration seen in one sample. High-level amplifications are indicated by thick lines. Numbers refer to case numbers in Table 1.

Table 2 CGH results of 28 Ewing sarcomas and related tumors

Case number ^a	CGH ^b
1 (1)	+1q21~22, +8, +12, +14q, +21q
2 (2)	Normal
3 (3)	Normal
4 (4)	+4q27~33, +7q, -11q21~25, -16
5 (6)	-3q
6 (8)	-1p13~36, +1q21~31, -9p
7 (10)	+16q
8 (11)	+6, +8
9 (12)	Normal
10 (13)	+8
11 (17)	+4, +8, +12, +14q13~32
12	+7, +8, +16p, +20q
13	++6p, +18p, ++19
14	Normal
15	+18p11~qter
16	+6p21.1~pter
17	+7, +8
18	+2, +8, +9, +17
19	-7
20	+1q, -4, +8, -11
21	+X
22	++1q, -16q, +16p, +17, +22
23	Normal
24	+7, +8
25	Normal
26	+7
27	+1q, +8, +12, -16q
28	Normal

^aCorresponding case numbers from [20] in parentheses.

^b+, gain of DNA sequence copy number; ++, high-level amplification; -, loss.

and a 5-year OS of 64% and 0% ($P = 0.004$). Copy-number increases of 1q21~q22 and of chromosome 8 were associated with trends toward worse DDFS and OS; gain of chromosome 12 was associated with a trend toward worse DDFS. These and other tested genetic aberrations are shown in Table 4. The total number of changes per tumor had no significant impact on DDFS ($P = 0.08$) or OS ($P = 0.13$), and none of the tested genetic changes had any effect on the risk of local recurrence.

Tumor size was not significantly associated with DDFS ($P = 0.57$), OS ($P = 0.42$), or local recurrence ($P = 0.7$). Extremity versus nonextremity location of the tumor had no significant effect on DDFS ($P = 0.67$), OS ($P = 0.16$), or local control ($P = 0.62$).

DISCUSSION

The findings of the present study show that DNA sequence copy-number aberrations are infrequent in Ewing sarcoma and related tumors, inasmuch as only a mean of 1.9 aberrations per tumor was detected. High-level amplifications were rare. These findings indicate the importance of the characteristic translocation t(11;22)(q24;q12) in the tumorigenesis of these tumors. The findings are similar to those for biphasic synovial sarcomas [29]. With the low number of changes, these tumors differ from other

Table 3 Recurrent changes by comparative genomic hybridization in 28 Ewing sarcomas and related tumors

Minimal common region	Frequency (n/total and %)
+8	10 (36)
+/+ +1q21~22	5 (18)
+7q	5 (18)
+/+ +6p21.1~pter	3 (11)
+12	3 (11)
-16q	3 (11)

Note: +/+, gain/high-level amplification; -, loss.

high-grade sarcomas such as osteosarcoma, MFH, and chondrosarcoma, in which mean number of aberrations is higher and high-level amplifications are frequent [27, 30, 31].

The most frequent change was a gain of chromosome 8, present in 10 tumors (36%). In previous cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies, the frequency of this gain was 44% [19] and 56% [18]; clinical details were not provided. Maurici et al. [17] found trisomy 8 in 44% of primary tumors, 83% of local recurrences, and 33% of metastases by FISH: a majority of the metastatic samples were obtained at the time of the diagnosis. In our previous study, the frequency of chromosome 8 gain was 29% in primary tumors, 67% in local recurrences, and 33% in metastases (all metastatic samples obtained at relapse) [20]. Thus these preliminary findings suggest that trisomy 8 might be more frequent in local recurrences. Gains of chromosome 8 are frequent in myeloid leukemias, myelodysplastic syndromes, and solid tumors, including sarcomas. Gains of 8q are more frequent in recurrent prostate cancer than in primary tumors [32]. In node-negative breast cancer, high-level amplification of 8q was significantly associated with recurrence [33]. Osteosarcoma patients with copy-number increases at 8q had a statistically significant worse DDFS ($P = 0.003$) and a trend toward worse OS ($P = 0.04$) [34]. In the present study, a gain of chromosome 8 was associated with a statistically nonsignificant trend toward worse outcome: 5-year DDFS and OS for patients without and with a gain of chromosome 8 were 65% and 40% ($P = 0.16$) and 63%

Table 4 Prognostic implications of genetic changes detected by CGH in 28 Ewing sarcomas and related tumors

CGH ^a	5-year DDFS			5-year OS		
	No ^b	Yes ^c	P	No ^b	Yes ^c	P
+/+ +6p21.1~pter	63%	0%	0.04	64%	0%	0.004
+/+ +1q21~q22	59%	40%	0.30	60%	40%	0.45
+8	65%	40%	0.16	63%	45%	0.39
+12	59%	33%	0.36	55%	67%	0.67
+7q	51%	80%	0.30	53%	75%	0.45
-16q	54%	67%	0.75	55%	67%	0.7

Note: +/+, gain/high-level amplification; -, loss.

^aGenetic aberration detected by comparative genomic hybridization.

^bPatients without the aberration.

^cPatients with the aberration.

Ali

and 45% ($P = 0.39$), respectively. Thus a gain of chromosome 8 might be a sign for worse prognosis in Ewing sarcoma and related tumors.

Der(1;16), leading to trisomy of 1q and monosomy of 16q, was detected in 15% [35] and 18% [19] by cytogenetics and in 17% by FISH [18]. In our previous study, the frequency of 1q21~22 copy-number increase, frequent in different sarcoma types [28], was 14% in primary tumors, 33% in local recurrences, and 67% in metastases [20]. In the present study, copy-number increase of 1q21~q22 was seen in 18% and was associated with statistically nonsignificant trends toward worse DDFS and OS.

The frequency of chromosome 12 gain in primary tumors was 11%. Cytogenetic studies showed gain of chromosome 12 in 9% [19] and FISH studies in 29% [18]. Maurici et al. [17] found gain of chromosome 12 of 26% of primary tumors, 50% of local recurrences, and 33% of metastases. It is noteworthy that trisomy 12 was usually present in the minority of cells evaluated by FISH [17]. Thus this gain might be underrepresented in cell cultures and, if present in less than 50% of the cells, will remain undetected by CGH. However, trisomy 12 might also be associated with progression: in our previous study, the frequency of this gain was lower in primary tumors than in the group of local recurrences and metastases (14% vs. 50%, respectively) [20]. Trisomy 12 is a frequent finding in CLL, non-Hodgkin lymphoma, and several solid tumors [36], and amplifications at 12q13-22 with several genes affected are frequent in different sarcoma types [28]. In the present study, gain of chromosome 12 was associated with a trend toward worse DDFS, but no significance was detected for the gain of chromosome 12 in OS.

A novel finding is the association of copy-number increases at 6p21.1~pter with poor outcome: patients without and with a copy-number at 6p21.1-pter had a 5-year DDFS of 63% and 0% ($P = 0.04$) and OS of 64% and 0% ($P = 0.004$). However, all three patients with this aberration had clinical signs associated with poor prognosis: patient 13 had metastatic disease at the time of diagnosis and patients 8 and 16 had central, large tumors (Table 1). All three patients died of the disease after a median follow-up of 17 months. Thus it is currently difficult to estimate the significance of copy-number increase at 6p21.1-pter; neither are the genes affected by this aberration yet known.

Although previous studies showed tumor size and location to be prognostic factors [4, 5], such correlations were not detected in the present study. This is probably due to the limited size of the material.

In conclusion, CGH studies of Ewing sarcoma and related tumors reveal a low number of secondary aberrations and thus the importance of the primary translocation. Secondary aberrations (copy-number increases of 1q21~q22, chromosome 8, and chromosome 12) are associated with trends toward worse outcome, but these aberrations were not statistically significant. A novel finding is the association of copy-number increase at 6p with poor prognosis. To confirm this finding and to see whether copy-number increases of 1q21~q22, chromosome 8, and chromosome 12 have definite prognostic value in Ewing sarcoma and related tumors, a large number of patients needs to be

studied. To do so is difficult, however, considering the rarity of these tumors and the frequent use of fine-needle biopsies for diagnostics.

The study was supported by the Clinical Research Institute of Helsinki University Central Hospital, Helsinki University Central Hospital, and Leiras Research Foundation. We thank Dr. Kindblom (Sahlgren University Hospital, Gothenburg), Dr. Halvorsen (University Hospital, Trondheim), and Dr. Sundström (Academic hospital, Uppsala) for providing samples.

REFERENCES

- Huvos AG (1991): Ewing's Sarcoma. In: Bone Tumors: Diagnosis, Treatment and Prognosis. ed 2, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 523-552.
- Sæter G, Alvegård TA, Elomaa I, Wiebe T, Björk O, Strander H, Solheim ØP (1997): Chemotherapy for osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Acta Orthop Scand* 68:120-125.
- Elomaa I, Blomqvist C, Sæter G, Alvegård TA, Åkerman M, Wiebe T, Björk O, Brosjö O (1996): Five years results of the SSG IX protocol in Ewing's sarcoma. *Med Pediatr Oncol* 27(A):0-57.
- Göbel V, Jürgens H, Etpüler G, Kemperdick H, Jungblut RM, Stienen U, Göbel U (1987): The prognostic significance of tumor size in localized Ewing's sarcoma of bone in children and adolescents. *J Cancer Res Clin Oncol* 113:187-191.
- Sæter G, Elomaa I, Wahlqvist Y, Alvegård TA, Wiebe T, Monge O, Forrestier E, Solheim ØP (1997): Prognostic factors in bone sarcomas. *Acta Orthop Scand* 68:156-160.
- Picci P, Böhlting T, Bacci G, Ferrari S, Sangiorgi L, Mercuri M, Ruggieri P, Manfredi M, Ferraro A, Casadei R, Benassi MS, Mancini A, Rosito P, Cazzola A, Barbieri E, Tienghi A, Brach del Prever A, Comandone A, Bacchini P, Bertoni F (1997): Chemotherapy induced necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 15:1553-1559.
- Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, Thiery JP, Olschwang S, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM, Mazabraud A (1988): Chromosomes in Ewing's sarcoma I: an evaluation of 85 cases and remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 32:229-238.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Sastre Garau X, Zucker J-M, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, Aurias A, Thomas G (1994): The Ewing family of tumors: a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 331:294-299.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G (1992): Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359:162-165.
- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT (1993): The Ewing's sarcoma *EWS/FLI-1* fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than *FLI-1*. *Mol Cell Biol* 13:7393-7398.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros P, Combaret V, Lenoir G, Aurias A, Thomas G, Delattre O (1993): Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumors. *EMBO J* 12:4481-4487.
- Jeon I-S, Davis N, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, Shapiro DN (1995): A variant Ewing's sarcoma translocation t(7;22) fuses the *EWS* gene to the ETS gene *ETV1*. *Oncogene* 10:1229-1234.

13. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F, Fujinaga K (1996): Fusion of an *ETS*-family gene, *E1AF*, to *EWS* by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosom Cancer* 15:115-121.
14. Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O (1997): A new member of the *ETS* family fused to *EWS* in Ewing tumors. *Oncogene* 14:1159-1164.
15. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, Smith T, Jürgens H, Gadner H, Kovar H (1996): Does expression of different *EWS* chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14:1245-1251.
16. de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PHB, Barr FG, Ladanyi M (1998): *EWS-FLI1* fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 16:1248-1255.
17. Maurici D, Perez-Atayde A, Grier HE, Baldini N, Serra M, Fletcher JA (1998): Frequency and implication of chromosome 8 and 12 gains in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 100:106-110.
18. Hattinger CM, Rumpel S, Strehl S, Ambros IM, Zoubek A, Stark B, Koscielniak E, Gadner H, Ambros PF (1996): Chromosomal aberrations in Ewing tumors: an evaluation by conventional cytogenetics and in situ hybridization techniques. Fifth European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumours, Baveno, Italy, p. 173.
19. Mugneret F, Lizard S, Aurias A, Turc-Carel C (1988): Chromosomes in Ewing's sarcoma II: nonrandom additional changes, trisomy 8 and der(16)t(1;16). *Cancer Genet Cytogenet* 32:239-245.
20. Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Böhling T, Asko-Seljavaara S, Blomqvist C, Elomaa I, Karaharju E, Kivioja AH, Siimes MA, Tukiainen E, Caballin MR, Myklebost O, Knuutila S (1997): Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 75:1403-1409.
21. Navarro S, Cavazzana AO, Llobart-Bosch A, Triche TJ (1994): Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma: an immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 118:608-615.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988): A simple salting out procedure for extracting DNAs from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
23. Miser JS, Kinseila TJ, Triche TJ, Tsokos M, Jarosinski P, Forquer R, Wesley R, Magrath I (1987): Ifosfamide with mesna uroprotection and etoposide: an effective regimen in the treatment of recurrent sarcomas and other tumors of children and young adults. *J Clin Oncol* 5:1191-1198.
24. Bacci G, Picci P, Gherlinzoni F, Capanna R, Calderoni P, Putti C, Mancini A, Campanacci M (1985): Localized Ewing's sarcoma of bone: ten year experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli in 124 cases treated with multimodal therapy. *Eur J Cancer* 21:163-173.
25. Rosito P, Mancini A, Abate ME, Rondelli R, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Ruggieri P, Ferrari S, Baldini N, Bedei L, De Polo N, Frezza G, Barbieri E, Brach del Prever A, Carli M, De Bernardi B, Tamaro P, Monti C, Moio A (1997): Localized Ewing's sarcoma of bone: results of the Italian Cooperative Study. *Med Pediatr Oncol* 29:410.
26. Alvegård TA, Solheim Ö, Åkerman M, Berg NO (1989): Ewing's sarcoma: a preliminary report from the Scandinavian Sarcoma Group. *Acta Oncol* 28(suppl. 2):59-64.
27. Larramendy ML, Tarkkanen M, Valle J, Kivioja AH, Ervasti H, Karaharju E, Salmivalli T, Elomaa I, Knuutila S (1997): Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Am J Pathol* 150:685-691.
28. Knuutila S, Björkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius V-M, Vidgren V, Zhu Y (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152:1107-1123.
29. Szymanska J, Serra M, Skytting B, Larsson O, Virolainen M, Åkerman M, Tarkkanen M, Huuhtanen R, Picci P, Bacchini P, Asko-Seljavaara S, Elomaa I, Knuutila S (1998): Genetic imbalances in 67 synovial sarcomas evaluated by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 23:203-212.
30. Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, Elomaa I, Kivioja A, Nevalainen J, Böhling T, Karaharju E, Hyytinen E, Knuutila S, Kallioniemi O-P (1995): Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55:1334-1338.
31. Larramendy ML, Tarkkanen M, Blomqvist C, Virolainen M, Wiklund T, Asko-Seljavaara S, Elomaa I, Knuutila S (1997): Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. *Am J Pathol* 151:1153-1161.
32. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen A-C, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, Kallioniemi O-P (1995): Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55:342-347.
33. Isola JJ, Kallioniemi O-P, Chu LW, Fuqua SAW, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM (1995): Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am J Pathol* 147:905-911.
34. Tarkkanen M, Elomaa I, Blomqvist C, Kivioja A, Kellokumpu-Lehtinen P, Böhling T, Valle J, Knuutila S: DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer* (in press).
35. Douglass EC, Rowe ST, Valentine M, Parham D, Meyer WH, Thompson EI (1990): A second nonrandom translocation, der(16)t(1;16)(q21;q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Cytogenet Cell Genet* 53:87-90.
36. Heim S, Mitelman F (1995): *Cancer Cytogenetics*. ed 2, Wiley-Liss, Inc., New York.

