

---

# La inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal

---

Memòria presentada per  
**Jordi Camps Polo**

per optar al grau de  
**Doctor en Biologia**

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosa Miró Ametller a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dra. Rosa Miró Ametller

Jordi Camps Polo

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), setembre de 2005

Als meus pares  
i a la meva germana,

A la Montse,

<<I got a picture of you in my locket  
I keep it close to my heart  
A light shining in my breast  
Leading me through the dark  
Seven days, seven candles  
In my window light your way  
Your favorite record's on the turntable  
I drop the needle and pray...>>

(Bruce Springsteen, *Mary's Place*)

Aquest treball ha estat finançat pels projectes d'investigació següents:

- SAF 2000-081-C02-02
- SAF2003/5821
- FIS G03/174
- CIRIT 2001 SGR-00201

En Jordi Camps Polo ha gaudit d'una beca del programa de Formació d'Investigadors de la Universitat Autònoma de Barcelona entre els anys 2000-2004, a més a més de dos ajuts per a realitzar estades a l'estranger procedents d'aquest mateix programa. També ha estat beneficiari d'una beca associada al projecte d'investigació titulat EPICUR-Red: Una red multidisciplinària para el estudio de la etiología clínica y genética molecular del cáncer de vejiga urinaria (ref. FIS G03/174) durant els anys 2004-2005.

---

## ***SUMARI***

---

*SUMARI*

*ABREVIATURES*

*LLISTA DE PUBLICACIONS ORIGINALS*

*PRÒLEG*

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>- 1 -</b>
1.1. ASPECTES FONAMENTALS DEL CÀNCER	- 3 -
1.1.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA CÈL·LULA TUMORAL	- 3 -
1.1.2. ELS GENS DEL CÀNCER	- 5 -
1.1.3. ORIGEN I EVOLUCIÓ CLONAL DEL CÀNCER	- 6 -
1.2. EL GENOMA INESTABLE DE LA CÈL·LULA TUMORAL	- 8 -
1.2.1. INESTABILITAT DE MICROSATÈL·LITS	- 9 -
1.2.2. INESTABILITAT CROMOSÒMICA	- 11 -
1.2.2.1. SÍNDROMES D'INESTABILITAT CROMOSÒMICA	- 12 -
1.2.2.2. INESTABILITAT CROMOSÒMICA NUMÈRICA: DE L'ANEUPLOÏDIA A LA POLIPLOÏDIA	- 14 -

1.2.2.3. INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL	- 20 -
1.2.2.4. DISFUNCIONS TELOMÈRIQUES: ORIGEN DE LA INESTABILITAT ESTRUCTURAL	- 24 -
1.3. MANTENIMENT DE L'ESTABILITAT DEL GENOMA: INTERRELACIÓ ENTRE LA REPARACIÓ I ELS CHECKPOINTS DEL DANY GENÒMIC	- 27 -
1.3.1. MECANISMES DE REPARACIÓ DEL DNA	- 27 -
1.3.2. CHECKPOINTS DEL DANY GENÒMIC	- 29 -
1.4. MODEL DEL CÀNCER DE CÒLON	- 31 -
1.4.1. ANATOMIA I HISTOLOGIA DEL CÒLON	- 31 -
1.4.2. CLASSIFICACIÓ I ESTADIATGE DEL CÀNCER DE CÒLON I RECTE	- 32 -
1.4.3. PREDISPOSICIÓ I SUSCEPTIBILITAT AL CÀNCER COLORECTAL I MALALTIES ASSOCIADES	- 33 -
1.4.4. GENS IMPLICATS EN LA CARCINOGENESI COLORECTAL	- 36 -
1.4.5. MODEL D'EVOLUCIÓ D'ADENOMA A CARCINOMA	- 41 -
1.4.6. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ASSOCIADES AL CÀNCER COLORECTAL	- 43 -
1.4.7. DOS CÒLONS, DOS CÀNCERS: EL PARADIGMA DE LA INESTABILITAT GENÒMICA	- 45 -
<b>2. PREMISSA i OBJECTIUS</b>	- 49 -
<b>3. MATERIALS i MÈTODES</b>	- 53 -
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC	- 55 -
3.1.1. LÍNIES CEL·LULARS DE CÀNCER DE CÒLON	- 55 -
3.1.2. TUMORS PRIMARIS DE CÒLON I RECTE	- 55 -
3.2. METODOLOGIA EMPRADA EN EL PROCÉS EXPERIMENTAL	- 56 -
3.2.1. CULTIU DE CÈL·LULES EPITELIALS	- 56 -

3.2.1.1. <i>DESCONGELACIÓ I CONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS</i>	- 58 -
3.2.1.2. <i>CULTIU CEL·LULAR I TRIPSINITZACIÓ</i>	- 59 -
3.2.1.3. <i>EXTRACCIÓ I FIXACIÓ: OBTENCIÓ DE CROMOSOMES METAFÀSICS</i>	- 59 -
3.2.1.4. <i>OBTENCIÓ DE CLONS A PARTIR D'UNA SOLA CÈL·LULA</i>	- 60 -
3.2.1.5. <i>OBTENCIÓ DE CÈL·LULES BINUCLEADES</i>	- 61 -
3.2.2. <i>TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA CLÀSSICA: BANDES G</i>	- 62 -
3.2.3. <i>EXTRACCIÓ DE DNA</i>	- 63 -
3.2.4. <i>QUANTIFICACIÓ DEL DNA</i>	- 65 -
3.2.5. <i>TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA MOLECULAR: HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT</i>	- 66 -
3.2.6. <i>ASSAIG DE CÈL·LULES BINUCLEADES</i>	- 75 -
3.2.7. <i>TÈCNiques D'ANÀLISI DEL GENOMA</i>	- 77 -
3.2.7.1. <i>HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA SOBRE METAFASE</i>	- 77 -
3.2.7.2. <i>HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA SOBRE MICROXIPS</i>	- 84 -
3.2.8. <i>NOMENCLATURA CITOGÈNÈTICA</i>	- 89 -
<b>4. RESULTATS</b>	- 91 -
4.1. <i>Treball I</i>	- 97 -
4.2. <i>Treball II</i>	- 103 -
4.3. <i>Treball III</i>	- 111 -
4.4. <i>Treball IV</i>	- 139 -
<b>5. DISCUSSIÓ</b>	- 177 -
5.1. <i>DISSENY EXPERIMENTAL, TECNOLOGIA EMPRADA I PROCEDIMENTS</i>	- 179 -

5.1.1. MATERIAL DE TREBALL: LÍNIES CEL·LULARS I TUMORS PRIMARIS	- 179 -
5.1.2. CITOGENÈTICA MOLECULAR	- 180 -
5.1.3. Càlcul de les taxes d'Inestabilitat Cromosòmica	- 181 -
5.1.4. Assaig de cèl·lules binucleades	- 182 -
5.1.5. Hibridació genòmica comparada sobre microxips	- 183 -
5.2. EL MODEL DE CÒLON: UN CÒLON, MOLTS CÀNCERS	- 185 -
5.2.1. Relació entre els tumors CIN i els tumors MSI	- 185 -
5.2.2. Evolució cromosòmica des del carcinoma a la metàstasi	- 188 -
5.3. LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA: RELACIÓ ENTRE LES ALTERACIONS NUMÈRIQUES I ESTRUCTURALS	- 189 -
5.3.1. INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL	- 189 -
5.3.2. LES ESTRUCTURES ANÒMALES DEL NUCLI COM A INDICI DE LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL	- 191 -
5.3.3. INESTABILITAT CROMOSÒMICA NUMÈRICA	- 194 -
5.3.4. RELACIÓ ENTRE L'ANEUPLOÏDIA I LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL	- 195 -
5.4. EL TERME ANEUPLOÏDIA EN EL CONTEXT ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓ DEL CÀNCER	- 198 -
<b>6. CONCLUSIONS i PRESPECTIVES</b>	- 199 -
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	- 207 -
<b>Agraïments</b>	- 233 -



---

## ***ABREVIATURES***

---

ATP	Adenosin trifosfat
BER	Reparació per excisió de bases
BFB	Trencament-fusió-pont
CBMN	Assaig de micronuclis per bloqueig de la citocinesi
CCD	Càmera refrigerada acoblada
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
cenM-FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent multicolor centromèrica
CGH	Hibridació genòmica comparada
CIN	Inestabilitat cromosòmica
CO <sub>2</sub>	Diòxid de carboni
CRC	Càncer colorectal
Cy3, Cy5	Cianina 3, cianina 5
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindol
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat
DMEM	Medi Eagle modificat per Duplecco
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DOP-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa amb oligo- encebadors degenerats
DSB	Trencaments de doble cadena
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
FAP	Poliposi adenomatosa familiar
FBS	Sèrum fetal boví
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FITC	Fluoresceïna
G	Gravetat
g, mg, µg, ng	Gram, mil·ligram, microgram, nanogram
h	Hores

H <sub>2</sub> O	Aigua
HNPCC	Càncer colorectal hereditari no polipós
HSR	Regió de tinció uniforme
HSR	Regions de tinció homogènia
ISCN	<i>International Standing Committee on Human Cytogenetics Nomenclature</i>
KDa	Quilodaltons
l, ml, µl	Litre, mil·lilitre, microlitre
Log <sub>2</sub>	Logarítme en base 2
LOH	Pèrdua d'heterozigositat
M, mM	Molar, mil·limolar
MAP	Poliposis associada al gen <i>MYH</i>
maxr	Taxa màxima d'instabilitat
Mb, kb	Megabase, quilobase
M-FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent multicolor
MgCl <sub>2</sub>	Clorur de magnesi
MgSO <sub>4</sub>	Sulfat de magnesi
MIN	Inestabilitat de microsatèl·lits
min	Minuts
minr	Taxa d'instabilitat mínima
mm	Mil·límetres
mMCB	Bandejat multicolor múltiple
MMR	Reparació d'errors en l'aparellament de bases del DNA
MN	Micronucli
MSI-H	Inestabilitat de microsatèl·lits elevada
MSI-L	Inestabilitat de microsatèl·lits baixa
MT	Tipus monosòmic segons el model de Dutrillaux
NaCl	Clorur de sodi
NB	Protuberàncies nuclears
nd	No determinat
NER	Reparació per excisió de nucleòtids
NHEJ	Unió d'extrems no homòlegs
NPB	Pont nucleoplasmàtic
NT	Tipus normal segons el model de Dutrillaux
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
RNA	Àcid ribonucleic
r.p.m.	Revolucions per minut
Rx-FISH	FISH de bandejat de color per creuament d'espècies
SDS	Dodecai sulfat sòdic
SKY	Cariotipatge espectral
SNP	Polimorfismes de nucleòtids únics
SSC	Citrat sòdic salí
TBE	Tris-Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
Tis	Tumor <i>in situ</i>
tRNA	Àcid ribonucleic de transferència
TT	Tipus trisòmic segons el model de Dutrillaux

---

## ***LLISTA DE PUBLICACIONS ORIGINALS***

---

Aquesta tesi es basa amb els articles exposats a continuació:

- I. Camps J, Mrasek K, Prat E, Weise A, Starke H, Egozcue J, Miró R, Liehr T. Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol Rep.* 2004 Jun;**11**(6):1215-8.
  
- II. Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capellà G, Egozcue J, Peinado MA, Miró R. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer.* 2004 Jul;**110**(6):869-74.
  
- III. Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egozcue J, Peinado MA, Miró R. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J.* 2005 May;**19**(7):828-30.
  
- IV. Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano J, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miró R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. (En revisió, *Carcinogenesis*, ref. Carcin-2005-00340)

---

## ***PRÒLEG***

---

Fa més de cent anys, David von Hansemann va descriure alteracions mitòtiques en cèl·lules tumorals. Més tard, a començaments del segle passat, i estudiant cèl·lules embrionàries d'eriçó de mar, Theodor Boveri va proposar que el càncer era un desordre genètic causat per anomalies en la segregació dels cromosomes. Recentment, aquests resultats tornen a tenir interès pel fet que s'estan desvelant els mecanismes moleculars responsables de la inestabilitat genòmica.