Article III

Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity

Cancer Genetics and Cytogenetics 100: 25-30 (1998)

Comparative Genomic Hybridization Study on Pooled DNAs from Tumors of One Clinical-Pathological Entity

S. Knuutila, G. Armengol, A-M. Björkqvist, W. El-Rifai,
M. L. Larramendy, O. Monni, and J. Szymanska

ABSTRACT: Comparative genomic hybridization (CGH) was performed using DNAs pooled from numerous specimens from tumor categories studied case-by-case. The series of six DNA pools consisted of 28 diffuse centroblastic lymphomas (DCL), 28 gastrointestinal stromal tumors (GIST), 21 primary chondrosarcomas (CS), 17 samples from the Ewing family of tumors (ET), 14 liposarcomas (LS), and 14 mesotheliomas (MS). Losses and gains present in at least 50% of the individual specimens were always detected in the pooled DNAs. The loss of the whole p-arm of chromosome 1 was observed even when the affected proportion of individual specimens was only 25%. Gains were also detected at frequencies lower than 50%, but with a high-level amplification in one or more specimens. In conclusion, the present pooled DNA study revealed the following changes: DCL had a gain at 18q22-qter; GIST had losses at 14 and 22q12, and gains at 5p, 8q22-24, 17q22-qter, and 19q13; ET had gains at 1q and 8q13-qter; LS had gains at 1q21-25 and 12q; and MS had a loss at 9p22-pter. No changes were observed in the CS DNA pool. The results from individual specimens also stressed the importance of these chromosomal regions to the tumorigenesis in the corresponding malignancies. This pooled DNA approach can thus be used for fast screening of recurrent DNA copy number in a specific tumor entity. © Elsevier Science Inc., 1998

INTRODUCTION

Since the advent of the comparative genomic hybridization (CGH) technique developed by Kallioniemi and colleagues [1], this method had been applied successfully to the study of DNA copy number changes in different tumors. Several findings of losses, gains, and amplifications in DNA copy numbers have been reported in various types of tumors [2-17]. Malignant tumors usually show a wide variety of changes. This complexity most probably includes both primary changes that have a role in the initiation, progression, metastasis, and drug resistance of the disease, and secondary changes that are not important to tumorigenesis.

A prerequisite of CGH is that the change is found in more than 50% of the cells studied [18]. Instead of using a single sample to study a certain type of tumor, we undertook to pool DNA from several specimens, presuming that a single hybridization would allow us to find the aberrations present in at least half of the single samples. Non-recurrent aberrations would not be revealed.

To test this simple hypothesis, we pooled DNAs from numerous specimens in tumor categories that had previously been studied individually in our laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Tumor Samples

The samples comprised 28 diffuse centroblastic lymphomas (DCL) (16 primary and 12 recurrent tumors), 28 gastrointestinal stromal tumors (GIST) (16 benign and 12 malignant), 21 primary chondrosarcomas (CS) (15 grades I-II and 6 grades III-IV), 17 samples belonging to the Ewing family of tumors (ET) (12 primary, 3 metastatic and 2 recurrent tumors), 14 liposarcomas (LS) (9 primary, 4 recurrent and 1 metastatic tumors), and 14 mesotheliomas (MS). Histopathological and clinical characteristics of the different samples have been previously reported in detail [2, 3, 7, 12, 14, 17]. DNA from frozen tumor samples was extracted according to standard methods, whereas DNA from paraffin-embedded tissues was extracted as described elsewhere [19, 20]. The DNAs from different samples in the same tumor category were mixed in equal amounts in order to obtain 1 µg pooled DNA for CGH.

Comparative Genomic Hybridization

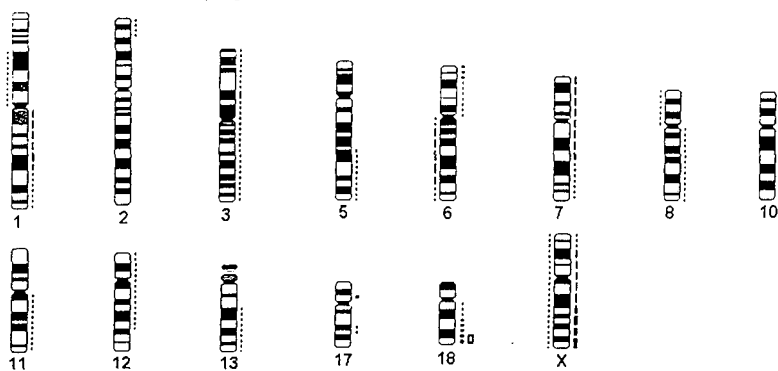
CGH was performed using direct fluorochrome-conjugated DNAs, following the methods previously described [1, 18].

From the Department of Medical Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

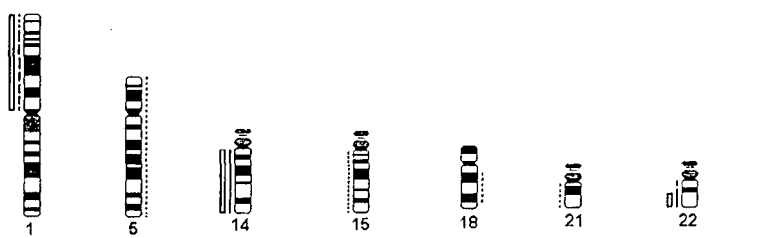
Address reprint requests to: Dr. Sakari Knuutila, Haartman Institute, Department of Medical Genetics, P.O. Box 21 (Haartmaninkatu 3), FIN-00014 University of Helsinki, Finland.

Received October 22, 1996; accepted January 28, 1997.

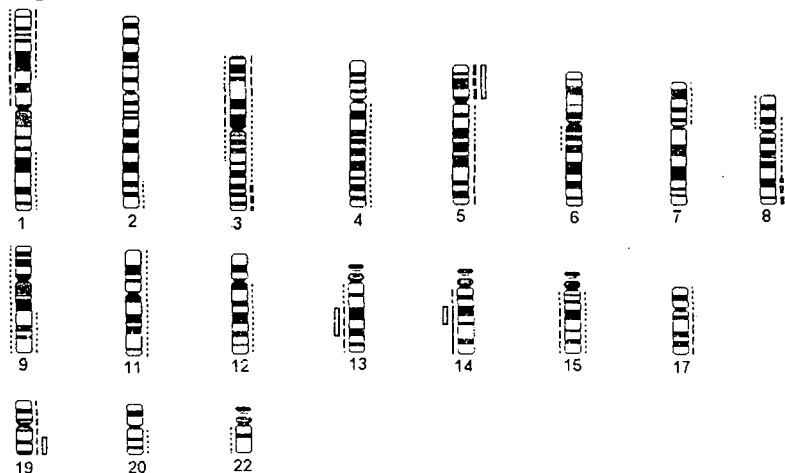
Diffuse centroblastic lymphoma (28 cases)



Benign GIST (16 cases)



Malignant GIST (12 cases)



Benign and malignant GIST (28 cases)

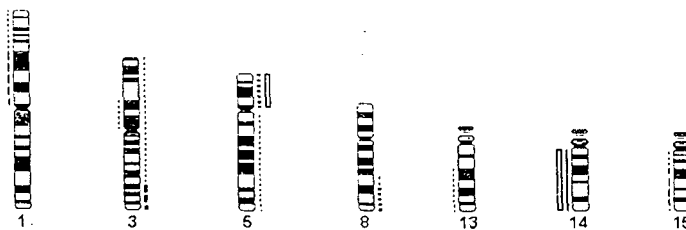


Figure 1 Summary of the frequencies of recurrent changes in single cases and in pooled DNA. Gains and high-level amplifications are shown on the right hand side and losses of DNA copy numbers on the left. Dotted lines (•••) depict copy number changes detected in 10–24% of the tumors, dashes (---) 25–49%, and solid lines (—) more than 50%. High-level amplifications are marked with thick lines, and changes in pooled DNA as hollow bars.

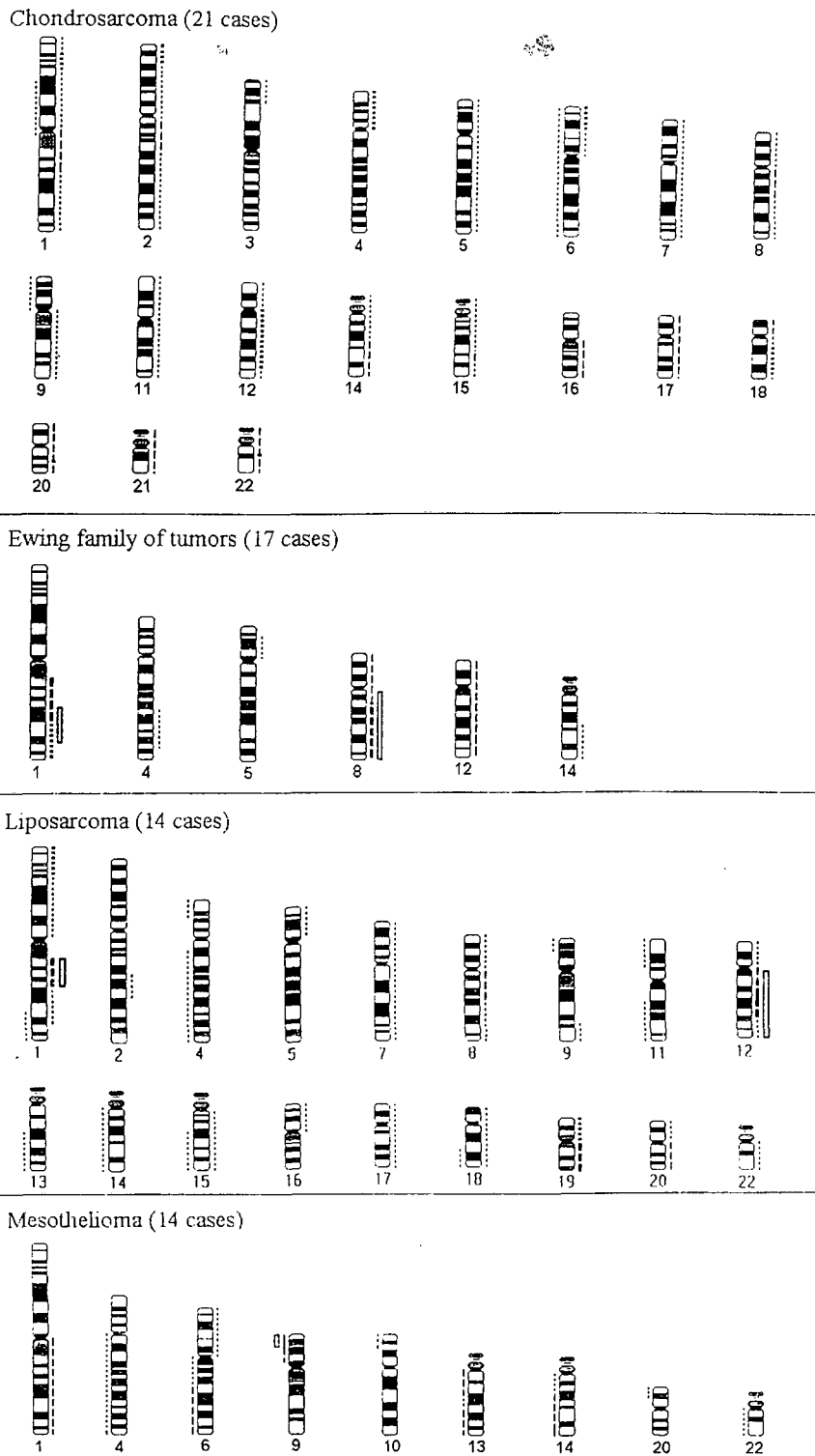


Figure 1 Continued.

The pooled tumor DNA was labeled with FITC-dUTP (DuPont, Boston, MA, USA) and reference genomic DNA with Texas-red dUTP (DuPont) by nick translation to obtain DNA fragments which ranged from 600 to 2000 base pairs. The hybridization mixture consisted of 800 ng labeled pooled tumor DNA, 800 ng labeled reference genomic

DNA, and 20 µg unlabeled Cot-1 DNA dissolved in 10 µl of hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulphate, 2 × SSC). The hybridization mixture was denatured at 75°C for 5 min and hybridized to a preparation with normal metaphase spreads denatured in 70% formamide/ 2 × SSC at 68°C for 2 min. Hybridization was performed at

37°C for 2 days, followed by preparation washes. The preparations were washed three times in 50% formamide/ $2 \times$ SSC (pH 7), twice in $2 \times$ SSC, and once in $0.1 \times$ SSC at 45°C, followed by $2 \times$ SSC and 0.1 M NaH_2PO_4 -0.1 M Na_2HPO_4 -0.1% NP40 (pH 8), and distilled water at room temperature, for 10 min each. After air-drying, the preparations were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI), and then mounted with an antifading medium (Vectashield™, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

In each CGH experiment, a negative control (peripheral blood DNAs from healthy donors) and a positive control (tumor with known DNA copy number changes) were included.

Digital Image Analysis

The hybridizations were analyzed using an Olympus fluorescence microscope and the ISIS digital image analysis system (Metasystems GmbH, Altlußheim, Germany), based on an integrated high-sensitivity monochrome CCD camera and automated CGH analysis software. Three-color images (red for reference DNA, green for pooled tumor DNA, and blue for counterstaining) were acquired from 8–10 metaphases. Only metaphases of good quality with strong uniform hybridization were included in the analysis. Chromosomes not suitable for CGH analysis were deleted (i.e., chromosomes heavily bent, overlapping, or with overlying artefacts). Chromosomal regions were interpreted as overrepresented when the corresponding ratio exceeded 1.17 (gains) or 1.5 (high-level amplification), and underrepresented (losses) when the ratio was less than 0.85. All the results were confirmed using a 99% confidence interval with 1% error probability. Briefly, intra-experiment standard deviations for every position in the CGH ratio profiles were calculated further from the variation of the ratio values of all homologous chromosomes within the experiment. Confidence intervals for the ratio profiles were then computed by combining them with an empirical inter-experiment standard deviation and estimating error probabilities based on the t-distribution.

RESULTS

Diffuse Centroblastic Lymphoma (DCL)

The only DNA copy number change detected in the CGH analysis of 28 pooled samples was a gain at 18q22-ter. This gain was detected in 21% of the samples, but, in half of the cases, the region of 18q21-ter was found to be highly amplified (Fig. 1). In other regions, where the change appeared in less than 40% of the samples, the DNA copy number changes were not detected in the pooled DNA. For detailed results of individual cases, see Monni et al. [14].

Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST)

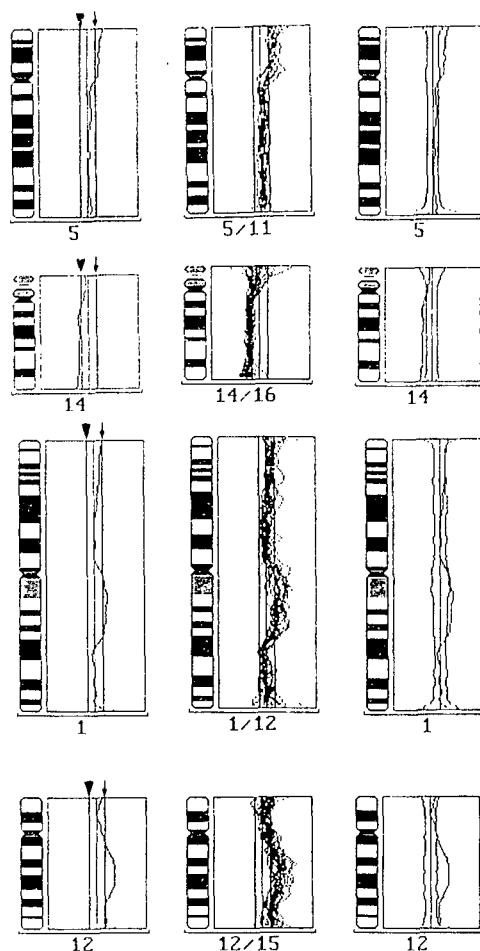
DNA pooled from 16 benign GIST tumors showed losses at 1p, 14q, and 22q12-qter. These changes were present among individual tumors at frequencies of 25%, 75%, and 50%, respectively. Pooled DNAs from 12 malignant tumors showed gains at 5p, 8q22-q24, and 19q13. Studies of individual tumors showed these changes in 42% of the

specimens. In individual tumors, high-level amplifications were detected at 13q21-q31 and 14q21-q22, with the respective frequencies of 42% and 58%. Pooled DNA from all 28 GIST cases (both benign and malignant) showed only a gain at 5p. This gain was present in 25% of the cases, one of which showed a high-level amplification. DNA loss was present at 14q (Fig. 2). This change was detected in 69% of the cases (Fig. 1). For detailed results of individual cases, see El-Rifai et al. [7].

Chondrosarcoma (CS)

No changes were observed in the pooled DNA. In individual specimens, none of the changes were observed in more than 35% of cases (Fig. 1). For detailed results of individual cases, see Larramendy et al. [12].

Figure 2 Green-to-red ratio profiles for chromosomes 5 and 14 in pooled DNAs from gastrointestinal stromal tumors, and for chromosomes 1 and 12 in pooled DNAs from liposarcomas show gain of 5p and loss of 14, and gains of 1q21-25 and 12q. Panels on the left present average profiles and, in the middle, individual profiles of 11–16 chromosomes. Profiles are displayed with the threshold gain of 1.17 (arrow) or threshold loss of 0.85 (arrow-head). Panels on the right present average profiles displayed with a confidence interval of 99%.



The Ewing Family of Tumors (ET)

Only gains at 1q31-41 and 8q were detected when CGH was performed on DNAs pooled from ET specimens (Fig. 1). Two regions of chromosome 1 were affected: 1q21-31 in 29% of the single cases and 1q32-ter in 18%. One of the cases showed a high-level amplification over the entire long arm and another at 1q21-22. The whole chromosome 8 was gained in 41% of the single cases; one case had a high-level amplification at 8q13-ter. Changes present in less than 29%, including changes on chromosomes 4, 5, 12, and 14, were not detected in the pooled DNA study. For detailed results of individual cases, see Armengol et al. [2].

Liposarcoma (LP)

The CGH analysis of DNA pooled from LP showed gains of 1q21-25 and 12q as the only DNA sequence copy number changes (Figs. 1 and 2). The most common gain at 12q14-21 was detected in seven (50%) specimens, three of which had a high-level amplification. Although the gain at 1q21-24 was less frequent (29%), a high-level amplification was observed in three out of four tumors. Other chromosomal regions, which were overrepresented at the same frequency but without a high-level amplification or with a high-level amplification present in only one tumor, showed no changes in the pooled DNA study. The most frequent losses involving 9p21-pter and 13q21-qter found in 21% of liposarcomas were not detected in the pooled DNA study. For detailed results of individual cases, see Szymanska et al. [17].

Mesothelioma (MS)

The only DNA copy number change detected in the pooled DNAs was the loss of DNA copy numbers in the short arm of chromosome 9 (9p22-pter) (Fig. 1). This change was detected in 57% of the specimens. Other gains or losses of DNA sequences, which were present in 14–36% of the individual tumors, were not detected in the pooled DNA sample. For detailed results of individual cases, see Björkqvist et al. [3].

DISCUSSION

In our CGH study, DNA copy number changes present in at least 50% of the individual tumors were always detected in the pooled DNAs. The results also showed that gains present in 21%–29% of the tumors could be detected, if a high-level amplification was found in one or more tumors, as evidenced in the CGH analyses of DCL (18q22-qter), GIST (5p), and LP (1q21-25). It has been presumed that at least 50% of the cells should contain the change in order for it to be detectable by CGH [18]. The reason why our pooled DNA study revealed gains present in less than 50% of the individual tumors could be that these may have contained multiple copies of DNA sequences, which had failed to reach the threshold set for high-level amplification (1.5).

In GIST, loss of 1p was seen in pooled DNAs, even though the frequency of this change in individual tumors was as low as 25%. However, loss of 6q was not detected

in pooled DCL specimens, although this change was seen in 38% of the individual tumors. A higher level of contaminating normal cells in the DCL specimens may explain why the loss could not be found in pooled DCL. Furthermore, possible homozygous loss in the GIST group may account for the pooled DNA results.

Had the material consisted of pooled tumors only, what could this have meant in terms of accuracy? When a certain chromosomal region contains losses in some tumors and gains in others, these changes are compensational. This phenomenon was manifest especially in chromosome 1 in malignant GIST. Moreover, a recurrent loss may be masked by a high-level amplification in a single tumor. Thus, a gain found in the pooled DNA study may suggest that a great proportion of these tumors contains this change or that the finding may be a sign of high-level amplification in some of the tumors. A loss detected by the study of pooled tumors always indicates that a great proportion (>25%) of the tumors contains the change.

The advantages of the method are speed and economy: a single experiment can give an overview of the recurrent changes characteristic to each tumor type. Other benefits are that the interpretation is straightforward as irrelevant changes remain invisible and that the required DNA amount is several times smaller than the amount needed for the study of individual tumors. Besides testing pooled tumors of a specific tumor entity against normal reference DNA, pooled tumors of a particular entity (e.g., primary tumors) could be tested against pooled tumors of another specific entity (e.g., metastatic tumors).

In studies of pooled tumors, it is important that the cases selected form a clear-cut tumor entity, that tissue areas used for DNA extraction contain only tumor cells, and that the DNA amounts in the mixture are equal. If these requirements are met, losses or gains can be detected even when the affected proportion of specimens is as low as 25%. However, the gain present in 25% of the individual tumors was detected in the pooled DNA study only when one of the tumors showed a high-level amplification.

In summary, the present pooled DNA study revealed the following recurrent clonal changes: gain at 18q22-qter in lymphomas; loss at 1p, 13q21-31, 14, and 22q12, and gain at 5p, 8q22-24, 17q22-qter, and 19q13 in gastrointestinal stromal tumors; gain at 1q31-41 and 8q in Ewing's sarcoma; gain at 1q21-25 and 12q14-21 in liposarcomas; and loss at 9p22-pter in mesotheliomas. Our recent papers based on individual specimens [2, 3, 7, 12, 14, 17] and other reports of the same tumor types have also stressed the importance of these chromosomal regions to the initiation and/or progression of these tumors [8, 9, 21–23]. The agreement in results from pooled DNAs and individual DNAs suggests that pooled DNAs are of value in fast screening for recurrent and primary DNA copy-number changes in a specific tumor entity. Incomplete detection of non-recurrent changes, which may be biologically and clinically relevant, is a serious drawback and must be taken into account when deciding whether the pooled DNA system can be applied to a specific project.

Finally, because the pooled DNA system may help considerably to determine minimal overlapping areas of

change and interpret whether the loss in a certain area is homozygous or heterozygous, the CGH study should be performed not only on the individual specimens of a certain tumor category but also on the DNAs pooled from the specimens.

This study was supported by the Sigrid Jusélius Foundation, the Clinical Research Institute of the Helsinki University Central Hospital, and the Cancer Society, all from Finland; by the National Council of Scientific and Technological Research (CONICET) and the National University of La Plata, from Argentina; and by the Universitat Autònoma de Barcelona, from Spain.

REFERENCES

- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudan D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Böhlting T, Asko-Seljavaara S, Blomqvist C, Elomaa I, Karaharju E, Kivioja AH, Siimes MA, Tukiainen E, Caballín MR, Myklebost O, Knuutila S (1997): Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 75:1403-1409.
- Björkqvist A-M, Tammilehto L, Anttila S, Mattson K, Knuutila S (1997): Recurrent DNA copy number changes in 1q, 4q, 6q, 13q, 14q and 22q detected by comparative genomic hybridization in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 75:523-527.
- Bryndorf T, Kirchlöffl M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J (1995): Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 57:1211-1220.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Nicoud MR, Lichter P, Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90:590-610.
- du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:27-41.
- El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M, Knuutila S, Andersson LC (1996): DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 56:3230-3233.
- Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995): Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21-q22 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:8-14.
- Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995): Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:15-21.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM (1994): Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2156-2160.
- Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG (1995): Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiform tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 60:812-819.
- Larramendy ML, Tarkkanen M, Valle J, Kivioja AH, Ervasti H, Karaharju E, Salmivalli T, Elomaa I, Knuutila S (1997): Gains, losses and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Am J Pathol* 150:685-691.
- Mohapatra G, Kim DH, Feuerstein BG (1995): Detection of multiple gains and losses of genetic material in ten glioma cell lines by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 13:86-93.
- Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S (1996): DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma — Comparative genomic hybridization study. *Blood* 87:5269-5278.
- Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T, Auer G (1995): Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55:5415-5423.
- Schröck E, Thiel G, Loznova T, du Manoir S, Meffert M-C, A J, Speicher MR, Nürnberg P, Vogel S, Jänisch W, Donis-Keller H, Ried T, Witkowski R, Cremer T (1994): Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *J Pathol* 144:1203-1218.
- Szymanska J, Tarkkanen M, Wiklund T, Virolainen M, Blomqvist C, Asko-Seljavaara S, Tukiainen E, Elomaa I, Knuutila S (1996): Gains and losses of DNA sequences in liposarcomas evaluated by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 15:89-94.
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10:231-243.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F (1995): Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145:1301-1308.
- Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S (in press): BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*.
- Szymanska J, Virolainen M, Tarkkanen M, Wiklund T, Asko-Seljavaara S, Tukiainen E, Elomaa I, Blomqvist C, Knuutila S (in press): Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipoma-like liposarcomas but not in benign lipomas. A comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet*.
- Wolf M, Aaltonen LA, Szymanska J, Tarkkanen M, Blomqvist C, Berner J-M, Myklebost O, Knuutila S (1997): Complexity of 12q13-22 amplicon in liposarcoma—Microsatellite repeat analysis. *Genes Chromosom Cancer* 18:66-70.

Article IV

DNA copy number changes and evaluation of *MYC*, *IGF1R* and *FES* amplification in xenografts of pancreatic carcinoma

Cancer Genetics and Cytogenetics (en premsa)

copy number changes by CGH [23]. To enrich for the neoplastic cell population, we took advantage of xenograft explants. The implantation of human tumor cells in nude mice has proved useful and has been used with increasing success in allelic loss studies on pancreatic tumors [8, 10, 11]. In these studies, the lack of contamination by normal human cells was shown to increase the sensitivity of detection of genetic changes and enabled the identification of alterations that otherwise would not have been detected in primary tumors. What is more, xenograft explants have been used in CGH studies of other types of tumors, such as prostate cancer, stomach cancer, soft tissue sarcomas, and osteosarcomas [24–27]. Forus et al. [24] obtained equal amplification patterns when both primary and xenograft materials of sarcomas were analyzed (a type of tumor without desmoplastic reaction). They concluded that xenografting itself does not induce amplification.

In the present study, a series of eight xenografted pancreatic adenocarcinomas and two metastases developed in the mouse were analyzed by CGH. Taking into account the results obtained, we performed LOH in 10p14~pter and fluorescence in situ hybridization (FISH) and Southern blot studies to assess amplification of genes from 8q24 (*MYC*) and 15q25~qter (*IGF1R* and *FES*). These genes have previously been found to be amplified in some tumors.

MATERIALS AND METHODS

Tumor Samples

Tumor DNA was obtained from eight xenografts derived from resection specimens of pancreatic adenocarcinoma: six primary tumors (NP29, NP31, NP37, NP40, NP43, and NP46), one peritoneal metastasis (NP9), and one hepatic metastasis (NP18) [11]. Clinical data are given in Table 1. All tumors originated in the exocrine pancreas. None of the patients had received previous cytotoxic therapy. The method used for orthotopic implantation of human tumor cells in nude mice was described earlier [11]. Two metastases (NP18MH and NP18ID) developed in mice from a xenografted tumor (NP18) were perpetuated as well (MH, hepatic metastasis; ID, diaphragmatic implantation). DNA from the ten xenograft explants was used as tumor DNA for CGH experiments.

Table 1 Clinical characteristics of the eight patients with pancreatic adenocarcinoma

Case	Age/Sex	Primary tumor or metastasis	Site	Differentiation
NP9	67/M	Metastasis (peritoneal)	Head	NA
NP18	64/M	Metastasis (liver)	Head	Poor
NP29	67/F	Primary tumor	Head	Good
NP31	65/M	Primary tumor	Unknown	NA
NP37	65/M	Primary tumor	Head	Moderate
NP40	38/F	Primary tumor	Head	Moderate
NP43	61/F	Primary tumor	Head	Poor
NP46	60/M	Primary tumor	Head	Moderate

Abbreviation: NA, not analyzed.

Comparative Genomic Hybridization

Hybridization was performed as described previously [28]. Briefly, normal DNA and tumor DNA were labeled with Texas red-5-dUTP (DuPont, Boston, MA) and Fluorescein-12-dUTP (DuPont), respectively. Standard nick translation procedures were used. Equal amounts of the two DNAs (800ng) and 20 μ g of human Cot-1 DNA were ethanol precipitated and redissolved in 10 μ L of 50% formamide/10% dextran sulfate/2 \times saline sodium citrate (SSC). Normal lymphocyte metaphase preparations were denatured at 68–69°C for 2 minutes in a formamide solution (70% formamide/2 \times SSC, pH 7), dehydrated and treated with proteinase K (0.1 μ g/mL in 20 mM Tris-HCl/2 mM calcium chloride, pH 7) at 37°C for 7.5 minutes, and dehydrated again. The probe mixture was denatured at 75°C for 5 minutes, applied to the slides, and hybridized for 2–3 days at 37°C.

After hybridization, slides were washed 3 \times 10 minutes in 50% formamide/2 \times SSC (pH 7), 2 \times 10 minutes in 2 \times SSC, and 10 minutes in 0.1 \times SSC at 45°C; then 10 minutes in 2 \times SSC, 10 minutes in PN buffer (0.1 M NaH₂PO₄/0.1 M Na₂HPO₄/0.1% Nonidet P-40, pH 8), and 10 minutes in distilled water at room temperature. Chromosomes were counterstained with 5 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in an antifade solution.

Digital Image Analysis

The hybridizations were analyzed by using an Olympus fluorescence microscope and the Cytovision digital image analysis system (Applied Imaging, Sunderland, UK) based on a high-sensitivity integrating monochrome CCD camera and an automated CGH analysis software package.

Interpretation of CGH Results and Quality Control

Ratio profiles were averaged from five to ten metaphases per sample (as many as 20 chromosome homologues). Chromosomal regions with a fluorescence ratio above 1.25 were considered gains of DNA sequences, and regions with a ratio below 0.75 were considered losses (conservative thresholds). These cutoff values were based on negative control experiments with normal DNA. A negative control was included in each CGH experiment as a quality control. A ratio above 1.5 was defined as a high-level DNA amplification, and a ratio below 0.5 was considered a homozygous loss (or a loss present in almost all the cell population). Heterochromatic regions (1q12, 9q12, 16q11, 13p, 14p, 15p, 21p, 22p, and Yq12) were excluded from the analysis. The profiles of 1p32~pter, 16p, 17p, and chromosomes 19 and 22 were interpreted with caution, because they may give false-positive results [23].

Loss of Heterozygosity Studies

LOH analyses were carried out to study the 10p14~pter region in three samples with a loss of this region by CGH (NP9, NP40, and NP46) and in another two samples without the loss (NP37 and NP43). Six PCR-amplified CA_n microsatellite markers (Research Genetics, Huntsville, AL) were analyzed. All markers were localized in 10p14~pter according to the Entrez database (NCBI, NLM, NIH), spanning a 24.3-cM region [29].

The following PCR conditions were used: 1×PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM each dATP, dGTP, and dTTP, 2.5 μM dCTP, 0.7 μCi of α[³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), 0.5 μM of each primer, 55 ng of DNA, 0.0125 U AmpliTaq Gold polymerase (Perkin Elmer, NJ) in a volume of 10 μL. A pre-PCR heat step at 94°C for 10 minutes was carried out to activate the enzyme, and then DNA was amplified for 27 cycles at 94°C (30 s), 55°C (75 s), and 72°C (15 s) and at 72°C (10 min) after the last cycle. After PCR, 4–5 μL of each sample was electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then dried and exposed to a Kodak XAR film

Patients were designated uninformative when homozygous for the locus in question and informative when heterozygous. Patterns produced with the use of paired normal and tumor DNA were compared.

Fluorescence In Situ Hybridization

FISH was used to more accurately examine the amplifications found at 8q24~qter and 15q25~q26 by CGH. Preparations of tumor interphase nuclei were isolated from frozen pieces of seven xenografted tumor tissues (all nonmetastatic samples except NP31), as reported previously [30] with minor modifications. Briefly, the tissue was mechanically minced, trypsinized, and incubated in an RNAase solution. The nuclear suspension was filtered through a 53-μm mesh nylon net. After methanol-acetic acid fixation, the cells were placed on slides, air dried, and fixed again. Specimens were postfixed in 4% paraformaldehyde/PBS solution for 5 minutes at 4°C, dehydrated in an ethanol series, air dried, and heated for 30 minutes at 70°C. These slides were stored at -20°C.