Les alteracions cromosòmiques en cèl·lules tumorals s'han dividit clàssicament en dos tipus: primàries, trobades com a única anomalia i algunes específiques per a determinats tipus de càncer i secundàries, no específiques i sovint trobades juntament amb altres anomalies cromosòmiques. Aquesta subdivisió ha resultat ser vàlida en neoplàsies hematològiques i tumors mesenquimàtics, però en tumors sòlids és difícil de distingir entre primàries i secundàries, i fins i tot s'ha suggerit que en carcinomes amb cariotips complexes la majoria d'alteracions serien secundàries.

Sempre ha estat difícil analitzar les alteracions cromosòmiques dels tumors sòlids epitelials. Els citogenetistes d'escola que veníem d'analitzar l'evolució cromosòmica en primats, ens vàrem acostumar ràpidament a aquella multitud de reorganitzacions presents en carcinomes, sempre buscant l'alteració primària específica que, segons Felix Mitelman existeix, i potser sí. Davant la multitud d'alteracions cromosòmiques, dues coses teníem clares: la majoria dels casos presentaven una heterogeneïtat intratumoral extraordinària, no hi havia un cariotip repetit, cada metafase era diferent. L'altra cosa i, mea culpa, era que s'havien de descartar les alteracions no clonals. Una

sèrie de problemes complicaven l'estudi. Un era la gran quantitat d'alteracions i l'altre la morfologia dels cromosomes que, per ser dolenta, dificultava l'obtenció de bandes G. Aquesta última dificultat ha estat proposada com un problema tècnic. Ho és en realitat? O potser té a veure amb una condensació "especial" de la cromatina?

La citogenètica va passar per anys crítics, potser alguns científics creien que després de les importants aportacions en el descobriment de les translocacions equilibrades en leucèmies, limfomes i tumors mesenquimàtics, la citogenètica havia completat el seu paper, i l'estudi dels carcinomes havia de seguir un altre camí on la citogenètica ja no calia. Els citogenetistes seguíem defensant la importància de les alteracions cromosòmiques perquè les vèiem. Salvant les distàncies, podríem citar a Galileo "e puoi si muove". M'atreveixo a assegurar que en aquells moments la visió de la totalitat del genoma tumoral estava únicament a les nostres mans. Davant de la simplicitat del model lineal de Vogelstein per al càncer de còlon, pensàvem que la citogenètica ens indicava que allò era molt més complex. A més, els diversos models d'evolució cromosòmica proposats pel grup de Dutrillaux en el cancer de còlon se'ns presentaven reproduïts en els càncers de mama, pulmó, bufeta, pàncrees, etc. En tots ells hi havia la foto fixa o la representació d'un estat d'instabilitat cromosòmica, però això no era suficient si considerem que la instabilitat és una taxa.

Va ser l'any 1993 quan la instabilitat genòmica va experimentar un pas de gegant. Manuel Perucho es barallava amb l'editor de la revista Nature per defensar que en un tipus de càncer de còlon hi havia milers de mutacions. La instabilitat de microsatèl·lits introduïa una inflexió en la investigació del càncer. Si un tipus de càncer de còlon es caracteritzava per una elevada instabilitat amb un cariotip pseudodiploide, semblava clar que l'altre tipus, amb un elevat nombre d'alteracions cromosòmiques, era el fenotip d'un altre tipus d'instabilitat. Aquest venia corroborat per la multitud de desequilibris cromosòmics detectats per la tècnica de CGH. Donat que la instabilitat és una taxa, Lengauer la va definir com CIN, referint-se a la velocitat de generació d'alteracions numèriques; va deixar de banda la instabilitat estructural, simplement perquè no la podia mesurar. Després d'una sèrie d'imprecisions en la definició d'aneuploidia, aquesta, més de cent anys després del descobriment de Hanseemann, ha passat a ser suggerida per alguns com l'element iniciador, mentre que per altres segueix sent una conseqüència del càncer. És actualment un tema debatut i controvertit. De nou, les alteracions cromosòmiques tornen a estar d'actualitat i com diu el professor Egozcue, els cromosomes sempre estaran de moda.

La instabilitat cromosòmica és numèrica i estructural, ambdues son fenòmens presents a la mateixa cèl·lula i es poden mesurar tal i com demostra l'estudi realitzat

en línies cel·lulars de càncer colorectal de la present tesi. Resulta que és possible mesurar la taxa d'instabilitat estructural, simplement tenint en compte les alteracions no clonals. Aquelles alteracions que en principi descartàvem, no eren gratuïtes. Res en la naturalesa ho és i, independentment de què no es fixin en el cariotip del tumor, a la cèl·lula tumoral li són útils en el sentit que són la manifestació d'una instabilitat que contribuirà a la heterogeneïtat i en conseqüència, a una major capacitat d'adaptació. L'estudi de cèl·lules binucleades ens permet observar la instabilitat cromosòmica com un flux constant d'aneuploïdies per no disjunció o pèrdua anafàsica. Simultàniament, es generen alteracions estructurals que es manifesten en les diferents formes anòmales dels nuclis. La instabilitat cromosòmica, inherent a determinats càncers, és per tant numèrica i estructural, heretable i probablement inicial, ja que està present en tots els clons obtinguts a partir de la línia parental.

De la mateixa manera que no hi ha una definició absoluta de cèl·lula tumoral, la instabilitat del seu genoma és també difícil de definir i classificar. Veiem com la instabilitat de microsatèl·lits i la cromosòmica, inicialment excloents, poden ser contemporànies en el mateix tumor.

Una tesi és un procés llarg que comença amb la cerca d'un tema, la posta a punt de tècniques i el disseny d'estratègies per comprovar allò que ens hem proposat demostrar. Molt de temps al laboratori i molt de temps per pensar, formular les preguntes adients, discutir i tenir idees. Escriure articles i donar resposta als revisors. Finalment, s'arriba a escriure la memòria que plasma l'actitud del doctorand davant de tot allò que ha estudiat i ha descobert. En aquesta memòria, després de la descripció pausada de la introducció hom arriba a una discussió on canvia el ritme de la paraula i el llenguatge adquireix, jo diria, el ritme de la instabilitat. Penso que en Jordi té la capacitat de plasmar en el paper el vigor i l'entusiasme de la comunicació oral, i esperem que el lector ho capti.

El càncer com a conjunt de malalties és molt complex, i aquesta tesi fa referència a un dels múltiples aspectes que poden estar implicats en l'origen o evolució d'algunes o moltes d'elles.

Rosa Miró Ametller

## **1. INTRODUCCIÓ**

<<Perquè els detalls, com tothom sap, fan la virtut i la felicitat; les generalitats són uns mals intel·lectualment necessaris. No són els filòsofs sinó els fusters de marqueteria i els col·leccionistes de segells els que componen la columna vertebral de la societat.>>

(Aldous Huxley, *Un món feliç*)

## 1.1. ASPECTES FONAMENTALS DEL CÀNCER

El càncer és un conjunt de malalties que impliquen una desregulació del cicle cel·lular, provocant un creixement descontrolat d'origen monoclonal, evitant mecanismes de mort cel·lular programada, i adquirint una capacitat invasora que permet la migració des del tumor primari a teixits distals. El genoma de les cèl·lules tumorals es caracteritza per contenir gran quantitat d'alteracions genètiques, així com guanys i/o pèrdues de DNA. Existeixen tres aspectes fonamentals i imprescindibles alhora de considerar el càncer:

**Temps:** La incidència del càncer augmenta amb l'edat, i en els països desenvolupats aproximadament el 40% de la població desenvoluparà algun tipus de càncer (Jemal *et al.*, 2004). A més a més, una proporció significant d'autòpsies revelen càncers no diagnosticats. O sigui, la carcinogènesi és un procés depenent del temps de vida.

**Ambient:** Les dades epidemiològiques demostren una associació entre el desenvolupament del càncer i els factors ambientals, com per exemple el tabac, la dieta, i les radiacions (Goldman & Shields, 2003; Hecht, 1999; Matsumura & Ananthaswamy, 2004). Per tant, el càncer és, indubtablement, una malaltia lligada a factors ambientals.

**Herència:** El càncer es basa en l'acumulació de mutacions. Algunes d'aquestes mutacions presenten un patró d'herència dominant, i s'hereten a través de la línia germinal, afavorint una predisposició al càncer. D'altres apareixen *de novo* en les cèl·lules somàtiques i només seran heretades per les cèl·lules del llinatge neoplàsic. En la última dècada, s'ha descobert que la informació epigenètica, principalment per patrons de metilació, també està implicada en la regulació gènica de la carcinogènesi (Feinberg & Tycko, 2004).

### 1.1.1. CARACTERÍSTIQUES DE LA CÈL·LULA TUMORAL

La cèl·lula tumoral és una cèl·lula que evoluciona progressivament d'un estat de normalitat a un estat d'elevada malignitat a través de l'adquisició de múltiples capacitats.

a) Autosuficiència: les cèl·lules normals requereixen de factors de creixement per passar d'un estat de quiescència a un estat de proliferació. En la cèl·lula tumoral, molts dels oncògens actuen com a factors mimètics dels senyals de creixement, així la cèl·lula tumoral es nodreix dels seus propis factors de creixement i redueix la seva dependència del teixit normal de l'entorn. Les tres estratègies moleculars que caracteritzen la cèl·lula tumoral són: alteracions dels senyals de creixement



extracel·lulars, dels transductors transcel·lulars de senyal i alteracions en les vies de transducció de senyal intracel·lular.

b) Insensibilitat a senyals d'inhibició del creixement: En el teixit normal, els senyals antiproliferatius mantenen la quiescència i l'homeòstasi de la cèl·lula. Aquests senyals inclouen inhibidors de creixement solubles i també factors que inhibeixen la motilitat cel·lular localitzats en la matriu extracel·lular i en la superfície cel·lular. Aquests bloquegen la proliferació cel·lular mitjançant mecanismes que forcen la cèl·lula a entrar en una fase de quiescència, o bé adquirint característiques específiques de diferenciació. Generalment, les cèl·lules tumorals esquiven aquests senyals antiproliferatius.

c) Evasió apoptòtica: les cèl·lules tumorals tenen la capacitat de superar la mort cel·lular programada, o apoptosi. Un dels mecanismes més importants per conferir resistència a l'apoptosi és mitjançant mutacions en *TP53*, el gen supressor de tumors que actua de sensor per induir l'apoptosi i que s'ha trobat funcionalment inactiu en més d'un 50% dels càncers humans.

d) Potencial de replicació il·limitat: quan la cèl·lula ha replicat el seu genoma un nombre determinat de vegades, entra en un procés que s'anomena senescència. Si alguns dels gens que controlen aquest procés estan inactius, la cèl·lula té la capacitat de dividir-se generació rere generació fins entrar en un estat de crisi (Wright *et al.*, 1989). La immortalització de la cèl·lula tumoral és una de les característiques que afavoreix dràsticament el creixement incontrolat del tumor. L'hiperactivitat de l'enzim telomerasa, característica bastant comuna en moltes cèl·lules tumorals, manté intacta la integritat i llargada dels telòmers i permet l'evasió de l'envelliment cel·lular.

e) Invasió i metàstasi: en un moment determinat del procés tumoral, les cèl·lules del tumor són capaces d'envair el teixit adjacent, viatjar i formar noves colònies en teixits i òrgans distants. Aquest procés implica canvis cel·lulars que afecten a les propietats físiques de la cèl·lula i a la relació de la cèl·lula amb el seu microambient (per exemple, proteïnes d'adhesió cel·lular com la E-cadherina).

f) Angiogènesi: l'oxigen i els nutrients aportats pel sistema vascular són elements claus per la supervivència cel·lular. Per tal que les cèl·lules puguin proliferar i el tumor pugui progressar, és necessari el desenvolupament de sistemes d'irrigació sanguínia, un procés que es coneix amb el nom d'angiogènesi. Entre els senyals d'inici de l'angiogènesi, podem destacar el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF, de l'anglès, *vascular endothelial growth factor*).

L'adquisició d'aquestes propietats implica múltiples canvis en el genoma cel·lular, i concretament l'afectació dels anomenats "gens del càncer".