Two-color FISH was performed with locus-specific probes corresponding to the *MYC* gene (8q24) labeled with digoxigenin (Oncor, Gaithersburg, MD), a centromeric probe as control for chromosome 8 labeled with biotin (Oncor) as well as *FES* locus (15q26.1) labeled with Spectrum Orange (Vysis, Downers Grove, IL), and a centromeric probe for chromosome 15 labeled with biotin (Oncor). Hybridizations were carried out according to the manufacturer's instructions.

After hybridization, the slides were washed and the bound probes were detected immunochemically with FITC (for the biotin-labeled probes) and TRITC (for the digoxigenin-labeled probe). Signals were amplified with the corresponding antibodies. Slides were counterstained with 5 μg/mL DAPI and mounted in an antifade solution.

Signal copy numbers of the probes were scored from 200 nuclei per hybridization. Absolute *MYC* and *FES* counts per nucleus and counts of centromeres 8 and 15 were scored. The level of amplification was expressed as the gene copy number relative to the reference centromeric probe signal number. According to Tanner et al. [31] and Anzick et al. [32], tumors were classified into those with no amplification, low-level amplification (1.5- to 3.0-fold), and high-level amplification (>3.0-fold).

Southern Hybridization

Genomic DNA extracted from the eight nonmetastatic tumors was digested with Pst and Hind III separately, elec-

trophoresed on a 0.8% agarose gel, and transferred to a positively charged nylon filter (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The membrane was hybridized with a digoxigenin-labeled *IGF1R*-cDNA probe (15q25~qter; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD) and pEFD145 (3p21; ATCC) as a control probe to calibrate for unequal sample loading. Detection was carried out according to Engler-Blum et al. [33], and then the filter was exposed to hyperfilm ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) for 5–10 minutes. The hybridization signals were quantitated with a densitometer (ScanJet 4C/T; Hewlett Packard). The level of amplification was calculated by dividing the ratio of the *IGF1R* probe signal in the tumors to the signal in normal tissue by the same average ratio for the pEFD145 signal.

RESULTS

Eight human pancreatic carcinomas and two mouse metastases from a human pancreatic xenografted tumor were studied by CGH. Genetic changes were detected in all cases, and all the chromosomes were involved in imbalances. The mean number of changes per specimen was 14.7 (range 6–24): 9 gains and 5.7 losses (ranges 0–18 and 4–7, respectively). Seven tumors showed high-level amplifications (ratio > 1.5) involving different chromosomal sites. Figure 1 is a schematic representation of all chromosomal regions with increased or decreased DNA sequence copy number. In the eight tumors, excluding the two metastases originated in mice, the most common overrepresentations were observed on chromosome 8 (7/8 cases; with a minimal common region at 8q24~qter), chromosome 15 (6/8 cases; minimal region at 15q25~q26), chromosome arm 16p (6/8 cases), chromosome arm 20q (6/8 cases), chromosome arm 16q (5/8 cases), and chromosome arm 19q (5/8 cases). Other regions commonly gained were 1q, 3q, 17q, and 22q, each in four tumors. Interestingly, most of the high-level amplifications were localized in the aforementioned chromosomal regions. The regions that most frequently showed a decreased copy number were: 18q21 (6/8 tumors), 6q16~q21 (5/8 tumors), 6q24~qter (5/8 tumors), and 9p23~pter (5/8 tumors). Other regions commonly lost were 13q21 (4/8 tumors) and 10p14~pter (3/8 tumors). Losses of both alleles were observed at 6q16~q21, 13q21, and 18q21~q22 in one tumor each (Fig. 2). The two metastases developed in mice maintained the aberrations detected in the corresponding xenografted pancreatic tumor. All three samples (the original tumor and the two metastases) presented losses of 5p15, 5q12~q31, 9p21~pter, 12cen~q21, 15q22~qter, and 17p. In addition, the two metastases showed a gain of 11q12~q13 and 22q, and one of them (a diaphragmatic implantation) had additional gains in some regions of chromosomes 16, 17q, 19q, and 20q.

Three tumors that showed a loss of chromosome material at 10p14~pter were analyzed for LOH by using six polymorphic markers. On average, three loci per sample were informative. All three tumors showed LOH for all the informative loci. We investigated two tumors without

Please supply missing information

ON THIS PROOF!

See query on manuscript page(s) 9

MASTER PROOF

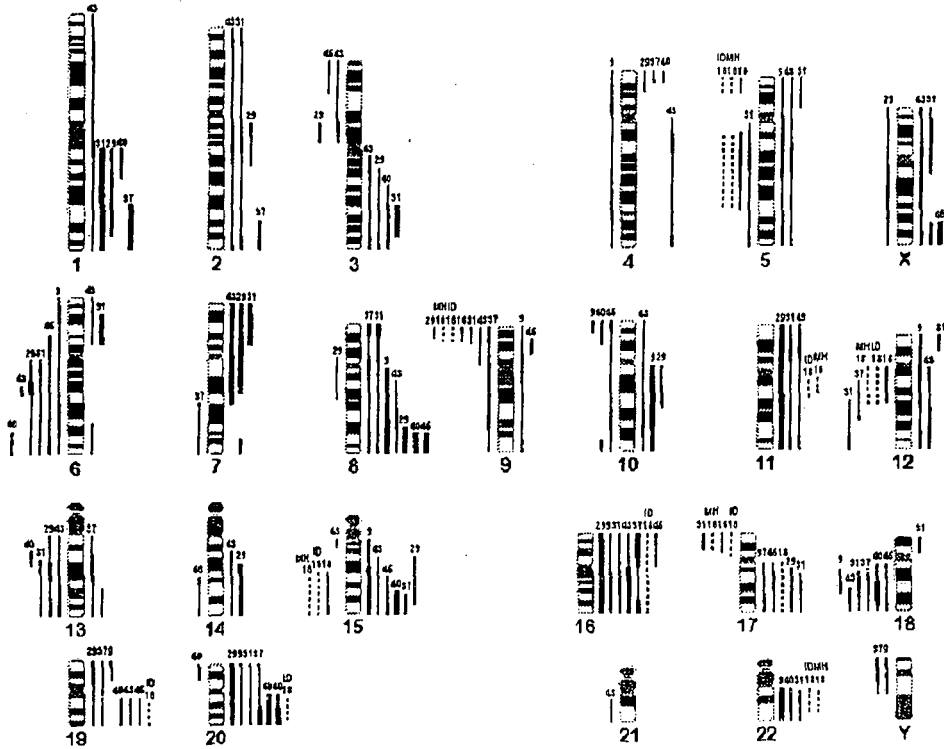


Figure 1 Summary of genetic imbalances detected in pancreatic adenocarcinomas by CGH. Solid lines depict copy number changes detected in eight xenografted tumors (high-level amplifications and homozygous losses in bold) and dashed lines represent the changes in two metastases developed in mice. The case number is given above each line. Gains of DNA copy number are shown on the right-hand side and losses on the left.

the loss of 10p14~pter by CGH and found no allelic losses.

Gains of 8q and 15q detected by CGH were analyzed with single copy FISH probes. Seven tumors were examined by FISH with the use of probes for the *MYC* (at 8q24) and *FES* (at 15q26.1) genes, as well as centromere probes for these chromosomes. Results for both genes are shown in Tables 2 and 3, respectively.

Seven of eight cases (all but NP18) presented a gain of 8q24~qter by CGH. A high-level amplification (ratio > 1.5) was present in four of them (NP9, NP29, NP40, and NP46). In FISH analysis, these same four cases displayed an amplification of *MYC* relative to the centromere (range 1.9- to 24-fold). The level of the increase was low in two cases (NP9 and NP46) and high in the other two (NP29 and NP40). *MYC* copy number in case NP29 reached more than 100 copies in some cells. No *MYC* clusters were present in the tumors with amplification. On the contrary, *MYC* signals were scattered all over the nuclei. Two other cases (NP37 and NP43), with a CGH gain but without high-level amplification, did not show any increase of *MYC* signals relative to the centromere. Nevertheless, the

mean *MYC* copy number per cell was 5.5 in case NP37. Case NP31 was not available for FISH analysis. Case NP18 (xenografted from a human metastasis) was normal for chromosome 8 by CGH, which was confirmed by FISH.

Figure 2 Ratio profiles obtained from the CGH analysis. Pictured profiles are those of the chromosomes with homozygous losses or losses present in all cells: 6q16~q21 and 13q21 in tumor NP29 and 18q21~q22 in NP40. The line in the middle of the profile indicates the base-line ratio (1.0); the lines on the left indicate ratio values of 0.5 and 0.75; and the lines on the right correspond to ratio values of 1.25 and 1.5.

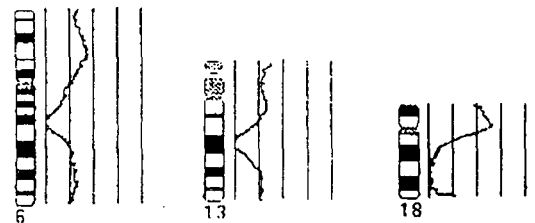


Table 2 CGH results for chromosome 8 and FISH results for CMYC gene (8q24), in eight xenografted pancreatic adenocarcinomas

Case	CGH results	FISH analysis					
		Mean copy number ^a			Percentage of cells with amplification		
		CMYC/cell	Centr 8/cell	CMYC/centr 8	No	Low level	High level
NP9	High-level amplification (8q)	7.3 (2.7)	3.5 (1.4)	2.3 (1)	16.5	64.5	19
NP18	Normal	3.1 (2.2)	2.6 (1.7)	1.2 (0.4)	81.05	18.95	0
NP29	Loss (8p11~q21.1 and high-level amplification (8q23~qter)	54.3 (28.5)	2.4 (0.8)	24 (13.4)	0	0	100
NP31	Gain (chromosome 8) and high-level amplification (8p23~pter)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NP37	Gain (chromosome 8) and high-level amplification (8p23~pter)	5.5 (3)	4.5 (2.2)	1.3 (0.4)	77	21.5	1.5
NP40	High-level amplification (8q24~qter)	7.5 (4.3)	2.1 (0.5)	3.7 (2.2)	5	48	47
NP43	Gain (8q13~qter)	2.6 (1.2)	2.4 (0.9)	1.1 (0.4)	94.5	4.5	1
NP46	High-level amplification (8q24~qter)	4.8 (3.5)	2.7 (2)	1.9 (1.2)	22.5	64.5	13

Abbreviation: NA, not analyzed.

*SD values in parenthesis.

even though a subclone with low-level amplification was present in 19% of cells.

CGH analysis showed an increased DNA copy number at 15q25~q26 in six of eight cases (NP9, NP29, NP37, NP40, NP43, and NP46). Cases NP9 and NP40 displayed a high-level amplification. Three of the seven tumors examined by FISH (NP37, NP40, and NP43) showed a slightly elevated *FES* copy number relative to the centromere with a range from 1.5- to 2-fold. In the other four cases, the *FES*

gene copy number was closely associated with the copy number of the chromosome 15 centromere on a cell-by-cell basis.

The same seven pancreatic tumors examined by FISH and tumor NP31 were analyzed for amplification of the *IGF1R* gene (15q25~qter) by Southern blot. Results are included in Table 3, and the Southern hybridization is shown in Figure 3. Similar results were obtained for digestions with two enzymes (Hind III and Pst). The level of

Table 3 CGH results for chromosome 15 and FISH and Southern results for *FES* and *IGF1R* genes (15q25~qter) in eight xenografted pancreatic adenocarcinomas

Case	CGH results	FISH analysis						Level of amplification of Southern analysis
		Mean copy number ^a			Percentage of cells with amplification			
		<i>FES</i> /cell	Centr 15/cell	<i>FES</i> /centr 15	No	Low level	High level	
(FL) NP9	Gain (chromosome 15) and high-level amplification (15q21~qter)	3.9 (1.4)	2.9 (1)	1.4 (0.4)	62.5	36	1.5	2.5
NP18	Loss (15q22~qter)	1.6 (1.4)	2.5 (1.7)	0.7 (0.3)	96	4	0	0.2
NP29	Gain (15q15~q26)	3.3 (1.3)	2.9 (1)	1.1 (0.4)	82.5	16.5	1	1.3
NP31	Normal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.1
NP37	Gain (15p25~qter)	4.4 (2.5)	3 (1.4)	1.5 (0.7)	54.5	40	5.5	2.6
NP40	High-level amplification (15q24~qter)	3.4 (1.2)	2.2 (0.5)	1.5 (0.5)	28.5	69	2.5	2.6
NP43	Loss (15cen~q13) and gain (15q15~qter)	2.2 (0.7)	1.1 (0.4)	2 (0.4)	7	88	5	4.3
NP46	Gain (15q22~qter)	2.7 (1.2)	2.2 (0.6)	1.2 (0.5)	74.5	24	1.5	2.7

Abbreviation: NA, not analyzed.

*SD values in parenthesis.

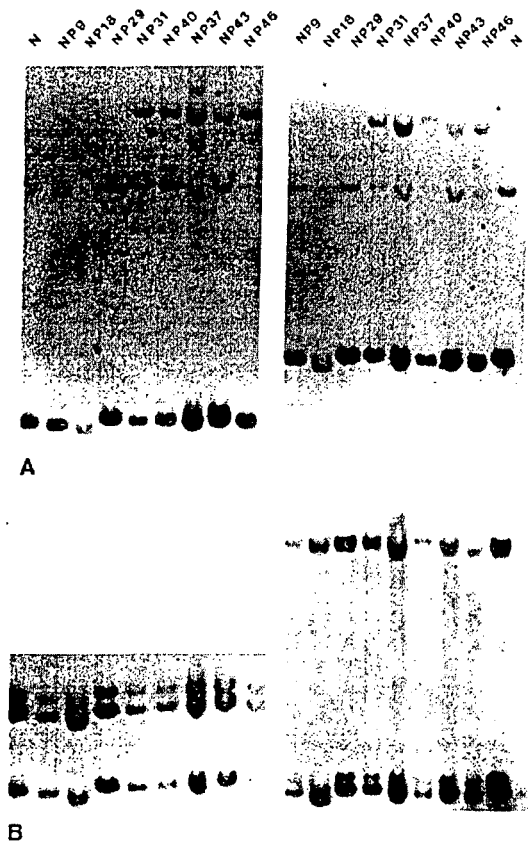


Figure 3 Southern blot of DNA from pancreatic tumor tissue samples. Total DNA was digested with Pst (left) and Hind III (right) enzymes. (A) Hybridization with the IGF1R probe. In all cases, including normal DNA, additional hybridizing band(s) were present. The nature of the extra bands is as yet unknown. (B) Hybridization with pEFD145 as a control probe. Abbreviation: N, normal tissue.

amplification was calculated as the average of both values. The gene was amplified (range 2.5- to 4.3-fold) in five cases (NP9, NP37, NP40, NP43, and NP46), which is in concordance with cases that showed a gain of 15q25~qter by CGH. Case NP18 (xenografted from a human metastasis) was the only case with a loss (instead of a gain) of 15q22~qter by CGH. Both FISH and Southern techniques displayed a reduced DNA copy number for the *FES* and *IGF1R* genes, respectively.

DISCUSSION

So far, no xenograft explants have been used in CGH analysis of pancreatic cancer. Enrichment for human tumor cells by using the xenograft method enabled the detection of more genetic changes at higher frequencies, compared

with previous studies on pancreatic carcinoma. We detected DNA-sequence copy number losses in several chromosomal sites: 18q21 (6/8 cases), 6q16~q21 (5/8 cases), 6q24~qter (5/8 cases), 9p23~pter (5/8 cases), 13q21 (4/8 cases), and 10p14~pter (3/8 cases).

Allelic imbalance on 10p has been detected, though at low frequency (17%), in pancreatic tumors [8]. Losses of the distal part of 10p have been observed by CGH as well: Mahlamäki et al. [22] reported 17.4% of cases with a loss of this region, whereas Fukushima et al. [21] reported a proportion comparable to the frequency detected in the present study (38.8% vs. 37.5%). We attempted to narrow the critical region by LOH analysis in the three tumors with a CGH loss of this area. All three tumors showed LOH for all the informative loci. Apparently, the entire region is necessary for the progression of these tumors. Furthermore, we tested two tumors without a CGH loss in this region to detect a possible minimal deletion but found no allelic losses. Therefore, a complete concordance between LOH and CGH was observed.