### 1.1.2. ELS GENS DEL CÀNCER

Un dels objectius centrals de la investigació contra el càncer és la identificació dels gens mutats implicats en l'oncogènesis o identificació dels “gens del càncer” (Futreal *et al.*, 2004). Les principals causes de la disfunció gènica són: (i) substitucions en la seqüència de parells de bases que originen canvis d'aminoàcids, proteïnes truncades o alteracions en llocs de tall-unió altament conservats; (ii) insercions o delecions que també poden provocar alteracions en la proteïna resultant; (iii) translocacions cromosòmiques que donaran lloc a transcrits quimèrics o a desregulacions gèniques degut al posicionament de promotors o intensificadors de la transcripció gènica; i (iv) alteracions en el nombre de còpies d'un gen o regió cromosòmica.

**ONCÒGENS** Els proto-oncògens són responsables del control de la proliferació i la diferenciació cel·lular. Degut a què presenten una naturalesa dominant, un al·lel mutat d'un proto-oncogen és suficient per comportar una proliferació descontrolada. Els oncògens poden actuar incrementant el producte o la seva funció com a conseqüència d'una mutació o degut a una amplificació gènica. Les translocacions cromosòmiques també poden afavorir la formació de proteïnes amb unes qualitats o quantitats que afavoreixin la proliferació cel·lular. Aquest fenomen ha estat àmpliament estudiat en les neoplàsies hematològiques (Mitelman *et al.*, 2004). Existeixen molts tipus de proto-oncògens, els quals els podríem agrupar segons la seva funció cel·lular: (i) factors de creixement; (ii) receptors de factors de creixement, tant transmembrana com intracel·lulars, i proteïnes associades (com per exemple, receptors tirosina quinases, tirosina quinases associades a la membrana, receptors acoblats a proteïnes G, proteïnes G associades a la membrana); (iii) factors de transducció de senyal intracel·lular; (iv) proteïnes nuclears d'unió al DNA; i (v) factors del cicle cel·lular.

**GENS SUPRESSORS DE TUMORS** S'han descrit tres classes de gens supressors de tumors: els guardians del genoma o *gatekeepers*, els cuidadors del genoma o *caretakers*, i els cuidadors de l'entorn o *landscapers* (Kinzler & Vogelstein, 1997; Kinzler & Vogelstein, 1998). Les mutacions en els gens *gatekeepers*, tals com gens d'inhibició de la proliferació cel·lular o gens que promouen l'apoptosi, són essencials per la formació del tumor. La deficiència dels gens *caretakers*, com per exemple els gens de reparació del DNA, afavoreixen l'acumulació de mutacions gèniques, algunes de les quals poden ser transcendents pel desenvolupament tumoral. Les mutacions en els gens *landscapers* poden modificar el microambient i afectar les característiques del tumor. A diferència dels proto-oncògens, les mutacions de gens supressors de tumors

tenen un caràcter recessiu, de manera que han d'afectar els dos al·lells del gen perquè tinguin efecte sobre el desenvolupament del tumor. Seguint el model de Knudson (*Two-hit model*) (Knudson, 1971; Knudson, 1985), després d'una primera mutació, la qual pot ser heretada o somàtica, i generalment és una mutació puntual, és necessari la inactivació de l'altre al·lel mitjançant una mutació puntual secundària, pèrdues heterozigòtiques, recombinació mitòtica, modificacions epigenètiques, o pèrdua del cromosoma sencer, la qual pot anar acompanyada de la duplicació del cromosoma que porta l'al·lel mutat.

### 1.1.3. ORIGEN I EVOLUCIÓ CLONAL DEL CÀNCER

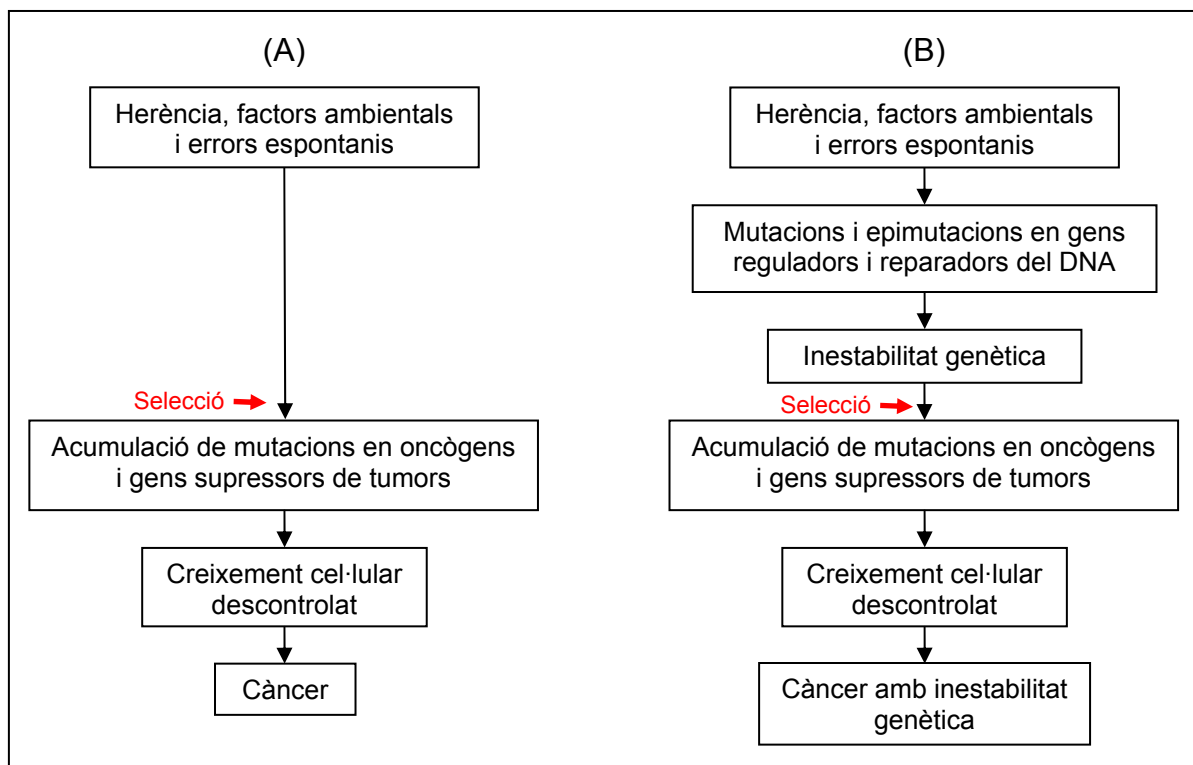
Un tumor s'origina a partir de l'expansió clonal d'una cèl·lula inicial. Això evidencia que les mutacions inicials presents en una cèl·lula premaligna, o mutacions fundadores, les trobarem en la resta de les cèl·lules del tumor. A més a més, cada cèl·lula del tumor es dividirà i adquirirà noves mutacions. Malgrat aquest principi, hi ha varies teories que explicarien l'evolució des de la cèl·lula preneoplàsica a la cèl·lula maligna. La teoria d'una evolució clonal seqüencial s'explica pel paral·lelisme entre l'adquisició de mutacions i les manifestacions fenotípiques de la cèl·lula tumoral, adquirint finalment les característiques de carcinoma. Una altra teoria per explicar la carcinogènesi es basa en l'existència de múltiples llinatges que provenen d'un únic precursor i que de manera independent progressen fins a formar el tumor (Tsao *et al.*, 1999). Aquesta visió de la progressió tumoral explicaria l'heterogeneïtat cel·lular i les subpoblacions tumorals, característica elemental de la gran majoria de tumors sòlids.

Malgrat que totes les cèl·lules d'un mateix tumor deriven d'una única cèl·lula, un tumor està format de subpoblacions cel·lulars que acostumen a presentar variacions en el nombre d'alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals, en les mutacions gèniques, i en l'expressió gènica; la qual cosa dóna lloc a característiques fenotípiques específiques de cada subpoblació, implicant variacions pel que fa a la immortalitat, al metabolisme cel·lular, a la resistència a agents citotòxics, a l'habilitat per metastatitzar, i a l'evasió de la mort cel·lular. Per explicar aquesta paradoxa podem descriure els tumors com a clons, els quals deriven d'una sola cèl·lula genòmicament inestable. Aquesta qualitat intrínseca dels càncers és la que origina heterogeneïtat cel·lular, consistent en subclons amb cariotip, genotip i fenotip específics.

El desenvolupament del càncer es podria tractar des d'una perspectiva Darwiniana (Cahill *et al.*, 1999). O sigui, la carcinogènesi és un procés que implica un conjunt de mutacions en els "gens del càncer" que confereixen una avantatge selectiva en el creixement cel·lular dins el context de l'organisme (Khong & Restifo, 2002). La

formació d'un nou llinatge cel·lular fruit, d'una mutació genètica o d'un canvi epigenètic, originarà una expansió clonal i una subpoblació cel·lular millor adaptada al microambient que l'envolta. Aquest model d'evolució de la tumorigènesi ha estat confirmat en estudis moleculars (Fearon & Vogelstein, 1990; Morales *et al.*, 2002).

Hi ha diverses evidències de què existeix una altra classe de gens que també podrien ser diana mutacional durant aquest procés de selecció clonal. Aquests gens poden ser els gens de reparació del DNA per excisió de bases (BER, de l'anglès *base-excision repair*), els gens de reparació del DNA per excisió de nucleòtids (NER, de l'anglès *nucleotide-excision repair*), els gens de reparació d'errors en l'aparellament de bases del DNA (MMR, de l'anglès *mismatch repair*), els gens de reparació dels trencaments de doble cadena del DNA, o gens implicats en la segregació cromosòmica. Tots ells tenen en comú que la seva funció està implicada en el manteniment de l'estabilitat genòmica. Aquests gens, sorprenentment anomenats "gens mutadors", no se seleccionen perquè confereixin una avantatge en el creixement cel·lular, sinó que mutacions en aquests gens són la base per l'origen de la inestabilitat genòmica, la qual, afavoreix la freqüència mutacional de gens que podran influir en la carcinogènesi (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema del model de la carcinogènesi. (A) Versió clàssica on l'activació o inactivació d'oncògens i gens supressors de tumors, respectivament, condueix a una proliferació cel·lular descontrolada. (B) Versió modificada respecte el model clàssic, on mutacions en gens de reparació del DNA o gens controladors de la segregació cromosòmica originen el fenomen de la inestabilitat genètica, la qual actua com a motor pel desenvolupament del càncer. (Esquema modificat de Breivik, 2005).

Quan les mutacions en els gens que controlen o reparen el DNA, o gens mutadors, són seleccionades positivament, esdevé una cascada de mutacions que resulta en un alt nivell d'instabilitat genòmica en les cèl·lules tumorals. La progressió tumoral depèn de l'equilibri entre els efectes favorables i els efectes deleteris de les mutacions que tenen lloc en la cèl·lula, contextualitzada en el microambient on es desenvolupa el tumor (Cahill et al., 1999). Les cèl·lules que presentin mutacions molt dràstiques i tinguin un nivell d'instabilitat genòmica massa elevat veuran reduïda la seva viabilitat i la cèl·lula entrarà en apoptosi. Contràriament, si el nivell d'instabilitat genòmica és baix, les cèl·lules seran incapaces de superar les barreres selectives com l'anòxia, les influències hormonals o el sistema immunològic. Entremig d'aquestes dues situacions, trobem els tumors amb poblacions cel·lulars dominants que presenten uns nivells d'instabilitat genètica òptims per proporcionar un avantatge selectiu.

## **1.2. EL GENOMA INESTABLE DE LA CÈL·LULA TUMORAL**

La instabilitat genètica s'ha proposat com el motor de la tumorigènesi. L'alt nombre de mutacions que presenten els genomes de les cèl·lules tumorals ha derivat en la hipòtesi que un dels primers esdeveniments de la carcinogènesi podria ser una mutació que elevi la velocitat d'acumulació d'aquestes en cèl·lules en divisió. Un dels postulats més acceptats per explicar aquest fenotip mutador (Loeb, 1991) és la instabilitat genòmica. Així, la instabilitat genòmica explicaria l'elevada taxa de mutacions presents en el tumor (Loeb & Loeb, 1999) i facilitaria l'evolució de la cèl·lula tumoral en un determinat entorn de pressions selectives (Tomlinson & Bodmer, 1999). Assumint aquesta hipòtesi, la instabilitat genòmica hauria de ser un pas inicial en la tumorigènesi, inclús abans de qualsevol mutació en un gen supressor de tumors. Tot i així, quan s'han estudiat tumors primaris de còlon, no s'ha observat que mutacions en els gens *BUB1* (Cahill et al., 1998) i *MAD2* (Michel et al., 2001) (ambdós implicats en la generació d'aneuploïdies en línies cel·lulars de càncer de còlon) tinguin lloc abans de les mutacions en *APC* i presentin capacitat d'iniciar al tumorigènesi. Altres estudis en càncer de còlon demostren que el desenvolupament d'adenomes no forçosament ha d'anar associat a la presència d'instabilitat genètica ni d'alteracions en el cariotip (Haigis et al., 2002).