Band 18q21 contains genes that were described to be involved in pancreatic carcinogenesis, such as *DCC* and *DPC4* [14]. Other tumor suppressor genes reported to be involved in pancreatic carcinoma, such as *CDKN2A* (9p21) [10] and *RB1* (13q14.1) [18], are located close to but not in the minimal common band that was lost in our cases. The present findings suggest the involvement of other genes or regions in chromosomes 9 and 13, such as 9p23~pter and 13q21. Genetic losses of *DCC*, *CDKN2A*, *RB1*, *TP53*, and *APC* were studied in the same xenografted tumors that we report here [11]. There was an overall concordance with the CGH results. Anyway, two cases (NP18 and NP40) failed to detect an allelic loss of *TP53* and *DCC*, whereas a CGH loss was observed in the chromosomal site of these genes (17p13 and 18q21, respectively). This observation could be due to the fact that other genes located in the same chromosomal region are responsible for the CGH finding, such as *DPC4* in 18q21 or other unknown genes in 17p13.

Chromosome arm 6q appears to be recurrently lost in cancer of the pancreas by conventional cytogenetics and FISH [3, 5, 6], by LOH [7, 8], and by CGH [20–22]. We detected a loss of 6q material in 75% of samples. No suspected tumor suppressor genes involved in pancreatic carcinogenesis have been described so far in this region. According to our results, two different regions are deleted (6q16~q21 and 6q24~qter), and therefore at least two genes may be involved. *AIM1* (absent in melanoma 1), a gene mapped to 6q21, is associated with tumor suppression in a model of human melanoma [34].

In relation to gains detected by CGH, 87.5% of our tumors presented a gain in chromosome 8 (minimal common region 8q24~qter). The recurrent gain of the long arm of chromosome 8 was reported earlier in pancreatic cancer by conventional cytogenetics [4, 6] and by CGH [21, 22]. Consistently, one of these CGH studies reported gain and amplification of 8q23~qter, and the involvement of the *MYC* gene was suggested [22]. Previous investigations of the involvement of *MYC* in pancreatic cancer yielded somewhat contradictory results. A primary tumor and

their two metastatic lymph nodes were found to have a 50-fold amplification of *MYC* [35], whereas another study failed to detect any consistent immunohistochemical overexpression of C-*MYC* in 20 pancreatic carcinomas [36]. Our results from FISH analysis of interphase nuclei of seven pancreatic tumors showed two cases with a high-level copy number increase of *MYC* relative to the centromere (3.7- and 24.0-fold; Table 2). Two other tumors exhibited low-level amplifications (1.5- to 3.0-fold). Scattered signals of the *MYC* gene were found in cells of all tumors with amplification. They may most likely represent double minutes. The three remaining tumors showed 2.6, 3.1, and 5.5 *MYC* signals per cell but no gene amplification, because of an equal number of chromosome 8 centromere signals. Both mechanisms, gene amplification and chromosome aneusomy, may lead to the presence of extra *MYC* copies that could be involved in pancreatic carcinogenesis. In addition, other genes in 8q24~qter can be responsible for the high-level amplifications found by CGH.

The present study also revealed a gain of 15q25~q26 in 75% of cases, which has not been previously reported in pancreatic adenocarcinoma at such a high frequency. A previous CGH study reported loss of 15q (common change region 15cen~q15) in 33% of cases and gain of 15q24~qter in 25% of cases [22]. Two genes, *IGF1R* and *FES*, located in 15q25~qter, are known to be frequently up-regulated in many types of cancer. The *IGF1R* gene encodes the receptor for type I insulin-like growth factor, and it functions as an antiapoptotic agent by enhancing cell survival. The *FES* gene encodes a protein with tyrosine-specific kinase activity. FISH analyses of seven xenografted tumors indicated a low-level amplification of the *FES* gene in relation to the chromosome 15 centromere in three tumors (NP37, NP40, and NP43; Table 3). The mean *FES* copy number per cell exceeded 2.7 (as high as 4.4) in five tumors (NP9, NP29, NP37, NP40, and NP46). Case NP43 showed 2-fold amplification by FISH but a normal mean of *FES* signals (two). This finding could result from the loss of the centromeric region of chromosome 15, which was detected by CGH as well. In addition, an amplification of *IGF1R* relative to pEFD145 (chromosome 3) by means of Southern analysis was found in five of eight cases (NP9, NP37, NP40, NP43, and NP46; Table 3). This low-level increase ranged from 2.5 to 2.7, without considering case NP43, in which the increase of *IGF1R* was higher owing to the deletion of 3p21, where the reference probe used for Southern analysis was located. Case NP29 showed a DNA copy number increase by CGH in 15q25~q26 but without the involvement of the distal part of 15q26. This case presented neither *IGF1R* amplification (located in 15q25~qter) nor *FES* amplification (15q26.1). Therefore, the present findings suggest the involvement of another gene or other genes located in 15q25~q26. Nevertheless, our tumors showed *IGF1R* slightly more amplified than *FES*, and, similarly to *MYC*, extra gene copies could play some role in pancreatic cancer progression.

Another chromosome that clearly appeared to be recurrently gained in our tumors was chromosome 16 (75%). Gain of the distal region of the short arm of chromosome 16 was reported as the most frequently found imbalance

in an earlier CGH study on 23 pancreatic adenocarcinomas [20], but two other CGH reports did not detect it [21, 22]. According to our study, both arms of chromosome 16 were involved in gains, but the short arm was the most frequent. The fact that a large part of the chromosome was affected may indicate simultaneous gene copy number increases of more than one important gene.

Gain of chromosome 20 confirmed previous cytogenetic and CGH studies [5, 6, 20–22]. Our CGH results suggest that the main region is located at 20q13~qter, according to the high-level amplifications that were found. Fukushige et al. [21] analyzed five cell lines by FISH with chromosome 20 probes (20cen, 20q11, and 20q13.2). They found that 20q13.2 was increased by five to eight copies per cell. In breast cancer, Tanner et al. [37] identified 20q13.2 as the most important region of amplification on chromosome 20. A novel gene localized in 20q13 and named *BTAK* was found to be amplified and overexpressed in breast tumor cell lines [38].

An increased copy number at 19q was observed in 62.5% of cases. Recently, a cytogenetic and FISH analysis of chromosome 19 in nine primary pancreatic carcinomas narrowed the gained region to 19q13.1~13.2 [39]. These bands may harbor genes important in this type of tumor.

Of the two human metastases (NP9, a peritoneal metastasis, and NP18, a hepatic metastasis), NP9 exhibited aberrations similar to those in the primary tumors, whereas NP18 did not (with losses of 5p15, 5q12~q31, 9p21~pter, 12cen~q21, 15q22~qter, and 17p). In addition, the two metastases developed in mice maintained the aberrations of the original pancreatic tumor (NP18). This close similarity to the tumor of origin confirmed the stability of the xenograft model. Interestingly, both metastases showed gain of 11q12~q13 and 22q. One metastasis (a diaphragmatic implantation) had additional gains in chromosomes 16, 17q, 19q, and 20q. To evaluate this further, a larger number of tumors and their paired metastases should be studied.

In conclusion, the present study agrees with previous cytogenetic and molecular genetic findings of pancreatic cancer. Moreover, we identified several new chromosomal regions that are likely to harbor oncogenes and tumor suppressor genes relevant for the development or progression of pancreatic adenocarcinoma. Some of these genes have been tested for amplification, such as *MYC* (8q24), *FES* and *IGF1R* (15q25~qter). Our data suggest that other genes located in these regions may play a more important role in the biology of pancreatic carcinoma.

We thank Dr. Marta Bernués and Dr. Carmen Casadevall for assistance in Southern analysis. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant No. 97/0214, by a grant from the government of Catalonia (1996SGR 00073), and by a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

REFERENCES

1. Niederhuber JE, Brennan MF, Menck HR (1995): The National Cancer Database report on pancreatic cancer. *Cancer* 76:1671–1677.

2. Hall PA, Lemoine NR (1993): Models of pancreatic cancer. In: *Cancer Surveys*, vol 6: The Molecular Pathology of Cancer. Imperial Cancer Research Fund, pp. 135-155.
3. Johansson B, Bardi G, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Bak-Jensen E, Andrén-Sandberg A, Mitelman F (1992): Nonrandom chromosomal rearrangements in pancreatic carcinoma. *Cancer* 69:1674-1681.
4. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Andrén-Sandberg A, Mitelman F, Heim S (1993): Karyotypic abnormalities in tumours of the pancreas. *Br J Cancer* 67:1106-1112.
5. Griffin CA, Hruban RH, Morsberger LA, Ellingham T, Long PP, Jaffe EM, Hauda KM, Bohlander SK, Yeo CJ (1995): Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 55:2394-2399.
6. Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B (1998): Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and non-random pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosom Cancer* 23:81-99.
7. Seymour AB, Hruban RH, Redston MS, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE (1994): Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 54:2761-2764.
8. Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1995): Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 55:4670-4675.
9. Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, van Weering DHJ, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993): *K-RAS* oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas: a study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143:545-554.
10. Caldas C, Hahn SA, daCosta LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994): Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (*MTS1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8:27-32.
11. Reyes G, Villanueva A, García C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capellà G (1996): Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 56:5713-5719.
12. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone B, Solcia E, Ranzani GN (1994): *K-RAS* and *P53* gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54:1556-1560.
13. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa LT, Yeo CJ, Kern SE (1994): *P53* mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54:3025-3033.
14. Hahn SA, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996): Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 56:490-494.
15. Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch HT, Hruban RH, Kern SE (1996): Germline *BRCA2* gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 56:5360-5364.
16. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, Nakamura Y (1992): Frequent somatic mutations of the *APC* gene in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 52:6696-6698.
17. Höhne MW, Halatsch ME, Kahl GF, Weine! RJ (1992): Frequent loss of expression of the potential tumor suppressor gene *DCC* in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 52:2616-2619.
18. Ruggeri B, Zhang S-Y, Caamano J, DiRado M, Flynn SD, Klein-Szanto AJP (1992): Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the *P53* and *RB-1* tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7:1503-1511.
19. Knuutila S, Björkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius V-M, Vidgren V, Zhu Y (1998): DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152:1107-1123.
20. Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P (1996): Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 56:3803-3807.
21. Fukushige S, Waldman FM, Kimura M, Abe T, Furukawa T, Sunamura M, Kobari M, Horii A (1997): Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 19:161-169.
22. Mahlamäki EH, Höglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andrén-Sandberg A, Kallioniemi O-P, Johansson B (1997): Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosom Cancer* 20:383-391.
23. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10:231-243.
24. Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995): Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas I: occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21~q22 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:8-14.
25. Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995): Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas II: identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:15-21.
26. Williams BJ, Jones E, Kozlowski JM, Vessella R, Brothman AR (1997): Comparative genomic hybridization and molecular cytogenetic characterization of two prostate cancer xenografts. *Genes Chromosom Cancer* 18:299-304.
27. El-Rifai W, Harper JC, Cummings OW, Hyytinen ER, Frierson HF, Knuutila S, Powell SM (1998): Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastro-esophageal junction adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:34-37.
28. Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Böhling T, Asko-Seljavaara S, Blomqvist C, Elomaa I, Karaharju E, Kivioja AH, Siimes MA, Tukiainen E, Caballín MR, Myklebost O, Knuutila S (1997): Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 75:1403-1409.
29. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380:152-154.
30. Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Isola J (1994): Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 16:93-99.
31. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo W-L,

use supply missing information
ON THIS PROOF!
 See query on manuscript page(s) 18

MASTER PROOF

- Waldman FM, Isola JJ, Gray JW, Kallioniemi O-P (1994): Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. *Cancer Res* 54:4257-4260.
32. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan X-Y, Sauter G, Kallioniemi O-P, Trent JM, Meltzer PS (1997): AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968.
33. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA (1993): Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* 210:235-244.
34. Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM (1997): *ADM1*, a novel non-lens member of the β , γ -crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3229-3234.
35. Yamada H, Yoshida T, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T (1986): Establishment of a human pancreatic adenocarcinoma cell line (PSN-1) with amplifications of both *C-MYC* and activated *C-KI-RAS* by a point mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 140:167-173.
36. Sakorafas GH, Lazaris A, Tsiotou AG, Koullias G, Glinatsis MT, Golematis BC (1995): Oncogenes in cancer of the pancreas. *Eur J Surg Oncol* 21:251-253.
37. Tanner M, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuukasjärvi T, Collins C, Kowbel D, Guan X-Y, Trent J, Gray JW, Meltzer P, Kallioniemi O-P (1996): Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res* 56:3441-3445.
38. Sen S, Zhou H, White RA (1997): A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14:2195-2200.
39. Höglund M, Gorunova L, Andren-Sandberg A, Dawiskiba S, Mitelman F, Johansson B (1998): Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome 19 aberrations in pancreatic carcinomas: frequent loss of 19p13.3 and gain of 19q13.1~13.2. *Genes Chromosom Cancer* 21:8-16.

Article V

Clonal evolution and divergence in the metastatic progression of human pancreatic cancer studied by CGH

Genes Chromosomes and Cancer (enivat)

**CLONAL EVOLUTION AND DIVERGENCE IN THE METASTATIC
PROGRESSION OF HUMAN PANCREATIC CANCER STUDIED BY CGH**

**Gemma Armengol¹, Gabriel Capellà^{2,3}, Lourdes Farré², Miguel Angel Peinado⁴, Rosa
Miró⁵, Maria Rosa Caballín¹**

¹Unitat d'Antropologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona;

²Laboratori d'Investigació Gastrointestinal, Institut de Recerca Hospital de Sant Pau,

Barcelona; ³Laboratori de Recerca Translacional, Institut Català d'Oncologia; L'Hospitalet de

Llobregat; ⁴Departament de Càncer i Metàstasi, Hospital Duran Reynals, L'Hospitalet de

Llobregat; ⁵Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona;

Corresponding author:

Gemma Armengol Rosell

Unitat d'Antropologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,

08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

Phone no. 34-93-5812049

Fax no. 34-93-5811321

Abbreviated title: Metastatic progression of human pancreatic cancer

ABSTRACT

Metastases are thought to be derived from emerging clones in primary tumors. Although the concept of clonal evolution of cancer is well defined, the genetic grounds and significance of this process in human cancer progression is still poorly understood. To gain insight on the genetic basis and clonal evolution underlying metastatic progression of human pancreatic cancer in vivo, we analyzed by comparative genomic hybridization (CGH) chromosomal imbalances in seven metastases originated in nude mice and their originary three xenografted human pancreatic tumors. All metastases were found to be closely related to the corresponding originary tumor, maintaining the same genetic alterations with many additional changes. Recurrent metastasis-specific alterations included gains at 16cen-q22 and 17q21-qter. The CGH results from paired specimens of the same patient allowed us to define a hypothetical precursor clone. This prime clone would share chromosomal abnormalities with the primary tumor and would evolve toward metastasis because of the acquisition of novel genetic alterations as reflected in the CGH pattern.

MANUSCRIPT

Disruption of the organization of the genetic material is characteristic of tumor cells. Foulds (1954; 1975) and Nowell (1976) hypothesized that genetic instability exists within tumors and that genetic changes (consequence of the genetic instability) are responsible for cell heterogeneity. Variant cells would emerge throughout the evolution of the tumor and the rising cell subclones would be subsequently selected according to their biological behavior (vascular invasion, metastatic ability, drug resistance, etc.).

Metastatic ability of tumor cells underlies the most frequent cause of cancer treatment failure nowadays. It is generally assumed that metastatic clones arise from variant subclones within the primary tumors. In fact, when analyzing paired primary and metastatic tissues, a progenitor clone may be defined even in spite of the often observed heterogeneity. Controversy exists regarding the kinetics of the heterogeneity in metastatic clones since it could be due to an initial diversity of the primary tumor subpopulation or due to the accumulation of several genetic alterations during the independent evolution of metastasis.

The extent to which the primary and metastatic cell clones are different from one another is an important question for both tumor biology and clinical oncology. Studies to compare changes in the metastases with those found in the corresponding primary tumors in the same patient would make it possible to assess the degree of clonal evolution and genetic heterogeneity that characterizes the metastatic progression. The analysis of paired specimens would also be informative in revealing subtle genetic differences between primary and metastatic lesions and thereby pinpointing genetic events that could have predisposed to metastatic dissemination (Kuukasjärvi et al., 1997).