Actualment existeixen dos patrons d'instabilitat genòmica que explicarien un tan per cent molt elevat dels fenotips que apareixen en les cèl·lules tumorals (Taula 1). Són la instabilitat de microsatèl·lits i la instabilitat cromosòmica (Lengauer et al., 1998). La instabilitat cromosòmica abarca la instabilitat numèrica i la instabilitat estructural.

**Quadre 1. Definicions associades a la inestabilitat genòmica.**

<b>Inestabilitat genòmica</b>	Estat cel·lular anòmal associat a un augment de la taxa d'alteracions genòmiques, incloent mutacions, reorganitzacions cromosòmiques, delecions i amplificacions.
<b>Fenotip mutador</b>	La inestabilitat genòmica promou la tumorigènesi mitjançant mutacions en oncògens i gens supressors de tumors que s'aniran succeint al llarg del desenvolupament del càncer.
<b>CIN</b>	Inestabilitat cromosòmica: tipus d'inestabilitat genòmica associada a un augment dels guanys i pèrdues de cromosomes, així com processos de no-disjunció.
<b>MIN</b>	Inestabilitat de microsatèl·lits: tipus d'inestabilitat genòmica associada a errors en els gens de reparació de desaparellaments del DNA, resultant en una taxa de mutació del DNA molt elevada.
<b>Aneuploïdia</b>	És l'estat en què una cèl·lula presenta un nombre de cromosomes alterat.

**Taula 1. Resum de les formes d'inestabilitat genòmica**

Tipus d'inestabilitat genòmica	Processos biològics per mantenir l'estabilitat del genoma	Exemples de gens desregulats	Exemples de desordres associats
<b>1</b> Inestabilitat de microsatèl·lits			
Mutacions puntuals	Reparació de desaparellaments del DNA	<i>MSH2</i> ; <i>PMS1</i> ; <i>PMS2</i> ; <i>MLH1</i>	HNPCC
<b>2</b> Inestabilitat cromosòmica numèrica			
- Guany i pèrdua de cromosomes	Condensació i cohesió de les cromàtides germanes Punts de control del fus mitòtic	<i>PTTG</i>  <i>BUB1</i> , <i>BUB1B</i>	Tumors pituïtaris  CRC, rabdiosarcoma
- Alteracions en la ploïdia	Nombre de centrosomes i citocinesi Arrest mitòtic prolongat	<i>Aurora-A</i>  <i>TP53</i> ; <i>BCL-2</i>	CRC  Càncer de mama
<b>3</b> Inestabilitat cromosòmica estructural			
Reorganitzacions cromosòmiques (per exemple: delecions, translocacions)	Senyalització del dany genòmic Reparació dels trencaments de doble cadena Reparació del DNA per entrecreuament	<i>ATM</i> ; <i>BRCA1</i> ; <i>TP53</i> <i>BLM</i> ; <i>WRN</i>  <i>FANCA</i> - <i>FANCG</i>	Ataxia telangiectasia; Càncer de mama Síndrome de Bloom; Síndrome de Werner Anèmia de Fanconi

HNPCC, de l'anglès *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*CRC, de l'anglès *colorectal cancer***1.2.1. INESTABILITAT DE MICROSATÈL·LITS**

Les seqüències de microsatèl·lits consisteixen en repeticions de sis o menys nucleòtids al llarg de fins a 100 parells de bases (Levinson & Gutman, 1987). Aquests elements repetitius constitueixen seqüències diana perquè s'hi produeixen errors de replicació originats per les DNA polimerases. Aquests errors de les polimerases donen

lloc a insercions o delecions d'unitats repetitives. La inactivació dels gens implicats en la reparació d'errors en l'aparellament de bases del DNA (gens MMR, de l'anglès *mismatch repair genes*) provoca que aquests errors de replicació no siguin reparats, amb la conseqüent acumulació de mutacions en la seqüència de microsatèl·lits. Aquest fenomen va ser detectat a principis dels anys 90 en càncers de còlon i recte familiars per diferents grups (Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993; Peltomaki *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993) i s'anomenà inestabilitat de microsatèl·lits (MSI, de l'anglès *microsatellite instability*). La inestabilitat de microsatèl·lits es presenta en la majoria de síndromes de càncer de còlon hereditàries no poliposes (HNPCC, de l'anglès *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), i aproximadament en un 15% dels tumors de còlon i recte esporàdics. Per tal de què es designi un adenocarcinoma de còlon amb inestabilitat de microsatèl·lits cal que almenys dos d'un panell de cinc loci seleccionats per el *National Cancer Institute* presentin seqüències inestables (Boland *et al.*, 1998). Tres marcadors amb repeticions de dinucleòtids (D2S123, D5S346, D17S250) i dos marcadors amb repeticions de mononucleòtids (BAT25 i BAT26) són els utilitzats per distingir els tumors amb inestabilitat de microsatèl·lits. Posteriorment, s'han establert estandaritzacions d'aquest protocol (Gonzalez-Garcia *et al.*, 2000). Aquests tumors es divideixen segons si presenten una inestabilitat elevada (MSI-H, de l'anglès *high*) o baixa (MSI-L, de l'anglès *low*). Els gens que contenen seqüències semblants a microsatèl·lits en les seves regions codificants (repeticions de mononucleòtids) poden ser dianes de mutacions de canvis de pauta de lectura com a resultat de la deficiència del sistema de reparació de desaparellaments del DNA. Aquestes mutacions en la pauta de lectura poden donar lloc a proteïnes truncades, la disfuncionalitat de les quals pot contribuir al desenvolupament del tumor. Les característiques de les repeticions de les seqüències de microsatèl·lits (longitud, número de repeticions, interrupcions, seqüències flanquejants) poden afectar a la taxa mutacional (Boyer *et al.*, 2002). Els gens diana afectats per la inestabilitat de microsatèl·lits codifiquen per proteïnes amb diferents funcions cel·lulars, com per exemple, transducció de senyal, apoptosi, reparació del DNA, regulació transcripcional, modificacions posttraduccionals i sistema immunològic (Woerner *et al.*, 2003). Els primers gens diana de la inestabilitat de microsatèl·lits es van descobrir en l'estudi de pacients amb HNPCC, i van ser el *TGFβRII* (Markowitz *et al.*, 1995), *IGFIIR* (Souza *et al.*, 1996) i *BAX* (Rampino *et al.*, 1997). Altres gens que s'han trobat freqüentment afectats són *CASPASE5* (Schwartz *et al.*, 1999), *MSH3* (Malkhosyan *et al.*, 1996), *TCF4* (Duval *et al.*, 1999) i *RIZ* (Chadwick *et al.*, 2000). Les mutacions en aquests gens s'acumulen al llarg de diferents cicles cel·lulars, i puntualment confereixen un avantatge cel·lular en forma de regulació descontrolada del creixement.

Alhora, aquestes mutacions també s'han implicat en la progressió de la cèl·lula tumoral des d'adenoma a carcinoma. El moment de la progressió en el qual aquestes mutacions tenen lloc no es coneix massa bé, però, per exemple, les mutacions en *TGF $\beta$ RII* han estat descrites com la segona modificació després de les mutacions en els gens MMR, suggerint que la pèrdua de la funció d'aquest gen podria estar implicada en la transició d'adenoma a carcinoma.

Alguns autors postulen que els tumors que presenten inestabilitat de microsatèl·lits presenten unes freqüències mutacionals baixes pels gens *K-RAS*, *TP53*, i  *$\beta$ -catenina*, i presenten, encara que amb menys freqüència, pèrdues d'heterozigositat als cromosomes 5q, 17p i 18q, quan són comparades amb les dels tumors sense inestabilitat de microsatèl·lits (Jass *et al.*, 1999). Tot i així, altres autors han trobat mutacions en gens involucrats en la via de senyalització WNT independentment de si presenten MSI (Huang *et al.*, 1996). Per exemple, mutacions en *APC* i  *$\beta$ -catenina* s'han trobat en un 21 i 43%, respectivament, de tumors amb MSI (Konishi *et al.*, 1996; Miyaki *et al.*, 1999a). En d'altres estudis també s'ha trobat que les freqüències de mutació del gen *K-RAS* no varia significativament entre els tumors MSI i els tumors sense inestabilitat de microsatèl·lits.

### 1.2.2. INESTABILITAT CROMOSÒMICA

Les cèl·lules humanes normals presenten un nombre invariable de 46 cromosomes. La majoria de tumors sòlids contenen cèl·lules amb un nombre alterat de cromosomes, i sovint el nombre de cromosomes pot variar entre les diferents cèl·lules que formen el mateix tumor. A més a més, aquests cromosomes acostumen a presentar reorganitzacions estructurals que són molt poc freqüents en cèl·lules normals: inversions, delecions, amplificacions i translocacions.

La inestabilitat cromosòmica, descrita per Lengauer i col (1998) com a CIN (de l'anglès *chromosome instability*), es refereix a la prevalença que presenten alguns tumors a presentar guanys i pèrdues de cromosomes, sencers o parcials, amb una taxa superior respecte les cèl·lules normals. Els guanys i pèrdues parcials de cromosomes provenen d'alteracions cromosòmiques estructurals, tals com translocacions recíproques i no recíproques, regions de tinció homogènia, amplificacions i delecions. Generalment, cada cèl·lula del tumor presenta un cariotip diferent degut a la inestabilitat cromosòmica la qual es defineix simplement per l'adquisició d'alteracions, tant numèriques com estructurals, que varien de cèl·lula a cèl·lula.

A pesar d'aquestes diferències intercel·lulars, el cariotip de la cèl·lula tumoral es manté estable al llarg del temps, molt probablement perquè els tumors en estadis avançats



presenten un genotip evolucionat i optimitzat pel creixement cel·lular, essent menys probable l'adquisició de noves alteracions.

### 1.2.2.1. SÍNDROMES D'INESTABILITAT CROMOSÒMICA

Existeix un conjunt de síndromes autosòmiques recessives que comparteixen la característica de presentar inestabilitat cromosòmica, o sigui, que presenten un elevat nombre d'alteracions cromosòmiques espontànies. Les síndromes més comunes són l'ataxia telangiectàsia, l'anèmia de Fanconi i la síndrome de Bloom. Altres desordres a nivell cel·lular relacionats amb la inestabilitat cromosòmica són la síndrome de Nijmegen, la síndrome de Werner, la Xeroderma pigmentosum i la síndrome d'aneuploidies variegades en mosaic.

**ATÀXIA TELANGIECTÀSIA** Es caracteritza per una atàxia cerebelar progressiva, una telangiectasi ocular i de la pell, un creixement retardat, immunodeficiència severa, envelliment prematur i un risc elevat de desenvolupar tumors sòlids o limfàtics (Shiloh, 1995). També presenten una hipersensibilitat a les radiacions ionitzants i agents radiomimètics. Els individus heterozigots també presenten un risc de desenvolupar càncer més elevat. L'alteració cromosòmica més freqüent és una translocació que afecta als gens dels receptors de les cèl·lules T (*TCR*), localitzats als cromosomes 7 i 14, essent l'origen de la immunodeficiència. En aquests individus és fàcil observar la presència de múltiples fusions telomèriques, molt probablement degut a l'escurçament prematur dels telòmers. El gen de l'ataxia telangiectàsia és *ATM* (de l'anglès *ataxia telangiectasia mutated*) i està mapat a 11q22-q23. El producte proteic d'aquest gen està implicat en vies de transducció de senyal, en la recombinació meiótica, i sobretot, actua com a punt de control de la regulació del cicle cel·lular. Més concretament, *ATM* està implicat en la regulació de la resposta de *TP53* en situacions de dany genòmic, bloquejant el cicle cel·lular a la fase G1 i impedit el pas a la fase S fins que el dany al DNA no estigui reparat. En individus amb atàxia telangiectàsia, les cèl·lules poden entrar en fase S malgrat el possible dany al DNA, amb la qual cosa s'acumulen trencaments i reorganitzacions cromosòmiques, augmentant el risc de desenvolupar un càncer o produir-se la mort cel·lular.