One of the tumors with a high invasive and/or metastatic capacity is pancreatic adenocarcinoma. Due to its metastatic spread and its late diagnosis, its prognosis is very poor (Brand and Tempero, 1998). Orthotopic implantation - in the corresponding organ of origin - in nude mice has proved a good in vivo model for the study of pancreatic cancer. A complete concordance is observed between the histological appearance of the primary and the perpetuated tumors in mice (Fu et al., 1992; Reyes et al., 1996) as well as in the expression of tumor-associated antigens (Fu et al., 1992). In contrast to subcutaneous implantation, where only local growth occurs, orthotopic implantation more closely reproduces the metastatic behavior of the tumor (Fu et al., 1992; Reyes et al., 1996). Dissemination is present in a high (up to 50%) proportion of cases of perpetuated tumors, is tumor-specific, and keeps stable through a high number of passages (Reyes et al., 1996). The use of solid tumor fragments, where heterogeneity of tumor cell populations is high, in conjunction with the implantation in a favorable microenvironment, may account for this high percentage of dissemination. This model system should be an excellent tool to study the genetic basis of divergence of metastatic clones. Furthermore, the use of xenograft explants has proved useful in genetic analysis because of the enrichment for the neoplastic cell population, especially in pancreatic carcinoma which characteristically generates an intense host desmoplastic reaction (Hahn et al., 1995).

Comparative genomic hybridization (CGH) has been established as a powerful approach to carry out a comprehensive search for gains and losses of DNA sequences in genomic tumor DNA (Kallioniemi et al., 1992). It provides results that are considered to be representative of the entire tumor. Previously, we have shown on eight orthotopic xenografts of pancreatic carcinoma studied by CGH, recurrent gains on chromosomes 8q, 15q, 16, 20q, and 19q, and recurrent losses on chromosomes 18q, 6q, and 9p (Armengol et al., 1999). Since the pattern of

dissemination keeps constant through several passages and distinct passages of orthotopically implanted tumors show a considerable genetic stability we have used the CGH technique to address the issue of the origin of clonal divergence in the metastatic process.

We have analyzed by means of CGH three orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas in nude mice and their seven corresponding metastases obtained from earlier passages. Characteristics of the orthotopic xenografts are as follows: NP9, a poorly differentiated tumor, was originated from a peritoneal metastasis and consistently produced peritoneal metastases when allowed to disseminate. The original tumor and two peritoneal metastases were studied. NP18, also a poorly differentiated tumor, was originated from an hepatic metastasis and developed a mixed peritoneal and hepatic dissemination pattern. A total of four metastases (two hepatic and two peritoneal) were analyzed. Finally, NP46 was originated from a primary tumor, and after six months developed minor peritoneal metastases. One peritoneal metastasis was studied. Results of the three original xenografts and two metastases were included in a previous study (Armengol et al., 1999).

CGH analysis was performed as described by Armengol et al. (1999). Briefly, tumor DNA was labeled with Fluorescein-dUTP (DuPont, Boston, MA) and normal DNA was labeled with Texas Red-dUTP (DuPont), using nick-translation procedures in both. Each of the labeled DNAs (800 ng) were mixed and hybridized to normal metaphase spreads for 2-3 days. Hybridizations were analyzed with an Olympus fluorescence microscope and the Cytovision digital image system (Applied Imaging, Sunderland, UK), which is based on a high sensitivity integrating monochrome CCD camera and an automated CGH analysis software package.

Chromosome regions were interpreted as gains when the green-to-red ratio was above 1.25 and as losses when the ratio was below 0.75. A copy number change was considered a high-level amplification when the ratio exceeded 1.5 and a ratio below 0.5 was considered a homozygous loss or a loss present in almost all the cell population. These cutoff values were determined based on the negative control experiments. In each CGH experiment a negative control was included. The mean green-to-red ratio in all negative CGH experiments remained between 0.75 and 1.25.

CGH results are shown in Figure 1. All metastases analyzed had more genetic alterations than the corresponding original tumor. Moreover, in all cases, the metastases had some gains and losses involving the same chromosome regions than the original tumors, but with CGH profiles more deviated from the balanced value. These quantitative differences could be caused by differences between the extent of the genetic alteration or by a predominance of subpopulations bearing such aberrations (Nishizaki et al., 1997).

Tumor NP9. Orthotopic xenograft of tumor NP9 at passage 5 harbored a high number of gains and losses. It had evolved 6 months after implantation and subsequent serial passaging in the pancreas of 5 distinct animals. The two metastases analyzed were obtained after three months of tumor implantation in the pancreas of nude mice (passage 1). Therefore, these metastases showed a shorter period of evolution than the orthotopic xenograft. However, all alterations present in the orthotopic implant were detected in the metastases as well. Moreover, non-random additional alterations were detected in the metastases. Both metastases acquired three alterations and two of them were shared by both metastases clearly suggesting that both metastases come from a common ancestor, already distinct from the still dominant clone in the orthotopic xenograft six months later (Figure 1A).

Tumor NP18. An orthotopic xenograft of tumor NP18 at passage 5 and four distinct metastases obtained from passage 1 were analyzed. CGH pattern is depicted in Figure 1B. The four metastases shared an identical common CGH pattern with the xenograft in spite of a distinct evolution. Moreover, metastases acquired many additional gains. All metastases are clonally related among them suggesting that they originate from distinct but related clones arising in the orthotopic implant.

Tumour NP46. Tumour NP46 had a moderate tendency to metastasize. In this case an orthotopic implant (passage 6) and a single metastasis from passage 1 were analyzed. Both tumors were closely related with two additional alterations (+16q, and +20q) and two quantitative alterations (+9p and -18q) being detected in the metastasis (Figure 1C).

Several observations come up from the present study:

Interestingly, the same chromosomal regions that were involved in the orthotopic implants were also found in the respective metastatic tumors. All the metastases presented the same genetic alterations than the original tumors, or even with profiles more deviated, plus new aberrations that may be characteristic of the metastatic process (see below). There was only one aberration with a subtle difference: NP46 presented a loss of whole chromosome 10 whereas the corresponding peritoneal metastasis showed only a loss of 10q. Overall, the total number of aberrations, as measured by CGH, detected in metastases was higher than that observed in orthotopic xenografts, even after a more prolonged independent evolution. This observation supports the notion that cancer progression and dissemination associates with the acquisition of further genetic changes (Fearon et al., 1990).

In addition, subtle genetic differences between primary and metastatic lesions were revealed. Our data suggest a correlation of metastatic events in pancreatic carcinomas with an increase in the copy number of genes located at 16q, in particular at 16cen-q22, as well as genes of 17q21-qter, as they appeared in three metastatic samples from two different tumors. A larger number of paired tumour and metastatic samples should be studied to pinpoint genetic events that could predispose to metastatic dissemination of pancreatic cancer as has been done in other types of tumors (i.e. renal clear cell carcinomas, Gronwald et al.,1997).

Since the number of shared genetic changes is a rough estimate of the degree of clonal relationship (Kuukasjärvi et al., 1997), these results constitute strong evidence for a close clonal relationship between xenografts and their paired metastases. What is more, the concomitant metastases analyzed from two cases (NP9 and NP18) have shown to be clonally related among them. This observation strongly suggests that the majority of additional alterations observed in the metastases were already present in subclones arising in the orthotopic xenografts that delivered cells into the blood stream. Since these subclones were not dominant in the microenvironment of the orthotopic implant they could not be not detected by CGH.

In every case it has been possible to construct the genetic composition of a common progenitor cell clone, present in the first orthotopic implant, that would be the origin of distinct subclones differently selected for depending upon the anatomical site: pancreas, liver or peritoneum. While heterogeneity found in the metastatic samples may be due to accumulation of genetic alterations after the divergence of the primary and metastatic tumor clones, as postulated by Kuukasjärvi et al. (1997) for breast cancer, at least a significant proportion of them were already present in rising subclones within the primary tumor.

To our knowledge, this is the first report of such a clonal chromosomal evolution evidenced by the pancreatic neoplastic cells. In a previous CGH study on pancreatic carcinoma, Mahlamäki et al (1997) observed that the DNA copy number changes in nine metastatic samples did not substantially differ from the overall pattern of imbalances in 15 primary carcinomas. Furthermore, in one case, paired primary-metastasis samples displayed almost identical abnormalities. Based on these findings, they concluded that clonal evolution in pancreatic carcinoma cells, as regards genomic imbalances, was quite similar irrespective of their location. Discrepancies may be attributed to the use of a model system and/or to distinct sensitivities when using tumour biopsies where significant stromal contamination may preclude detection of gains or losses.

In conclusion, the ability of CGH to provide detailed comparisons of genetic changes in paired specimens of pancreatic carcinomas and their metastases has enabled the study of the metastatic progression of human pancreatic cancer in vivo. According to our CGH findings, tumors and their metastases are often clearly derived from the same precursor clone. Some genetic changes, such as gains of 16q and 17q, may give clues to the basic molecular mechanisms providing a selective advantage for the metastatic pancreatic process. Although further investigations are required, our results may have implications to understand the genetic basis underlying metastatic progression of human cancer in vivo.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant 97/0214) and Plan Nacional I+D (SAF 98-42) and by a grant from the Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

REFERENCES

Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capellà G, Miró R, Caballín MR (1999) DNA copy number changes and evaluation of *MYC*, *IGF1R*, and *FES* amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet. In press.*

Brand RE, Tempero MA (1998) Pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 10: 362-326.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

Foulds L (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14: 327-339.

Foulds L (1975) Neoplastic development. London: Academic Press.

Fu X, Guadagni F, Hoffman RM (1992) A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5645-5649.

Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grev H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J, Cremer T (1997) Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas

and metastatic sites importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res* 57: 481-487.

Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kem SE (1995) Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 55: 4670-4675.

Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.

Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Isola J (1997) Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57: 1597-1604.

Mahlamäki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi O-P, Johansson B (1997) Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosom Cancer* 20: 383-391.

Nishizadi T, DeVries S, Chew K, Goodson III WH, Ljung B-M, Thor A, Waldman FM (1997) Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* 19: 267-272.

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.

Reyes G, Villanueva A, García C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capellà G (1996) Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire additional genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 56: 5713-5719.

LEGENDS TO THE FIGURE

FIGURE 1. Hypothetical common stemline and subsequent clonal evolution and tumor progression pathways for xenografted tumors and their metastases in three different pancreatic carcinoma cases (A, NP9; B, NP18; C, NP46) who all had metastases clearly clonally related to xenografted tumor. Solid-line boxes depict CGH results and dotted-line boxes show the putative clones present in the xenografted tumor. Subchromosomal breakpoints are not included in the latter. High-level amplifications and homozygous losses are shown in bold, and quantitative differences are given in parenthesis (see text). Additional acquired alterations are in italic, and underlined figures represent alterations that might have occurred in the metastatic site.

A

Elapsed time = 6

Pancreas #1

Pancreas #5

-4,+5,-6,+8q,+9,-10p,+10q,+12,+15(15q),+16,-18q,+20,+22,-Y

-4,+5,-6,+8q,+9,-10p14-pter,+10q,+12,+15(15q21-qter),+16,-18q12-

-4,+5,-6,+8q,+9,-10p,+10q,+12,+13,+15(15q),+16,-17p,-18q,+20,+22,-Y

Putative common ancestor

+8p
+17q

-1q,(-4),(-6q),
(+12),(+20)

-4,+5,-6,+8,+9,-10p12-pter,
+10q,+12,+13,+15q15-qter,
+16,-17p,+17q21-qter,
-18cen-q22,+20,+22,-Y

-1q41-qter,-4,+5,-6(-6p12-q24),
+8q,+9,-10p12-pter,+10q,+12,
+13,+15q22-qter,+16,-17p,
-18cen-q22,+20,+22,-Y

Elapsed time = 3 months

Peritoneal metastasis1

Peritoneal metastasis2

B

Elapsed time = 12 months

Pancreas #1

Pancreas #5

-5p,-5q,-9p,-12q,-15q,-17p

Putative common ancestor

-5p15,-5q12-q31,-9p22-pter,
-12cen-q21,-15q22-qter,-17p

(-5q),+22q

-5p14-pter,-5cen-q31,-9p21-pter,
-12cen-q21,-15q21-qter,-17p,+22q

Liver metastasis1

+11q

-5p15,-5q12-q31,-9p21-pter+11cen-q13,
-12q12-q21,-15q22-qter,-17p12-pter,+22q

Liver metastasis2

+16,+17q,+19q,+20q

-5p15,-5q12-q31,-9p22-pter,+11q12-q13,
-12cen-q21,-15q22-qter,+16,-17p,+17q,
+19q,+20q,+22q

Perit.metastasis1

+3p,+4p,(-5q),+6p,+6q,+7,+8q,+9q,+12q,+14q,(+22q)

+3p14-p24,+4p15-pter,-5p15,-5p12-q31,+6p21-p23,
+6q24-qter,+7,+8q,-9p21-pter,+9q22-q34,+11q,
-12cen-q15,+12q22-qter,+14q21-q32,-15q21-qter,
+16,-17p,+17q21-qter,+19q,+20cen-q13.2,+22q

Perit.metastasis2

Elapsed time = 5 months

C

Pancreas #1

Elapsed time = 12 months

Pancreas #6

-3p,-6,+8q,+9p,-10,+12q,
+15q,+16p,+17q,+18p,-
18q,+19q,+Xq

Putative common ancestor

-3p21-pter,-6,+8q24,+9p21-p22,-10,
+12q23-qter,+15q22-qter,+16p,+17q,
+18p,-18q,+19q,+Xq25-qter

(+9p), +16q, (-18q), +20q

-3p21-pter,-6,+8q23-qter,+9p21-p22,-10q11.2-q25,
+12q22-qter,+15q14-qter,+16pter-q22,+17q21-qter,
+18p,-18q(-18q12-q22),+19q,+20q12-q13.2,+Xq23-qter

Peritoneal metastasis

Elapsed time = 7 months

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. APLICACIÓ DE LA CGH

La CGH permet detectar fàcilment i en un únic experiment els desequilibris presents en un genoma determinat, amb el DNA com a únic requisit. Amb aquesta tècnica és possible identificar regions de guany o pèrdua de seqüències de DNA, com delecions, duplicacions i/o amplificacions. Així, doncs, pot detectar aquelles anomalies recurrents desequilibrades presents en els tumors mentre que les reorganitzacions equilibrades passen desapercebudes.

Les reorganitzacions cromosòmiques estructurals equilibrades (majoritàriament translocacions però també inversions) són més específiques de tumor que els canvis desequilibrats. Aquestes anomalies equilibrades són més freqüents en les neoplàsies hematològiques, particularment en les leucèmies agudes, que en els tumors sòlids, especialment aquells d'origen epitelial, que es caracteritzen per anomalies desequilibrades. Això pot ser degut, per una banda, al fet de que s'han analitzat citogenèticament menys neoplasmes sòlids. Aquests tumors sovint mostren cariotips bastant complexos i de tan baixa qualitat que pot ser quasi impossible identificar algunes anomalies. Si això fos així, investigacions citogenètiques acurades de més tumors sòlids, potser combinats amb noves tècniques, com la FISH multicolor, augmentarien la proporció de reorganitzacions equilibrades als tumors sòlids. Per altra banda, és igualment possible que les reorganitzacions equilibrades reflecteixin diferències en l'origen del llinatge cel·lular i/o un avantatge selectiu d'aquestes anomalies. Els canvis cromosòmics equilibrats freqüentment resulten en reorganitzacions de gens que codifiquen per factors de transcripció. Per tant, és possible que les anomalies estructurals d'aquest gens principals siguin de menys importància patogenètica en el desenvolupament dels tumors sòlids que en les leucèmies. Potser els tumors caracteritzats per aberracions equilibrades s'originen de tipus cel·lulars que mostren reorganitzacions genètiques en la seva ontogènia, tal com la recombinació somàtica que es produeix durant la diferenciació de cèl·lules B i T. En canvi, els tumors sòlids amb només canvis desequilibrats probablement s'originen de cèl·lules en les quals aquestes recombinacions no es donen mai. Aquesta hipòtesi, que va ser plantejada per Mitelman i

col. (1997), ha de ser investigada més a fons. Al contrari que a les reorganitzacions equilibrades, les conseqüències moleculars de les anomalies recurrents desequilibrades són virtualment desconegudes. El resultat patogenèticament important dels guanys i pèrdues de material cromosòmic s'atribueix de forma general a l'amplificació d'oncogens o deleció de gens supressors de tumors.