**ANÈMIA DE FANCONI** Les característiques clíniques d'aquests pacients són disfuncions de la medul·la òssia, anomalies esquelètiques, hiperpigmentació de la pell i una incidència molt elevada a desenvolupar càncer (D'Andrea & Grompe, 1997). En cultiu, les cèl·lules de pacients amb anèmia de Fanconi presenten una taxa de

replicació del DNA disminuïda, una fase G2 prolongada, un increment de trencaments cromosòmics espontanis i una hipersensibilitat a agents intercalants del DNA com el diepoxibutà i la mitomicina C, la qual cosa es manifesta amb una elevada presència de triradials, quadriradials i estructures cromosòmiques complexes. Citogenèticament, la característica més comuna en aquestes cèl·lules són les translocacions entre cromosomes no homòlegs. Actualment s'han descrit fins a 12 gens implicats en l'anèmia de Fanconi: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL* i *FANCM*. La forma més prevalent, FAA, és la que implica mutacions en el gen *FANCA*, i representa un 65% de tots els pacients. L'empaquetament d'un complex nuclear format per les proteïnes intactes de *FANCA-M*, permetria a *FANCD2* activar *BRCA1* per iniciar la reparació en resposta al dany ocasionat per agents intercalants.

**SÍNDROME DE BLOOM** Els aspectes fenotípics associats a aquesta síndrome són retard en el creixement, immunodeficiència, sensibilitat a les radiacions solars i alt risc de desenvolupar càncer (German, 1993). Els afectats per aquesta síndrome presenten una elevada freqüència d'alteracions cromosòmiques, principalment, translocacions recíproques entre cromosomes no homòlegs i una gran tendència a intercanvis de cromàtides homòlogues (Traverso *et al.*, 2003), la qual cosa es tradueix en un augment d'entre 10-20 vegades més intercanvis de cromàtides germanes respecte les cèl·lules normals i en una elevada freqüència de formació de quadriradials, indicatiu d'intercreuaments mitòtics (Chakraverty & Hickson, 1999). Aquesta síndrome està associada a alteracions en un únic gen, *BLM*, localitzat al braç llarg del cromosoma 15. El producte d'aquest gen pertany a la família de les RecQ, unes DNA helicases dependents d'ATP que intervenen activament en la reparació del DNA, la replicació i la recombinació homòloga.

**ALTRES SÍNDROMES** La síndrome de Nijmegen va ser inicialment considerada com una variant de l'atàxia telangiectàsia degut a les semblances entre els fenotips. Tot i això, el gen implicat en aquesta síndrome és *NBS1*, mapat a 8q21.3. El producte del gen forma part d'un complex multiproteic que conté *MRE11*, *RAD50* i *BRCA1*, les quals estan implicades en la reparació dels trencaments de doble cadena. Aquest mateix complex està implicat en la recombinació meiótica.

La síndrome de Werner es caracteritza per un marcat retard mental i un envelliment prematur. Tant la freqüència d'alteracions cromosòmiques estructurals com el risc de desenvolupar càncer estan molt incrementats. De manera semblant a la síndrome de Bloom, el gen implicat, *WRN*, mapat a 8p12-p11.2, també forma part de la família de

les DNA helicases RecQ. Les cèl·lules amb defectes en el gen WRN mostren problemes en l'inici de la replicació, defectes en la progressió a fase S i hiperrecombinació. Estudis recents han demostrat que aquest gen només s'expressa en teixit no epitelial, la qual cosa explicaria l'elevada freqüència de tumors no epitelials associats a aquesta síndrome.

La síndrome xeroderma pigmentosum configura un conjunt de malalties autosòmiques recessives que no estan associades a una generació espontània de trencaments cromosòmics, sinó que els individus que la pateixen presenten una elevada susceptibilitat a desenvolupar càncer de pell quan són exposats a la llum ultraviolada. Els gens que es veuen afectats són *XPAXPG* i *XPV*, implicats en la reparació del DNA per excisió de nucleòtids (NER).

Molt recentment, s'han descrit les bases genètiques de la síndrome d'aneuploidies variegades en mosaic, la condició recessiva de la qual dona lloc a aneuploidies, especialment monosomies i trisomies, implicant diferents cromosomes i diferents teixits. Mutacions en el gen *BUB1B*, la funció del qual és de controlador del fus mitòtic, s'ha vist que podrien ser la causa genètica d'aquesta síndrome (Hanks *et al.*, 2004).

#### **1.2.2.2. INESTABILITAT CROMOSÒMICA NUMÈRICA: DE L'ANEUPLOÏDIA A LA POLIPLOÏDIA**

El 1914, el biòleg alemany Theodor Boveri va descriure que les cèl·lules tumorals que estava estudiant presentaven un nombre anòmal de cromosomes, i va suggerir que els tumors malignes apareixien com a resultat d'errors en la segregació cromosòmica, estat anomenat aneuploidia. Més recentment, el descobriment que mutacions en oncògens i en gens supressors de tumors eren suficients per desenvolupar el càncer, va provocar que la teoria de l'aneuploidia com a motor en la gènesis del càncer quedés obsoleta. Actualment, gràcies a diferents estudis que aborden de nou el tema, aquest torna a estar a l'ordre del dia.

L'aneuploidia és el fenomen pel qual una cèl·lula presenta el guany o la pèrdua d'un cromosoma sencer respecte la ploïdia normal ( $2n=46$ ). Estudis citogenètics van demostrar que els guanys i les pèrdues de cromosomes són fenòmens molt comuns en cèl·lules humanes malignes (Mitelman *et al.*, 1994). L'aneuploidia desestabilitza el nombre de cromosomes i és la causa primera de la inestabilitat cromosòmica en cèl·lules neoplàsiques (Duesberg *et al.*, 2004). La inestabilitat cromosòmica (CIN) (Lengauer *et al.*, 1998) es refereix a la taxa amb la qual el fenomen de guanys i pèrdues de cromosomes, així com les pèrdues d'heterozigositat, tenen lloc en una cèl·lula al llarg del temps. Per tant, el comportament estàtic de l'aneuploidia en una

cèl·lula no ens aportarà informació de la inestabilitat cromosòmica, a pesar que n'és la desencadenant. Les bases genètiques de l'aneuploïdia encara no han estat elucidades. Per una banda, es creu que l'aneuploïdia està causada per mutacions genètiques en gens específics que controlen els processos de segregació cromosòmica però, per altra banda, també se suggereix que l'aneuploïdia és completament independent de mutacions genètiques (Duesberg & Li, 2003). Les conseqüències de la inestabilitat cromosòmica numèrica les podem descriure a dos nivells. En primer lloc, les aneuploïdies, ja siguin monosomies o trisomies, comporten el guany o la pèrdua d'una còpia de tots els gens d'aquell cromosoma o tros de cromosoma el qual es desequilibra. En conseqüència, una elevada quantitat de gens veurà la seva expressió augmentada o reduïda a la meitat. Per tal de compensar l'efecte de l'aneuploïdia la cèl·lula té alguns recursos. El primer el podríem descriure a nivell gènic, pel qual compensa la haploinsuficiència mitjançant la regulació de les vies cel·lulars afectades. Per altra banda, en el cas de la monosomia, la cèl·lula pot duplicar el cromosoma que manté intacte, de manera que recupera el nombre modal de 46 cromosomes. Tot i així, tots els gens del cromosoma duplicat tindran el mateix origen, de manera que la seva expressió es pot veure igualment afectada i tindrà el mateix efecte que si el gen estigués en homozigosi.

L'altra gran conseqüència de la inestabilitat cromosòmica numèrica, entesa segons la definició de Lengauer i col (1998), és la pèrdua d'un haplotip de la regió o regions afectades per pèrdues d'heterozigositat. Aquesta és, segons la teoria de Knudson, una de les maneres més evidents de posar de manifest aquells gens supressors de tumors que ja tenien una còpia mutada. Per tant, CIN contribueix a l'acceleració de LOH (de l'anglès *loss of heterozygosity*) com a mecanisme d'inactivació de gens supressors de tumors.

Les causes més freqüents de l'aneuploïdia són les alteracions en la segregació cromosòmica provocades pels fenòmens de no-disjunció o pèrdua anafàsica. Des del punt de vista mecanístic, les alteracions en el cinetocor, la separació prematura de cromàtides, l'amplificació dels centrosomes, les alteracions del fus mitòtic i les alteracions en la citocinesi estarien en l'origen de l'aneuploïdia (Taula 2).

**Taula 2.** Gens implicats en la segregació cromosòmica en càncers humans

Gens desregulats	Funció gènica	Expr	Tipus de càncer
<b>No checkpoints</b>			
<i>APC</i>	Unió als extrems positius dels microtúbuls i cinetocors	-	FAP, altres CRCs
<i>GSK3-β</i>	Dinamisme i aliniament dels cromosomes en la placa metafàsica	↑	Ovari
<i>Survivina</i>	Proteïna associada al cromosoma; factor antiapoptòtic	↑	Pulmó, còlon, pàncrees, pròstata, mama,
<i>Ch-TOG-1</i>	Proteïnes d'encaix del fus mitòtic	↑	Tumors hepàtics
<i>HEC1</i>	Proteïnes d'encaix dels cinetocors	↑	Línies cel·lulars de carcinoma
<i>Securina/PTTG</i>	Cohesió de les cromàtides germanes	↑	Adenomes pituïtaris
<i>INCEP</i>	Proteïna associada al centròmer	↑	Còlon i recte
<i>PIK1/Polo Kinase</i>	Entrada a la mitosi; citocinesi	↑	Còlon i recte
<i>AuroraA/STK6/STK15/BTAK/Aurora2</i>	Proteïnes d'encaix del fus mitòtic; entrada a la mitosi	↑	Còlon i recte, mama
<b>Checkpoints mitòtics</b>			
<i>Aurora-B</i>	Proteïna associada al cromosoma; citocinesi	-	Còlon i recte
<i>MAD1</i>	<i>Checkpoint</i> del fus mitòtic	-	Leucèmia cèl·lules T
<i>MAD2</i>	<i>Checkpoint</i> del fus mitòtic	-	Ovari
<i>BUB1/B</i>	Quinasa del <i>checkpoint</i> del fus mitòtic	-	Còlon i recte
<i>BUBR1</i>	Quinasa del <i>checkpoint</i> del fus mitòtic	↓	Còlon i recte

De totes aquestes, les causes més importants i que més desenvoluparem a continuació són mutacions en les proteïnes que controlen el fus mitòtic i defectes en la regulació del nombre de centrosomes.

Les proteïnes de control del fus mitòtic (en anglès *spindle checkpoint*) formen un sistema de transducció de senyal amb un sensor que monitoritza l'estat de la unió entre els cinetocors i els microtúbuls del fus mitòtic. El funcionament normal de les proteïnes del fus mitòtic assegura que tots els cromosomes s'alineïn correctament en la placa metafàsica i quedin adequadament units als microtúbuls que formen el fus. Alhora es comporten com a reguladors de la progressió del cicle cel·lular en funció de possibles errors d'alineació dels cromosomes en la placa metafàsica i controlen l'activitat del complex promotor de l'anafase, el qual degrada la proteïna securina i les proteïnes ciclíniques mitòtiques permetent la progressió de la divisió cel·lular (Yu, 2002). Fins al moment, no s'ha trobat cap gen del control del fus mitòtic com a únic gen implicat directament en la tumorigènesi. Algunes de les proteïnes del fus mitòtic són MAD1, MAD2, BUBR1, BUB1, BUB3, MPS1 i Aurora-B. Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes s'han trobat altament conservats en diferents espècies. Quan hi ha problemes de posicionament de les cromàtides germanes en el fus mitòtic, aquestes proteïnes retarden el procés de l'anafase esperant la seva correcta unió. Les mutacions en el gen BUB1 presenten un caràcter dominant en línies cel·lulars CIN de càncer de còlon (Bardelli *et al.*, 2001), i l'expressió truncada d'un homòleg de *BUB3* causa defectes en la segregació cromosòmica (Taylor *et al.*, 1998). Tot i així, només

una fracció molt baixa de tumors primaris presenten mutacions en els gens *BUB* i *MAD* (Tighe *et al.*, 2001). El gen *Aurora-A*, localitzat a la banda cromosòmica 20q13.1, es troba freqüentment amplificat en un gran nombre de càncers. La sobreexpressió d'aquest gen trenca la unió entre BUBR1 i CDC20, les quals activen el complex promotor de l'anafase, generant així el fenotip CIN (Jiang *et al.*, 2003).