4.2. OPTIMITZACIÓ DE LA CGH

En el present estudi es va posar a punt la tècnica de la CGH al laboratori de la Unitat d'Antropologia de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les mostres a partir de les quals es feia l'extracció de DNA provenien tant de teixits congelats com de teixits fixats en parafina. Els teixits frescos, però, sempre eren preferibles perquè el DNA dels tumors arcaics fixats en parafina estava tot sovint degradat.

Tant el DNA tumoral com el normal s'havien de marcar per poder detectar després els fragments hibridats. En el cas de que el DNA estigués degradat, s'incubava el DNA amb menys quantitat de DNasa per tal d'obtenir els fragments de la longitud desitjada. En els primers moments del desenvolupament de la tècnica es feia el marcatge indirecte. Es marcava el DNA tumoral amb biotina-14-dATP i el DNA normal amb digoxigenina-11-dUTP. Després, aquestes molècules eren detectades mitjançant anticossos marcats amb fluorescència (FITC i TRITC). Posteriorment, es va descriure que el marcatge directe amb nucleòtids que porten fluorocroms incorporats (Fluoresceïna i Texas Red) millorava la qualitat de les hibridacions (menys granuloses) i disminuïa el temps invertit (no calia fer detecció immunoquímica). Així doncs, també en el nostre laboratori vam adoptar aquest nou mètode de marcatge.

La qualitat de la hibridació depenia en gran manera de la qualitat de les metafases sobre les que s'hibridaven els DNAs. Els cromosomes eren avaluats en un microscopi de contrast de fases. Calia que els cromosomes fossin foscos, sense ser grisos ni birefringents i sense restes citoplasmàtiques, que dificulten la hibridació. S'havien de deixar envellir entre dues setmanes i dos mesos a temperatura ambient. A mesura que les extensions estaven més envellides es feien més resistents a la

desnaturalització i s'havien de desnaturalitzar a temperatures més elevades. A més, per aquelles extensions amb més restes de citoplasma s'incrementava la concentració de proteïnasa K. Es van analitzar les imatges obtingudes de les hibridacions mitjançant un microscopi d'alta qualitat i els sistemes d'anàlisi d'imatges MetaSystems i Cytovision. Ambdós sistemes contenien paquets de software automatitzats per analitzar la CGH. La mateixa preparació analitzada amb els dos sistemes donava els mateixos resultats. Així, doncs, ambdós sistemes eren fiables i comparables.

4.3. CANVIS GENÈTICS RECURRENTS ALS ET MITJANÇANT CGH (articles I, Armengol i col., 1997; i II, Tarkkanen i col., 1999)

Es va aplicar la CGH per detectar canvis en el nombre de còpies de seqüències de DNA en els ET. Es van analitzar un total de 37 mostres (31 tumors primaris, 3 tumors recorrents i 3 metàstasis) de 34 pacients. Es van observar canvis en el nombre de còpies en 28 mostres (76%). En general, els tumors presentaven poques aberracions (unes dues per mostra). Aquest baix nombre de desequilibris podia ser degut a: la importància de la translocació t(11;22), que és específica d'aquest tipus de tumor i que no es pot detectar per CGH, o bé a la contaminació per cèl·lules normals o a l'heterogeneïtat genètica intratumoral. Els guanys de seqüències de DNA eren molt més freqüents que les pèrdues, i la majoria de guanys afectaven tot el braç d'un cromosoma o cromosomes sencers.

En un primer estudi (**article I**), es van analitzar 20 mostres. Els canvis més freqüents implicaven el guany del braç llarg del cromosoma 1 (25% de les mostres) i el guany dels cromosomes 8 i 12 (35% i 25%, respectivament). Aquests canvis s'anomenen secundaris perquè no tenen l'especificitat de la translocació. La regió comú mínima pel cromosoma 1 era 1q21-q22. Forus i col. (1996) havien trobat ampliació dels gens *FLG* i *SPRR3*, localitzats a 1q21, en algunes mostres de sarcoma humà. Per això en el nostre estudi vam avaluar mitjançant Southern blot l'amplificació d'aquests dos gens en un cas d'ET amb un alt nivell d'amplificació a 1q21-q22 per CGH. Ambdós gens estaven amplificats. En el cromosoma 8 es va trobar per CGH una regió altament amplificada a 8q13-qter, suggerint que aquesta regió podia contenir gens importants en el desenvolupament i/o progressió dels ET, com per

exemple el gen *MYC*, localitzat a 8q24. Malgrat tot, quan hi ha grans regions guanyades és difícil identificar gens individuals, ja que hi podria haver diversos gens alterats simultàniament. Pel què fa al cromosoma 12, sembla que succeeix quelcom semblant, perquè es veia afectat tot el cromosoma 12. A més, en sarcomes s'han vist amplificacions de gens localitzats a 12q13-q15 (*MDM2* i *CDK4*; Ladanyi i col., 1995), i guanys de 12q21-q22 i 12q24 (Suijkerbuijk i col., 1994; Forus i col., 1995a). Els resultats obtinguts amb la CGH coincidien de forma general amb els resultats previs de citogenètica (trisomia 8, trisomia 12 i guanys parcials de 1q degut a la translocació desequilibrada der(16)t(1;16)). En el nostre estudi, a més, en comparar els resultats de la CGH amb l'anàlisi citogenètica dels mateixos tumors, no es van observar discrepàncies. En alguns casos, hi havia una coincidència completa, mentre que en altres la morfologia dels cromosomes feia difícil el cariotipatge.

Es pot considerar, doncs, la translocació t(11;22) o una translocació variant, com a l'esdeveniment crític i primari, mentre que els canvis secundaris podrien tenir una significació pronòstica. En aquest sentit, es va realitzar un segon estudi (**article II**) incloent més mostres per avaluar la correlació entre aquests canvis secundaris i la supervivència dels pacients. En total es va disposar de 28 tumors primaris. Les aberracions més comuns continuaven sent el guany del cromosoma 8 (36%), guanys a 1q21-q22 (18%) i el guany del cromosoma 12 (11%), encara que es van observar altres anomalies freqüents, com el guany de 7q (18%) i de 6p21.1-pter (11%), i la pèrdua de 16q (11%). Els augments en el nombre de còpies de 1q21-q22 i dels cromosomes 8 i 12 estaven associats amb una tendència a un pitjor pronòstic, encara que les diferències no eren significatives. En canvi, els pacients amb tumors amb guanys a 6p sí que van mostrar pitjor pronòstic que els pacients sense aquesta anomalia, tant pel què fa a la supervivència global ($p=0.004$), com pel què respecte al període lliure de malaltia ($p=0.04$). Cal fer notar, però, que aquests pacients tenien altres factors clínics associats a baix pronòstic, com poden ser la presència de metàstasis en el moment del diagnòstic i el fet de ser tumors grans i centrals (veure Taula 1 de l'article II). Així doncs, es fa difícil estimar les implicacions de l'augment en el nombre de còpies de 6p21.1-pter. Fins ara no s'ha localitzat cap oncogen relacionat

amb els ET en aquesta regió. Seria necessari estudiar un major nombre de pacients amb ET per tal de confirmar el valor pronòstic d'aquestes anomalies. Tenint en compte la baixa freqüència d'aquest tipus de tumors i el petit tamany de la mostra degut a l'ús de biòpsies d'agulla fina per al diagnòstic, es fa difícil estudiar un elevat nombre de casos.

4.4. ESTUDI D'UNA MESCLA DE DNAs DE TUMORS DE LA MATEIXA ENTITAT CLINICO-PATOLÒGICA MITJANÇANT CGH (article III, Knuutila i col., 1998)

Es van estudiar mitjançant CGH mescles de DNAs de diferents mostres d'un mateix tipus de tumor i que prèviament havien estat estudiades cas a cas. Es van analitzar sis mescles diferents de DNAs : 28 limfomes difusos centroblastics (DCL), 28 tumors gastrointestinals estromals (GIST), 21 condrosarcomes primaris (CS), 17 mostres d'ET, 14 liposarcomes (LS), i 14 mesoteliomes (MS). Es van detectar aquells canvis presents en almenys un 50% dels tumors individuals : els DCL mostraven guany a 18q22-qter ; els GIST mostraven pèrdues al cromosoma 14 i a 22q12, i guanys a 5p, 8q22-q24, 17q22-qter, i 19q13; els ET mostraven guanys a 1q i 8q13-qter; els LS mostraven guanys a 1q21-q25 i 12q; i els MS mostraven pèrdua a 9p22-pter. A la mescla de DNAs de CS no es van observar canvis, ja que cap dels canvis observats en les mostres individuals superaven el 35% dels casos.

Amb aquest nou enfoc de la CGH es pretenia detectar amb un únic experiment de CGH aquelles anomalies citogenètiques desequilibrades més característiques del tumor. Així, i teòricament, es podien detectar anomalies presents en un 30% de la població cel·lular total (es feien servir els límits de 1.17 i 0.85). Malgrat tot, cal tenir en compte els factors que poden fer variar aquest percentatge (veure Material i Mètodes). Mitjançant aquesta estratègia, es van identificar els canvis en el nombre de còpies de DNA que estaven presents a la majoria de tumors individuals (estudiats cas a cas). Aquest canvis són les anomalies recurrents que més interessin, perquè segurament les regions implicades contenen gens importants en el desenvolupament del tumor. La concordància entre els resultats de la mescla de DNAs i els casos individuals suggereix que la mescla de DNAs és útil per

un cribatge ràpid dels canvis recorrents i primaris en el nombre de còpies de DNA en un tipus de tumor.

4.5. ESTUDI D'ADENOCARCINOMA DE PÀNCREAS PER CGH I AVALUACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ DE *MYC*, *FES* I *IGFRI* (article IV, Armengol i col., 1999)

Es van estudiar per CGH vuit casos d'adenocarcinoma de pàncreas que havien estat implantats en ratolins atímics i dues metàstasis desenvolupades en els ratolins a partir d'un dels tumors implantats.

Es van observar múltiples anomalies : guanys del cromosoma 8 (mínima regió comú 8q24 ; a 7/8 casos), del cromosoma 15 (15q25-q26 ; 6/8), del 16 (16p a 6/8 ; 16q a 5/8), del 20 (20q ; 6/8) i del 19 (19q ; 5/8), i pèrdues als cromosomes 18 (18q21 ; 6/8), 6 (6q21 i 6q24-qter ; 5/8 cada un), 9 (9p23-pter ; 5/8), 13 (13q21 ; 4/8), i 10 (10p14-pter ; 3/8). Cal destacar que les dues metàstasis conservaven les anomalies del tumor pancreàtic original, però, a més, presentaven guany recurrent de 11q12-q13 i de 22q.

Aquest era el primer estudi de CGH que es feia amb mostres de càncer de pàncreas implantades en ratolins. La implantació de cèl·lules humanes tumorals en ratolins atímics ha resultat útil en els estudis de pèrdua al·lèlica en els tumors pancreàtics (Caldas i col., 1994b; Hahn i col., 1995; Reyes i col., 1996) i en els estudis de CGH en altres tipus de tumors (Forus i col., 1995a; Fours i col., 1995b; Williams i col., 1997; El-Rifai i col., 1998). Així, en el nostre estudi es van observar més anomalies i en freqüències més elevades que en els estudis previs de CGH aplicada al càncer pancreàtic.

Alguns dels canvis observats en el nombre de seqüències de DNA es van estudiar més a fons mitjançant mètodes moleculars específics (guanys de 8q i 15q, i pèrdues de 10p). Es va intentar delimitar la regió perduda mitjançant anàlisis de LOH, amb sis marcadors polimòrfics. Tots els casos amb pèrdua per CGH van mostrar pèrdues al·lèliques per LOH per tots els loci informatius. Així doncs, es va observar una coincidència completa entre la LOH i la CGH, però no es va poder acotar la regió observada per CGH.

Per altra banda, es va voler aprofundir en els guanys observats a 8q24 i 15q25-q26. Ambdós es presentaven en una freqüència més elevada del que s'havia descrit fins el moment, i cap de les dues regions havia sigut analitzada amb mètodes moleculars per determinar la presència de possibles oncogens importants en la carcinogènesi pancreàtica. Així doncs, es va procedir a estudiar alguns dels oncogens localitzats en aquestes regions, per tal d'avaluar la seva possible implicació en el càncer de pàncreas (*MYC* a 8q24, i *FES* i *IGF1R* a 15q25-qter). El gen *MYC* codifica per un factor de transcripció, el gen *FES* codifica per una proteïna amb activitat tirosin quinasa i el gen *IGF1R* pel receptor d'un factor de creixement tipus 1 semblant a la insulina. Tots tres gens s'havien trobat amplificats en altres tipus de tumors (pulmó, mama, leucèmies i limfomes; Berns i col., 1992; Nishio i col., 1992; Visscher i col., 1997). Es van estudiar els dos primers gens per FISH, mentre que *IGF1R* va ser avaluat per Southern blot (l'insert del vector era massa petit per fer estudis d'hibridació *in situ*). Dos dels set tumors analitzats van mostrar un alt nivell d'amplificació del gen *MYC* respecte el centròmer (>3-vegades), uns altres dos tenien un nivell d'amplificació més baix (d'1.5 a 3-vegades) i els altres tres no presentaven amplificació, si bé un d'ells tenia 5.5 còpies del *MYC* per cèl·lula. Pel que fa al gen *FES*, tres tumors dels set estudiats mostraven baix nivell d'amplificació per FISH. El gen *IGF1R*, estudiat per Southern, va mostrar també un baix nivell d'amplificació en cinc dels vuit tumors que es van estudiar. En general, doncs, es va observar un baix nivell d'amplificació per tots tres gens. Això podria tenir dues possibles explicacions: que només unes poques còpies extra d'aquests gens podrien tenir efectes en la tumorigènesi pancreàtica o que hi ha altres gens localitzats en aquestes regions (8q24 i 15q25-q26) que serien els que realment estarien amplificats i els que jugarien un paper important en la carcinogènesi pancreàtica.

Per altra banda, el fet de que les dues metàstasis conservessin les anomalies del tumor pancreàtic original, confirmava la idoneïtat del model animal triat. Les anomalies comuns a les dues metàstasis ens podien donar una idea d'aquelles anomalies que podien ser importants en el procés metastàtic, però calia avaluar un major nombre de mostres per poder-ne treure conclusions.

4.6. ESTUDI DE METÀSTASIS PANCREÀTIQUES (article V, Armengol i col., enviat)

Es van analitzar mitjançant CGH set metàstasis originades en ratolins a partir de tres tumors pancreàtics implantats ortotòpicament.

Es va observar que exactament les mateixes alteracions cromosòmiques presents als implants ortotòpics es trobaven també a les respectives metàstasis. Les metàstasis presentaven, a més, noves alteracions que podrien ser característiques del procés metastàtic. Per exemple, a les metàstasis es van observar augments recurrents del nombre de còpies a 16cen-q22 i a 17q21-qter. Aquestes regions cromosòmiques podrien contenir gens relacionats amb la disseminació metastàtica del càncer pancreàtic. Caldria, però, estudiar un major nombre de casos per poder establir pròpiament les regions i els gens implicats.

Totes les metàstasis tenien més alteracions genètiques que el tumor originari corresponent. A més, en tots els casos, les metàstasis presentaven alguns guanys i pèrdues en les mateixes regions cromosòmiques que els tumors implantats però amb els perfils més desviats de l'equilibri (valor central). Aquestes diferències qualitatives podien ser degudes a diferències en el grau de l'alteració genètica (major nombre de còpies guanyades o perdudes) o a una major proporció de cèl·lules amb aquella alteració.

Es considera que el nombre de canvis genètics compartits és una estima del grau de relació clonal (Kuukasjärvi i col., 1997). En el present estudi es va observar que hi havia una forta relació clonal entre els tumors originaris i les metàstasis. A més, les metàstasis estaven relacionades clonalment entre elles suggerint que provenien de clons lleugerament diferents (però relacionats) originats a l'implant ortotòpic. Així doncs, la majoria de les alteracions addicionals observades a les metàstasis ja estaven presents en els subclons de l'implant però no eren dominants en el medi ambient de l'implant i, per tant, no van ser detectades per CGH.