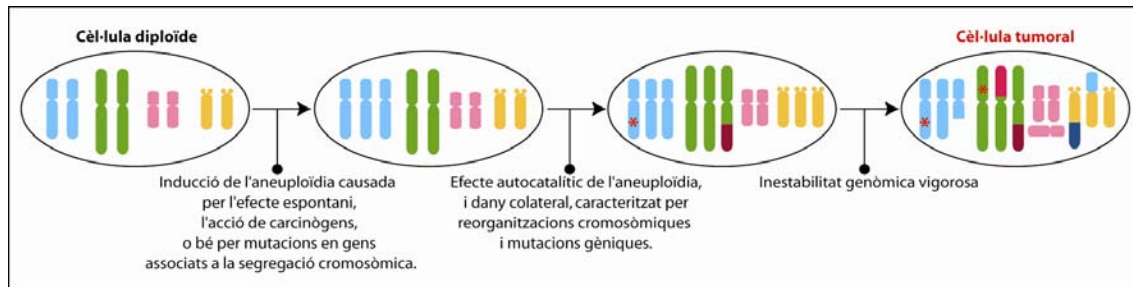
Les alteracions en el nombre i funcionament dels centrosomes són una de les altres causes que freqüentment s'associa a l'aneuploïdia. Els centrosomes són unes organitzacions de microtúbuls crucials per la correcta segregació cromosòmica i citocinesi (revisat per Nigg, 2002). En la cèl·lula normal, durant la fase M els dos centrosomes es distribueixen als pols de la cèl·lula i organitzen la formació del fus mitòtic. S'han descrit alteracions en el nombre de còpies dels centrosomes (centrosomes supernumeraris) en diferents tipus de càncers (Carroll *et al.*, 1999; Pihan *et al.*, 1998), incloent el càncer de còlon i recte. S'han proposat quatre possibles mecanismes d'amplificació dels centrosomes: (i) la desregulació de la duplicació dels centrosomes, la qual té lloc en la fase S del cicle cel·lular; (ii) l'aturada del procés de citocinesi comportant que la cèl·lula esdevingui tetraploide amb una dotació de dos centrosomes en la fase G1; (iii) les fusions cel·lulars també poden donar lloc a alteracions en el genoma i en els centrosomes; i (iv) la formació de centríols *de novo*. També s'ha proposat que mutacions en *TP53* poden provocar l'adquisició de múltiples centrosomes degut a errors en els punts de control de la fase G1 en cèl·lules que hagin estat patint aturades de la citocinesi. Una de les altres vies que també s'ha associat a la presència de cromosomes supernumeraris és la del retinoblastoma. Degut al paral·lisme entre la duplicació del material genòmic i la dels centrosomes, la pèrdua de la funció del gen *RB* podria crear un ambient idoni per la duplicació incontrolada dels centrosomes com a resultat de prolongacions de la fase S del cicle cel·lular. La sobreexpressió del gen *STK15*, una quinasa associada al centrosoma, també desestabilitza el cicle de replicació d'aquest (Zhou *et al.*, 1998).

Els mecanismes pels quals es pot arribar a la poliploïdia els podríem classificar en dos grups (Storchova & Pellman, 2004). El primer, que anomenem model de mutacions concretes per l'aneuploïdia, vindria provocat per alteracions en els gens del càncer, les quals donarien lloc a guanys i pèrdues de cromosomes en la cèl·lula diploide. El segon mecanisme contempla l'aneuploïdia com a producte final d'un procés intermedi de tetraploïdia. La idea s'origina de l'observació que les cèl·lules tetraploides quan perden la funció de *TP53* tenen capacitat de sobreviure encara que el seu genoma sigui 4n. La tetraploïdia provoca un desgavell considerable durant el procés de la mitosi, la qual cosa genera inestabilitat genòmica. Majoritàriament, aquestes cèl·lules moriran, però en alguns casos, una cèl·lula amb la dotació cromosòmica tetraploide sobreviurà, i

seguidament començarà a perdre cromosomes fins arribar a un nombre poliploide més o menys estable ( $>2n$ ). Existeixen diferents fets que evidencien que la tetraploïdia podria explicar l'origen de les cèl·lules poliploides: (i) algunes cèl·lules tumorals presenten una dotació cromosòmica tetraploide o quasi-tetraploide (Kaneko & Knudson, 2000); (ii) en alguns models tumorals, la cèl·lula tetraploide ja la trobem en l'inici del desenvolupament del tumor (Levine *et al.*, 1991); (iii) els tumors aneuploides sovint presenten alteracions en el nombre de centrosomes (Doxsey, 2001); (iv) generalment, les cèl·lules poliploides presenten alteracions funcionals en els gens *TP53* i *RB*, els quals estan directament relacionats amb els punts de control del cicle cel·lular (Margolis *et al.*, 2003). Un dels models tumorals més estudiats per explicar la tetraploïdia com estat intermedi a la poliploïdia és el model de càncer d'esòfag de Barret (Barrett *et al.*, 1999). Aquests autors troben que un 90-95% dels adenocarcinomes d'esòfag ja presenten aneuploïdies o poblacions tetraploides, suggerint que la dotació  $4n$  pot estar present en cèl·lules premalignes i per tant, l'evolució clonal esdevé molt més complexe que en el model lineal.

Les causes de la tetraploïdia poden ser la fusió cel·lular, l'aturada del cicle cel·lular, la presència de centrosomes supernumeraris i l'endoreduplicació. El truncament del cicle cel·lular pot estar provocat per defectes en la replicació del DNA, en la cohesió de les cromàtides germanes, en el fus mitòtic i en la citocinesi. L'endoreduplicació respon a un desacoblament entre la replicació del DNA i la divisió cel·lular (Edgar & Orr-Weaver, 2001). Concretament, aquest desacoblament es refereix a la consecució de dues o més rondes de replicació ometent algun aspecte de la mitosi, generant una cèl·lula autopoliploide que generalment no prolifera (Ravid *et al.*, 2002).

L'aneuploïdia s'ha proposat com a motor de la tumorigènesi i alternativa a la teoria mutacional del càncer (Duesberg & Li, 2003; Duesberg *et al.*, 1999). A favor d'aquesta teoria, podem afirmar que l'aneuploïdia és un fenomen inherent al càncer (Heim & Mitelman, 1995; Sandberg, 1990), que és proporcional al grau de malignitat del tumor (Nowell, 1976) i que, inevitablement, provoca fenotips cel·lulars anormals causats per l'alteració de la dosi gènica de milers de gens normals (Hieter & Griffiths, 1999). Així, la carcinogènesi s'iniciaria per una aneuploïdia causada a l'atzar, de forma espontània o induïda per algun agent carcinogen. Aquesta aneuploïdia, compatible amb la vida cel·lular, és capaç de generar inestabilitat cromosòmica, tant numèrica com estructural, com a conseqüència del desequilibri de les proteïnes de segregació, i de síntesi i reparació del DNA. El resultat del cariotip inestable genera una cadena d'aneuploïdies, per la qual cosa es diu que el fenomen de l'aneuploïdia és un fenomen autocatalític (Figura 2). Aquest model explicaria de manera molt concisa l'heterogeneïtat en els cariotips i fenotips cel·lulars de les cèl·lules tumorals.



**Figura 2.** Inestabilitat genòmica i carcinogènesi via aneuploidització. L'aneuploidia té un efecte autocatalític que genera inestabilitat cromosòmica numèrica i estructural en les següents divisions cel·lulars degut a un desequilibri dels grups de proteïnes implicats en la segregació cromosòmica, reparació del DNA i integritat genòmica.

Una de les qüestions crucials per contextualitzar la inestabilitat cromosòmica en la biologia del càncer és saber en quin moment apareix la inestabilitat, i així poder deduir si realment aquesta representa la força motora de la tumorigènesi. Alguns autors afirmen que la inestabilitat cromosòmica podria aparèixer en una fase molt inicial del tumor, ja que en adenomes molt petits s'han observat desequilibris al·lèlics a nivell de SNPs (de l'anglès, *Single Nucleotide Polymorphism*) (Shih *et al.*, 2001b). Segons Lengauer i col. (1998), la conseqüència més immediata de la inestabilitat cromosòmica a nivell genètic és la pèrdua d'heterozigositat (LOH). Si la LOH reflecteix la pèrdua d'un tros de cromosoma o d'un cromosoma sencer és un dels aspectes de la definició de CIN que es podria discutir extensament, ja que hi ha altres mecanismes que poden donar lloc a LOH, com per exemple la recombinació mitòtica. Aquesta pèrdua d'heterozigositat pot afectar a gens supressors de tumors, i recentment s'ha elaborat un model matemàtic per descriure la cronologia de l'adquisició de la CIN en funció de la inactivació del gen supressor *APC*, (Nowak *et al.*, 2002; Rajagopalan *et al.*, 2003). Segons aquest model, l'adquisició d'una mutació en un gen CIN pot passar abans o després de la primera mutació en un gen supressor de tumors. En qualsevol cas, aquestes alteracions estan limitades per la taxa de mutació cel·lular. Si en primer lloc es dona una mutació en un gen CIN, la pèrdua d'heterozigositat del gen supressor de tumors es veurà altament afavorida, la qual cosa accelerarà el procés. No només això, sinó que els autors també proposen que el model de Knudson es podria referir no a dues mutacions en el gen supressor de tumors, sinó a una mutació en un gen CIN i una segona mutació que afectés al primer al·lel del gen supressor de tumors, mentre que el segon al·lel es perdria ràpidament per l'efecte de la CIN ja que la LOH no estarà limitada per la taxa mutacional de la cèl·lula.



### 1.2.2.3. INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL

Definim la inestabilitat cromosòmica estructural com la generació de reorganitzacions cromosòmiques resultat d'alteracions en els punts de control del cicle cel·lular, alteracions en la reparació del dany genòmic i/o la pèrdua de la integritat dels telòmers. Normalment, la cèl·lula té capacitat per reparar totes les lesions del DNA excepte una petita fracció que genera la taxa de mutació bàsica. Ara bé, si la cèl·lula no pot reparar el dany nuclear abans de la replicació, el resultat és una mutació o un trencament de doble cadena (DSB, de l'anglès *double strand break*), els quals poden donar lloc a les reorganitzacions cromosòmiques. Les alteracions en la maquinària cel·lular de control del DNA en la fase G1 són la causa més evident de la inestabilitat cromosòmica estructural.

La citogenètica convencional i el desenvolupament de les tècniques de citogenètica molecular van permetre identificar la presència d'alteracions cromosòmiques en la majoria de cèl·lules canceroses. Les alteracions cromosòmiques estructurals inclouen translocacions, delecions i duplicacions, inversions i regions d'amplificació en forma de diminuts dobles o HSR (de l'anglès *homogeneously staining region*). Generalment, una cèl·lula, ja sigui d'un tumor primari o d'una línia cel·lular, presenta varies alteracions cromosòmiques estructurals o marcadors, la qual cosa és indicativa de la deficiència del manteniment de la integritat genòmica. Algunes de les reorganitzacions cromosòmiques romanen intactes al pas del temps, molt probablement per l'important paper que juguen en la carcinogènesi. Tot i així, aquestes cèl·lules generen contínuament alteracions cromosòmiques estructurals, la qual cosa explicaria l'elevada heterogeneïtat cariotípica que trobem en els tumors.