El fet de que la CGH permet comparar detalladament els canvis genètics en carcinomes i les seves corresponents metàstasis, ha permès aquest estudi de la progressió metastàtica del càncer pancreàtic

in vivo. Els nostres resultats poden ajudar a entendre millor la base genètica d'aquesta progressió metastàtica.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

5.1. En el present estudi s'ha demostrat la validesa de la CGH com a mètode per identificar anomalies cromosòmiques desequilibrades, tals com delecions, duplicacions o amplificacions. A partir dels resultats obtinguts per CGH en un tipus tumoral determinat, es poden realitzar estudis més detallats d'aquelles regions o gens que poden estar implicats en la carcinogènesi, mitjançant mètodes moleculars més específics com el FISH, l'anàlisi de LOH i el Southern blot.

TUMORS DE LA FAMÍLIA EWING

- 5.2. Mitjançant CGH es van observar en 37 mostres de 34 pacients amb ET les següents anomalies: guany de 1q21-q22, guany de 6p21.1-pter, guany de 7q, guany del cromosoma 8, guany del cromosoma 12 i pèrdua de 16q. Els guanys de DNA van ser molt més freqüents que les pèrdues. Aquestes regions podrien contenir gens importants en el desenvolupament i/o progressió dels ET. En una mostra es va observar per Southern blot una amplificació de dos gens, *FLG* i *SPRR3*, localitzats a 1q21.
- 5.3. Els augments en el nombre de còpies de 1q21-q22, de 6p i dels cromosomes 8 i 12 estaven associats en les nostres mostres a una tendència a un pitjor pronòstic (diferències no significatives, excepte per 6p).
- 5.4. S'ha desenvolupat una nova estratègia, la CGH amb mescles de DNAs de diferents mostres del mateix tipus tumoral. Aquesta tècnica permet detectar en un únic experiment les alteracions presents en la majoria de les mostres. S'ha demostrat l'eficiència d'aquest mètode amb nombroses mostres (14-28) de sis tipus tumorals diferents, que prèviament s'havien estudiat individualment. Així, doncs, la CGH amb mescla de DNAs és útil per un cribatge ràpid dels canvis recorrents en el nombre de còpies d'un tipus tumoral.

ADENOCARCINOMA DE PÀNCREAS

- 5.5. La implantació de cèl·lules humanes tumorals en ratolins atímics ha resultat molt útil en l'estudi d'alteracions genètiques, ja que en l'home el tumor primari conté una barreja de cèl·lules estromals i inflamatòries no neoplàsiques, que dificulten l'anàlisi genètica del tumor.
- 5.6. L'estudi per CGH de 8 casos d'adenocarcinoma de pàncreas que havien estat implantats en ratolins atímics va mostrar guanys del cromosoma 8 (mínima regió comú 8q24), del cromosoma 15 (15q25-q26), del 16, del 20 (20q) i del 19 (19q), i pèrdues als cromosomes 18 (18q21), 6 (6q21 i 6q24-qter), 9 (9p23-pter), 13 (13q21), i 10 (10p14-pter). Aquests resultats coincideixen en línies generals amb estudis previs de CGH en càncer de pàncreas (Solinas-Toldo i col., 1996; Fukushige i col., 1997; Mahlamäki i col., 1997). Malgrat tot, hi havia regions cromosòmiques que presentaven una major freqüència (guanys de 8q i 15q).
- 5.7. Els estudis de pèrdues al·lèliques a 10p14-pter (orientats pels resultats de la CGH) no van permetre una delimitació més exacta de la regió afectada, ja que tots els casos amb pèrdua per CGH van mostrar pèrdues al·lèliques per tots els loci informatius. S'ha observat una coincidència completa entre la LOH i la CGH.
- 5.8. L'estudi dels oncogens *MYC* a 8q24 i *FES* i *IGF1R* a 15q25-qter per FISH i per Southern blot (orientat pels resultats de la CGH) va mostrar, en general, un baix nivell d'amplificació. El gen *MYC* estava altament amplificat en dos dels set tumors estudiats, però presentava baix nivell d'amplificació en dos tumors i els altres tres no tenien el gen amplificat. El gen *FES* estava poc amplificat en tres tumors i el gen *IGF1R* presentava baix nivell d'amplificació en cinc dels set tumors estudiats. Podria ser que només unes poques còpies extra d'aquests gens fossin suficients per tenir efectes en la tumorigènesi

pancreàtica o bé que fossin altres gens localitzats en aquestes regions els que realment estarien amplificats i els que jugarien un paper important en la carcinogènesi pancreàtica.

5.9. Un estudi detallat mitjançant CGH dels canvis genètics en set metàstasis originades en ratolins a partir de tres tumors pancreàtics implantats va mostrar una forta relació clonal entre ells. Totes les metàstasis tenien les mateixes alteracions que els implants i, a més, noves alteracions (p.e. 16cen-q22 i 17q21-qter), que podrien contenir gens relacionats amb la progressió metastàtica del carcinoma de pàncreas. La majoria d'aquestes alteracions addicionals ja estaven presents en els subclons de l'implant, però no en suficient proporció com per ser detectades per CGH.

6. REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Perucho M (1988) Most human carcinomas of the human exocrine pancreas contain mutant *c-K-ras* genes. *Cell* 53:549-554.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M (1991) Mic-2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer* 67:1886-1893.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan X-Y, Sauter G, Kallioniemi O-P, Trent JM, Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968.

Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Böhling T, Asko-Seljavaara S, Blomqvist C, Elomaa I, Karaharju E, Kivioja AH, Siimes MA, Tukiainen E, Caballin MR, Myklebost O, Knuutila S (1997) Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumors by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 75:1403-1409.

Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capellà G, Miró R, Caballín MR (1999) DNA copy number changes and evaluation of *MYC*, *IGF1R*, and *FES* amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* En premsa.

Armengol G, Capellà G, Farré L, Peinado MA, Miró R, Caballín MR. Clonal evolution and divergence in the metastatic progression of human pancreatic cancer studied by comparative genomic hybridization. *Enviat*.

Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Andréén-Sandberg A, Mitelman F, Heim S (1993) Karyotypic abnormalities in tumours of the pancreas. *Br J Cancer* 67:1106-1112.

Barton CM, Staddon SL, Hughes CM, Hall PA, O'Sullivan C, Kloppel G, Theis B, Russell RC, Neoptolemos JP, Williamson RCN, Lane DP, Lemoine NR (1991) Abnormalities of the *p53* tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 64:1076-1082.

Berns EMJJ, Klijn JGM, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA (1992) Sporadic amplification of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in human breast tumors. *Cancer Res* 52:1036-1039.

Bishop JM (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-311.

Boyle P, Hsieh CC, Maisonneuve A (1989) The epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 5:327-392.

Brand RE, Tempero MA (1998) Pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 10:362-366.

Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE (1994a) Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 54:3568-3573.

Caldas C, Hahn SA, daCosta LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994b) Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the *p16 (MTS1)* gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genetics* 8:27-32.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49:219-226.

Chen X-N, Knauf JA, Gonsky R, Wang M, Lai EH, Chisoe S, Fagin JA, Korenberg JR (1998) From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides genes discovery after comparative genome hybridization. *Am J Hum Genet* 63:625-637.

Covazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ (1987) Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 127:507-518.

Crist WM, Kun LE (1991) Common solid tumors of childhood. *New Eng J Med* 324(7):461-471.

Curtis LJ, Li Y, Gerbault-Seureau M, Kuick R, Dutrillaux AM, Goubin G, Fawcett J, Cram S, Dutrillaux B, Hanash S, Muleris M (1998) Amplification of DNA sequences from chromosome 19q13.1 in human pancreatic cell lines. *Genomics* 53:42-55.

Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, deJong P, Rouleau G, Aurias A, Thomas G (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359:162-165.

Dib C, Faur, S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 380:152-154.

DiGiuseppe JA, Hruban RH, Offerhaus GJA, Clement MJ, van den Berg FM, Cameron JL, van Mansfeld ADM (1994) Detection of *K-ras* mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic cancer. *Am J Pathol* 144:889-895.

du Manoir S, Speicher M, Joos S, Schröck E, Popp s, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicaud M, Lichter P, Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90:590-610.

du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher M, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T (1995) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:27-41.

El-Rifai W, Harper JC, Cummings OW, Hyytinen ER, Frierson HF, Knuutila S, Powell SM (1998) Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastroesophageal junction adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:34-37.

Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal biochem* 210:235-244.

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P (1997) Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13(10):405-409.

Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM, Meltzer PS, Fodstad O, Myklebost O (1993) Mapping of amplification units in the q13-q14 region of chromosome 12 in human sarcoma: some amplicons do not include MDM2. *Cell Growth Differ* 4:1065-1070.

Forus A, Olde Weghuis D, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995a) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21-q22 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:8-14.

Forus A, Olde Weghuis D, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG (1995b) Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 14:15-21.

Forus A, Weterman MAJ, van Kessel AG, Berner J-M, Fodstad O, Myklebost O (1996) Characterization of 1q21-q22 amplifications in human sarcomas by CGH and molecular analysis. *Cytogenet Cell Genet* 72:148.

Fukushige S, Waldman FM, Kimura M, Abe T, Furukawa T, Sunamura M, Kobari M, Horii A (1997) Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 19:161-169.

Gorunova L, Höglund M, Andrén-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B (1998) Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosom Cancer* 23:81-99.

Griffin CA, Hruban RH, Morsberger LA, Ellingham T, Long PP, Jaffee EM, Hauda KM, Bohlander SK, Yeo CJ (1995) Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 55:2394-2399.

Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1995) Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 55:4670-4675.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, daCosta LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996) *DPC4*, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-353.

Hall PA, Lemoine NR (1993) Models of pancreatic cancer, A: *Cancer Surveys*. Volume 6: The molecular pathology of Cancer. Imperial Cancer Research Fund., pp. 135-155.

Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, van Weering DHJ, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993) K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143:545-554.

Jeon I-S, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel M, Denny CT, Shapiro DN (1995) A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the *EWS* gene to the ETS gene *ETV1*. *Oncogene* 10:1229-1234.

Johansson B, Bardi G, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Bak-Jensen E, Andrén-Sandberg A, Mitelman F (1992) Nonrandom chromosomal rearrangements in pancreatic carcinomas. *Cancer* 69:1674-1681.

Johansson B, Bardi G, Pandis N, Gorunova L, Bäckman PL, Mandahl N, Dawiskiba S, André-Sandberg A, Heim S, Mitelman F (1994) Karyotypic pattern of pancreatic adenocarcinomas correlates with survival and tumour grade. *Int J Cancer* 58:8-13.

Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.

Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom Cancer* 10:231-243.

Kamb A (1995) Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 11:136-140.

Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, Sasaki Y, Ishida S, Higashino F, Fujinaga K (1996) Fusion of an ETS-family gene, *E1AF*, to *EWS* by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosom Cancer* 15:115-121.

Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823.

Knuutila S, Armengol G, Björkqvist A-M, El-Rifai W, Larramendy M, Monni O, Szymanska J (1998) Comparative genomic hybridization study on pooled DNAs from tumors of one clinical-pathological entity. *Cancer Genet Cytogenet* 100:25-30.

Kuukasjärvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Isola J (1997) Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57: 1597-1604.

Ladanyi M, Lewis R, Jhanwar SC, Gerald W, Huvos AG, Healey JH (1995) *MDM2* and *CDK4* gene amplification in Ewing's sarcoma. *J Pathol* 175:211-217.

Lemoine NR, Jain S, Hughes GM, Staddon SL, Maillet B, Hall PA, Kloppel G (1992) *Ki-ras* oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 102:230-236.

Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC (1991) Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *Gene Anal Tech Appl* 8:24-35.

Mahlamäki EH, Höglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba s, Andrén-Sandberg A, Kallioniemi O-P, Johansson B (1997) Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosom Cancer* 20:383-391.

McKeon C, Thiele CJ, Ross RA, Kwan M, Triche TJ, Miser JS, Israel MA (1988) Indistinguishable patterns of proto-oncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res* 48:4307-4311.

McKie AB, Iwamura T, Leung HY, Hollingsworth MA, Lemoine NR (1997) Alu-Polymerase Chain Reaction genomic fingerprinting technique identifies multiple genetic loci associated with pancreatic tumourigenesis. *Genes Chromosom Cancer* 18:30-41.

Mitelman, F (1994) Catalog of chromosome aberrations in cancer, cinquena edició. New York: Wiley-Liss.

Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genetics* 15:417-474.

Muller R (1995) Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends Genet* 11:173-178.

Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tauke HJ, Ploen JS, van der Ploeg M (1990) Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 11:126-131.

Niederhuber JE, Brennan MF, Menck HR (1995) The National Cancer Database report on pancreatic cancer. *Cancer* 76:1671-1677.

Nishio H, Nakamura S, Horai T, Ikegami H, Matsuda M (1992) Clinical and histopathologic evaluation of the expression of *Ha-ras* and *fes* oncogene products in lung cancer. *Cancer* 69:1130-1136.

Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone B, Solcia E, Ranzani GN (1994) *K-ras* and *p53* gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54:1556-1560.

Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O (1997) A new member of the ETS family fused to *EWS* in Ewing tumors. *Oncogene* 14:1159-1164.

Pinkel D (1994) Visualizing tumour amplification. *Nat Genet* 8:107-108.

Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa LT, Yeo CJ, Kern SE (1994) *p53* mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54:3025-3033.

Reyes G, Villanueva A, García C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capellà G (1996) Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 56(24):5713-5719.

Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1388-1392.

Ruggeri B, Zhang S-Y, Caamano J, DiRado M, Flynn SD, Klein-Szanto AJP (1992) Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the *p53* and *Rb-1* tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7:1503-1511.

Seymour AB, Hruban RH, Redston MS, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE (1994) Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 54:2761-2764.

Solinas-Toldo S, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Bentz M, Gress T, Lichter P (1996) Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 56:3803-3807.

Suijkerbuijk RF, Olde Weghuis D, Van den Berg M, Pedoutour F, Forus A, Myklebost O, Glier C, Turc-Carel C, van Kessel AG (1994) Comparative genomic hybridization as a tool to define two distinct chromosome 12-derived amplification units in well-differentiated liposarcomas. *Genes Chromosom Cancer* 9:292-295.

Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo W-L, Waldman FM, Isola JJ, Gray JW, Kallioniemi O-P (1994) Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. *Cancer Res* 54:4257-4260.

Tarkkanen M, Kaipainen A, Karaharju E, Böhling T, Szymanska J, Heliö H, Kivioja A, Elomaa I, Knuutila S (1993) Cytogenetic study of 249 consecutive patients examined for a bone tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 68:1-21.

Tarkkanen M, Kiuru-Kuhlefelt S, Blomqvist C, Armengol G, Böhling T, Ekfors T, Virolainen M, Lindholm P, Monge O, Picci P, Knuutila S, Elomaa I (1999) Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* (en premsa).

Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, Thiery JP, Olschwang S, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM, Mazabraud A (1988) Chromosomes in Ewing's sarcoma I. An evaluation of 85 cases and remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 32:229-238.

Visscher DW, Wallis T, Awussah S, Mohamed A, Crissman JD (1997) Evaluation of *MYC* and chromosome 8 copy number in breast carcinoma by interphase cytogenetics. *Genes Chromosom Cancer* 18:1-7.

Vogelstein B, Kinzler K (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141.

Williams BJ, Jones E, Kozlowski JM, Vessella R, Brothman AR (1997) Comparative genomic hybridization and molecular cytogenetic characterization of two prostate cancer xenografts. *Genes Chromosom Cancer* 18:299-304.

Williamson RN (1988) Pancreatic cancer: the greatest oncological challenge. *Br Med J* 296:445-446.

Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake K, Kitagawa T, Ohashi K, Hori M, Takagi K, Sugano H (1991) c-Ki-ras point mutations in ductectatic-type mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Jpn J Cancer Res* 82:1057-1060.

Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker J-M, Triche TJ, Sheer D, Turc-Carel C, Ambros PF, Combaret V, Lenoir GM, Aurias A, Thomas G, Delattre O (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in Ewing family of tumors. *Embo J* 12:4481-4487.