La major part de les alteracions cromosòmiques que observem en un cariotip són el reflex de trencaments del DNA en la fase G1, els quals no s'han reparat correctament durant la fase S i que, consegüentment, afecten a les dues cromàtides. Quan un cromosoma pateix un únic trencament, s'origina una deleción cromosòmica terminal i un fragment acèntric, el qual es perdrà en la subsegüent divisió cel·lular. Si es donen dos trencaments en el mateix cromosoma es pot originar un fragment acèntric i un cromosoma cèntric en anell en el cas de què ambdós trencaments siguin terminals, o bé un cromosoma en anell acèntric i un cromosoma cèntric amb una deleción intersticial. Uns altres tipus d'alteracions que impliquen trencaments en un sol cromosoma són les duplicacions i les inversions. Aquestes últimes impliquen el canvi d'orientació d'un fragment del cromosoma, el qual pot incloure o no el centròmer, definint així si la inversió és pericèntrica o paracèntrica, respectivament. En el cas de què dos cromosomes estiguin implicats en l'alteració, parlem de cromosomes

dicèntrics i translocacions, les quals poden ser recíproques, no recíproques o Robertsonianes. Les translocacions recíproques poden ser altament nocives per la cèl·lula si els punts de trencament i unió afecten a gens implicats en la regulació del cicle cel·lular, com per exemple la translocació entre els cromosomes 9 i 22 que origina el cromosoma *Philadelphia* en leucèmies mieloides cròniques.

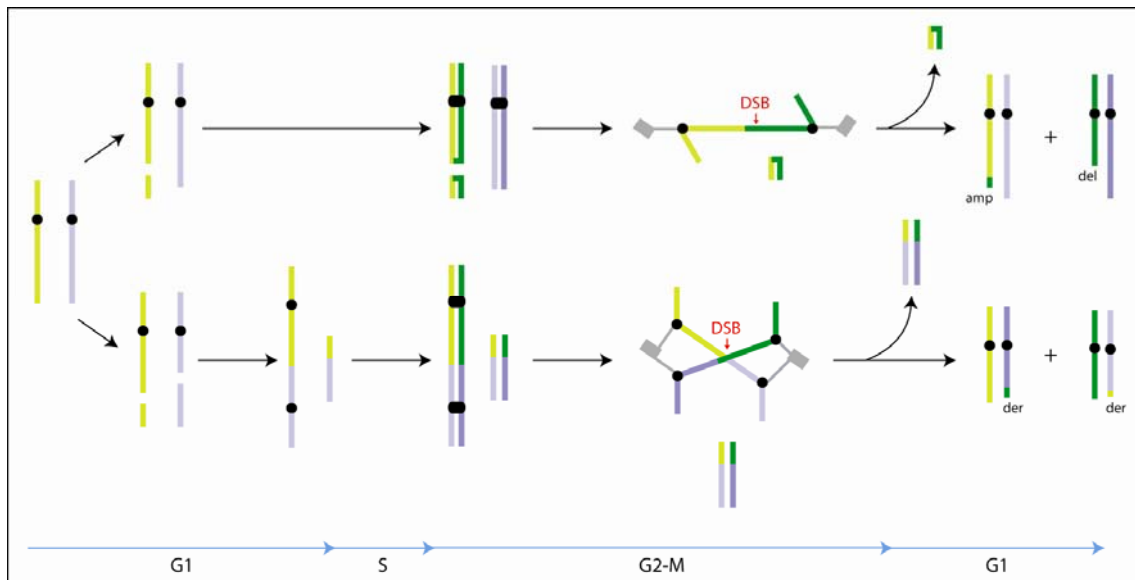
Per altra banda, generalment la translocació no recíproca és el resultat del desequilibri d'una translocació recíproca. En el cas que el trencament del DNA tingui lloc durant la fase G2, només implicarà una de les dues cromàtides, originant el que anomenem trencament de cromàtide. Un trencament únic dóna lloc a fragments acèntrics, mentre que trencaments múltiples poden originar intercanvis de cromàtides i configuracions tri- i quadriradials.

Quan parlem d'instabilitat cromosòmica estructural, requereix una especial atenció el fenomen de trencament-fusió-pont (BFB, de l'anglès *breakage-fusion-bridge*). L'origen d'aquest fenomen el podem trobar en la formació de reorganitzacions inestables, tals com els cromosomes dicèntrics (Figura 3) i els cromosomes en anell. L'esdeveniment inicial és un o més trencaments de doble cadena del DNA. Aquests trencaments poden afectar a un o a varis cromosomes. La formació del cromosoma dicèntric esdevé per trencaments en dos cromosomes, homòlegs o no, i la posterior fusió dels extrems trencats. En el cas que només tingui lloc un únic trencament en la fase G1, s'exposa un extrem desprotegit del cromosoma que, després de la replicació, es fusionarà amb la cromàtide germana per originar una cromàtide dicèntrica. En el cas que els trencaments de doble cadena es donin en dos punts del mateix cromosoma però en braços diferents, es pot originar un cromosoma en anell. En tots els casos, la cèl·lula també presentarà un o més fragments acèntrics com a conseqüència de delecions terminals originades en la fase G1. En la següent mitosi, molt probablement el fragment acèntric es perdrà. Pel que fa al cromosoma dicèntric o cromosoma en anell, durant l'anafase, cada centròmer pot ser empès cap a un pol oposat, formant un pont anafàsic. El cromosoma dicèntric, ara formant el pont, es trencarà per un o varis punts a l'atzar, tornant a originar extrems desprotegits amb facilitat per fusionar-se de nou i formar un altre cromosoma dicèntric. Aquest procés continu amb pèrdues cromosòmiques eventuals s'anomena cicle de trencament-fusió-pont, i va ser descrit per primera vegada per la genetista Barbara McClintock el 1938 (McClintock, 1938).

Durant el procés de BFB, quan hi ha fusions de dues cromàtides germanes per reparar un trencament de doble cadena o alteracions en els telòmers (Figura 3), s'han identificat regions d'amplificació i delecions recurrents a mesura que es repeteix aquest cicle just en els punts on es donaria la recombinació homòloga (O'Hagan *et al.*, 2002). Dit d'una altra manera, el cicle BFB podria servir com a mecanisme

d'amplificació d'oncogens i/o de pèrdua de gens supressors de tumors. L'elevada freqüència de trencaments de doble cadena en els llocs fràgils del genoma fa que gens candidats a estar implicats en la carcinogènesi, físicament propers a aquests llocs fràgils, es vegin amplificats o delecionats per aquest mecanisme cel·lular (Hellman *et al.*, 2002). Recentment, en l'estudi d'osteosarcomes, uns tumors típicament caracteritzats per presentar inestabilitat cromosòmica, s'ha observat que les regions del genoma amb amplificacions gèniques corresponen a punts propers a llocs fràgils i sovint implicats en cicles de BFB (Lim *et al.*, 2005).

El cromosoma dicèntric, a part de generar el pont anafàsic, pot tenir altres conseqüències cel·lulars. Alternativament a la formació del pont anafàsic, el cromosoma dicèntric es pot desunir del fus mitòtic mantenint les dues cromàtides en una de les dues cèl·lules filles, resultant en el guany d'un cromosoma dicèntric extra en la cèl·lula filla. Aquest fenomen comportarà la generació d'alteracions estructurals en les següents divisions. Una de les altres conseqüències cel·lulars que pot tenir lloc és la prevenció de la citocinesi; així, la cèl·lula filla, no tan sols tindrà una dotació cromosòmica 4n, sinó que també serà tetraploïde pel nombre de centrosomes. Aquest fenomen generaria alteracions estructurals i numèriques (revisat en Gisselsson & Hoglund, 2005).



**Figura 3.** Diagrama dels dos principals mecanismes de formació de cromosomes dicèntrics. En la part superior només ha tingut lloc un trencament de doble cadena de DNA en un cromosoma, mentre que en la part inferior han tingut lloc dos trencaments en cromosomes diferents. En la fase M, els centròmers seran estirats cap als pols del fus mitòtic i generaran els ponts anafàsics. Quan aquests ponts es trenquin degut a DSBs, en un o més fragments, originaran amplificacions i delecions (esquema superior) o translocacions desequilibrades (esquema inferior) en les cèl·lules filles.

Tal i com hem esmentat anteriorment, els trencaments de doble cadena del DNA són uns inductors molt potents de les alteracions cromosòmiques. Les causes dels trencaments de doble cadena les podríem dividir en causes exògenes i causes endògenes. En el primer grup cal destacar les radiacions ionitzants, les quals generen radicals lliures amb un elevat comportament clastogènic. La llum ultraviolada també reflecteix aquest comportament, tot i que amb menys intensitat. Els agents radiomimètics i agents químics, com alquilants, epòxids, amines aromàtiques, compostos nitrosos i metalls pesants, indueixen trencaments preferentment a la fase G2 provocant intercanvis de cromàtides germanes. Per altra banda, les causes endògenes recauen sobre factors genètics que augmenten la probabilitat d'acumular trencaments cromosòmics, com per exemple les síndromes amb deficiència per la reparació del DNA descrites anteriorment. Els radicals lliures originats pel propi metabolisme de la cèl·lula, així com trencaments de cadena senzilla del DNA durant la replicació que hagin estat reparats erròniament, també poden provocar DSB. Aquests també els podem trobar com a intermedis naturals en processos cel·lulars com la recombinació meiótica, la maduració dels gens de les immunoglobulines per recombinació V(D)J o en hipermutacions somàtiques en els *loci* de les immunoglobulines. A més a més, característiques inherents dels genomes també poden afavorir i predisposar a l'aparició de trencaments cromosòmics, com per exemple les alteracions de les seqüències telomèriques, transposons, repeticions de seqüències de DNA, duplicacions segmentàries i llocs fràgils.

Les cèl·lules han desenvolupat varies alternatives per contrarestar el dany nuclear. Evidentment, l'apoptosi representa la forma més dràstica d'evadir el dany en benefici de la resta de la població cel·lular. Un sistema de protecció alternatiu és el que conjuga les proteïnes reguladores del cicle cel·lular i els mecanismes de reparació del DNA. Una vegada la cèl·lula ha detectat el dany al DNA, s'activen els sistemes de control arrestant la cèl·lula abans de la replicació, durant la replicació o prèviament a la segregació cromosòmica en l'anafase. Durant aquests períodes d'aturada, la maquinària de reparació del DNA assegura la integritat del genoma que es transferirà a les cèl·lules filles (veure apartat 1.3). Si la reparació és indeguda, s'inicia una cascada de reaccions cel·lulars desencadenades per mutacions i reorganitzacions cromosòmiques que poden conduir a la inestabilitat genòmica i a la carcinogènesi.

#### 1.2.2.4. DISFUNCIONS TELOMÈRIQUES: ORIGEN DE LA INESTABILITAT ESTRUCTURAL

Existeixen moltes evidències que un dels principals orígens de la inestabilitat cromosòmica estructural en les cèl·lules tumorals podria estar relacionat amb disfuncions telomèriques. Aquestes disfuncions telomèriques condueixen inevitablement a una mort cel·lular massiva i a un estat de crisi cel·lular. Tot i que aquesta crisi significarà una important barrera pel creixement cel·lular i comprometrà la immortalitat, principalment per l'activació de l'apoptosi, la inestabilitat genètica associada a aquest estat provocarà que la cèl·lula que sobrevisqui hagi adquirit unes característiques genètiques que afavoreixin fortament la transformació cel·lular.

##### **Quadre 2. El final del cromosoma, el final de la cèl·lula.**

Els telòmers són unes estructures nucleoprotèiques localitzades als extrems dels cromosomes i juguen un paper crític en el manteniment de la integritat del cromosoma. La DNA polimerasa convencional és incapaç de dur a terme la replicació del DNA que forma els extrems dels cromosomes, amb la qual cosa en cada divisió cel·lular la seqüència telomèrica que forma l'extrem cromosòmic s'escurça evadint qualsevol mecanisme d'activació dels punts de control del cicle cel·lular o de reparació de dany genòmic. En cultiu de cèl·lules humanes, s'ha comprovat que l'escurçament progressiu dels telòmers comporta la detenció de la divisió cel·lular, senescència i mort cel·lular. La telomerasa és un enzim que consisteix en una subunitat catalítica (TERT, de l'anglès *telomerase reverse transcriptase*) capaç de sintetitzar la seqüència de parells de bases que forma el telòmer utilitzant com a motlle un RNA codificat pel gen TERC (de l'anglès *telomerase RNA component*). En humans, l'expressió de *TERT* està limitada al teixit embrionari, limfòcits activats, cèl·lules hematopoiètiques i cèl·lules mare.

La majoria de tumors humans expressen l'enzim telomerasa (Kim *et al.*, 1994). Aquest fenomen permet explicar una de les característiques essencials de la cèl·lula tumoral, la immortalitat cel·lular. Tot i les diverses evidències experimentals d'aquesta relació (Hahn *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999), existeix el handicap d'entendre el perquè les cèl·lules neoplàsiques primerenques presenten nivells baixos o nuls d'activitat telomerasa, mentre que la progressió tumoral està associada a l'augment de l'activitat d'aquest enzim. Es pensa que l'activació tardana de l'activitat telomerasa, condició indispensable per la immortalitat cel·lular, "donaria l'oportunitat" a una erosió dels telòmers en les etapes primerenques del tumor, la qual cosa permetria un cert grau de crisi cel·lular i d'inestabilitat genòmica. Dues evidències per explicar aquesta hipòtesi són que a l'inici del desenvolupament del tumor, i degut a una ràpida proliferació cel·lular, les cèl·lules tumorals presenten uns telòmers més curts que els de les

cèl·lules normals que les envolten (de Lange *et al.*, 1990). Com a conseqüència d'aquesta erosió telomèrica tenen lloc fusions terminals entre cromosomes que han perdut els telòmers, originant ponts anafàsics, una estructura típicament associada a la inestabilitat cromosòmica que presenten els tumors humans. Les mutacions en el gen *mTERC* utilitzant models murins, demostren una elevada correlació entre la disfunció telomèrica i el nombre de ponts anafàsics (Rudolph *et al.*, 2001). L'observació de ponts anafàsics deriva de la perpetuació de cicles de trencament-fusió-pont que s'originen com a conseqüència d'errors en la reparació de trencaments telomèrics, de trencaments en un telòmer i un punt intersticial, o de la formació d'un cromosoma dicèntric, tal i com s'ha explicat anteriorment. Quan la cèl·lula es divideix en absència de telomerasa, els telòmers s'erosionen i els sistemes de reparació del DNA creen fusions cromosòmiques per tal de mantenir la integritat del cromosoma. Aquesta disfunció telomèrica que comporta la recombinació dels extrems desprotegits dels cromosomes, resulta en cromosomes dicèntrics, fusions entre cromàtides germanes o cromosomes en anell (les mateixes estructures cromosòmiques que resulten dels trencaments de doble cadena, tal i com hem vist en l'apartat 1.2.2.3). Automàticament, aquestes estructures originaran disfuncions anafàsiques provocant la formació del ponts anafàsics durant la segregació mitòtica. El cromosoma dicèntric es trenca degut a l'estirament dels centròmers cap als pols, la qual cosa dona lloc a alteracions en el nombre de còpies de DNA, amplifícacions o delecions, com a resultat de la recombinació homòloga que ha tingut lloc prèviament (revisat en Maser & DePinho, 2002). El cromosoma trencat presenta de nou extrems lliures que hauran de ser reparats, ja sigui per unió amb la cromàtide germana o bé amb un extrem d'un altre cromosoma, tancant així el cicle de BFB.

Una altra teoria que aporta consistència a què l'origen de molts BFB està associat a la disfunció i fusió telomèrica, és el fet de trobar que en els tumors amb un percentatge baix d'alteracions cromosòmiques, els punts de trencament d'aquestes es localitzen en regions terminals, mentre que els tumors amb cariotips complexos presenten punts de trencament intersticials i centromèrics. Aquesta diferència rau en el fet que a mesura que transcorren els cicles de BFB, els punts de trencament i subsegüent reparació per unió es desplacen des de l'extrem terminal del cromosoma cap al centròmer (Goldman & Shields, 2003).

Les proteïnes ATM i p53 també les trobem implicades en la resposta a les disfuncions telomèriques (de Lange, 2002). La p53 actua, una vegada més, com a regulador de la proliferació cel·lular, i en cas de dany genòmic com a conseqüència d'alteracions en els telòmers, p53 indueix l'apoptosi (Chin *et al.*, 1999). La inactivació de p53 afavoriria l'estat de crisi en què la disfunció telomèrica comportaria una taxa elevada

d'instabilitat genòmica (instabilitat basada en la disfunció telomèrica), la qual podria generar malignitat. En estadis més avançats del tumor, es reinicia l'activitat telomerasa, la qual estabilitza els extrems dels cromosomes, limitant la instabilitat cromosòmica i permetent la supervivència cel·lular (Counter *et al.*, 1992).

Resumint, l'escurçament dels telòmers podria actuar com un factor dominant en la generació de canvis citogenètics, així els patrons cariotípics de diferents entitats tumorals reflecteixen la tendència de determinats cromosomes per iniciar els cicles de BFB. Al mateix temps, aquests cicles són la causa de l'elevada heterogeneïtat genètica intratumoral (Gisselsson *et al.*, 2000).

**Taula 3.** Selecció de gens implicats en la instabilitat cromosòmica

Símbol del gen	Nom del gen (en anglès)	Localització	Funció cel·lular i mecanisme de reparació	Ref.
<b>Defectes en la segregació cromosòmica</b>				
<i>AURKA</i>	Aurora Kinase A	20q13.2-q13.3	Implicat en la segregació cromosòmica.	(Zhu <i>et al.</i> , 2005)
<i>AURKB</i>	Aurora Kinase B	17p13.1	S'associa als microtúbuls durant la segregació cromosòmica.	(Ditchfield <i>et al.</i> , 2003)
<i>BUB1</i>	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolg	2q14	Funciona com a <i>checkpoint</i> del fus mitòtic.	(Musio <i>et al.</i> , 2003)
<i>BUB1B/BUBR1</i>	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolg beta	15q15	Funciona com a <i>checkpoint</i> del fus mitòtic.	(Shin <i>et al.</i> , 2003)
<i>KNTC1</i>	Kinetochores-associated 1	12q24.31	Assegura la segregació cromosòmica.	(Chan <i>et al.</i> , 2000)
<i>MAD2L1</i>	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast).	4q27	Prevé l'entrada en anafase si els cromosomes no s'han posicionat correctament en la placa metafàsica.	(Michel <i>et al.</i> , 2004)
<i>ZW10</i>	ZW10 homolog, centromere/kinetochore ( <i>Drosophila</i> )	11q23.2	Assegura la segregació cromosòmica.	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
<b>Defectes en la resposta al dany genòmic</b>				
<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia mutated	11q22-q23	<i>Checkpoints</i> de la família quinasa-PI3/PI4. Implicada en la senyalització de la reparació dels trencaments de doble cadena de DNA.	(Kurz & LeesMiller, 2004)
<i>ATR</i>	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	3q22-q24	Actua com a <i>checkpoint</i> del dany genòmic.	(Fang <i>et al.</i> , 2004)
<i>BLM</i>	Bloom syndrome	15q26.1	Presenta activitat helicasa.	(Davalos & Campisi, 2003)
<i>BRCA2 / BRCA1</i>	Breast cancer, early onset	13q12.3 17q21	Mutacions en aquests gens predisposen a un elevat risc de càncer hereditari de mama.	(Daniels <i>et al.</i> , 2004)
<i>FANCA-L</i>	Fanconi anemia, complementation group A-L		Implicats en la reparació de trencaments de doble cadena del DNA.	
<i>H2AX</i>	H2A histone family, member X	11q23.2-q23.3	Proteïna nuclear responsable de l'estructura del nucleosoma. Implicada en la senyalització dels trencaments de doble cadena de DNA.	(Celeste <i>et al.</i> , 2003)
<i>MRE11</i>	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A ( <i>S. cerevisiae</i> )	11q21	Proteïna nuclear implicada en la recombinació homòloga, longitud telomèrica i reparació dels trencaments de doble cadena de DNA.	(Carson <i>et al.</i> , 2003)
<i>NBN</i>	Nibrin	8q21	Implicada en la reparació dels trencaments de doble cadena de DNA.	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2004)
<i>POLB</i>	Polymerase (DNA directed), beta	8p11.2	Implicada en el sistema de reparació BER, requerit pel manteniment del DNA, replicació, recombinació i resistència a fàrmacs.	(Bergoglio <i>et al.</i> , 2002)

**Taula 3.** (Continuació taula anterior)

Símbol del gen	Nom del gen (en anglès)	Localització	Funció cel·lular i mecanisme de reparació	Ref.
<b>Disfuncions telomèriques</b>				
<i>PINX1</i>	PIN2-interacting protein 1	8p23	Inhibeix l'activitat telomerasa unint-se a hTERT.	(Banik & Counter, 2004)
<i>TERC</i>	Telomerase RNA component	3q26	Ribonucleoproteïna amb activitat polimerasa que manté la llargada dels telòmers mitjançant l'addició de les repeticions TTAGGG.	(Wong <i>et al.</i> , 2000)
<i>TERF1</i>	Telomeric repeat binding factor (NIMAinteracting) 1	8q13	Inhibeix l'activitat de la telomerasa.	(Kishi & Lu, 2002)
<b>Alteracions en el cicle cel·lular</b>				
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1	19q12	Subunitat reguladora de la CDK2. Activitat requerida per la transició de G1-S.	(Mazumder <i>et al.</i> , 2004)
<i>TP53</i>	Tumor protein 53 (LiFraumeni syndrome)	17p13.1	Regulació del cicle cel·lular. Activitat requerida per la transició de G0-G1.	(Baker <i>et al.</i> , 1990)

### 1.3. MANTENIMENT DE L'ESTABILITAT DEL GENOMA: INTERRELACIÓ ENTRE LA REPARACIÓ I ELS CHECKPOINTS DEL DANY GENÒMIC

#### 1.3.1. MECANISMES DE REPARACIÓ DEL DNA

Els sistemes de reparació del DNA els podem classificar en quatre grans grups, depenent de la lesió genòmica que hagin de reparar (revisat en Hoeijmakers, 2001). Els sistemes de reparació per excisió de nucleòtids (NER) i la reparació per excisió de bases (BER) reparen adductes del DNA que sovint poden ocasionar alteracions en la replicació i transcripció. Les lesions reparades per aquests dos processos afecten només a una cadena del DNA.

El sistema MMR repara errors en l'aparellament de bases del DNA (descriu anteriorment). Aquests tres sistemes utilitzen la cadena complementària com a motlle per la reparació.

Per altra banda, els sistemes de reparació dels trencaments de doble cadena són la recombinació homòloga i la unió d'extremes per reparació no homòloga. A continuació estendrem breument els sistemes de reparació dels trencaments de doble cadena, ja que tal i com s'ha comentat anteriorment, són origen d'alteracions cromosòmiques estructurals.

**RECOMBINACIÓ HOMÒLOGA** La recombinació homòloga pot reparar els DSBs utilitzant com a motlle la cromàtide germana que no ha estat danyada. La cèl·lula utilitza aquest sistema de reparació principalment per reparar els DSBs en la fase G2 del cicle cel·lular. En l'àpex del sistema de resposta al dany al DNA i la subsegüent reparació, cal destacar les proteïnes quinases amb activitat fosfoinositol-3-quinasa ATM (de l'anglès *ataxia telangiectasia mutated*), ATR (de l'anglès *ataxia mutated and Rad3-*



*related*) i també les DNA-PKcs (de l'anglès *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). Aquestes proteïnes fosforil·len l'histona H2AX, i la forma fosforil·lada de la histona ( $\gamma$ H2AX) actua com a senyal de reconeixement dels extrems lliures de les cadenes trencades, on s'hi uneix el complex MRN (MRE11/RAD50/NBS1). L'activació de l'acció nucleasa de MRE11 és imprescindible per l'activació de la proteïna ATM (Petrini & Stracker, 2003). A continuació, RAD51, RAD52 i RPA polimeritzen sobre la cadena senzilla i formen un filament de nucleoproteïnes, on també s'hi adhereixen BRCA1 i BRCA2, i altres proteïnes semblants a RAD51. Aquestes proteïnes promouen l'intercanvi de cadenes entre la cadena senzilla danyada i la doble cadena de DNA homòloga sana. En la formació d'aquest dúplex també hi estan involucrades RAD52 i RAD54. A continuació una polimerasa i una lligasa s'encarregaran de la síntesi del DNA que cobrirà el trencament.

A part de la fosforil·lació de la histona H2AX, ATM inicia una cascada de fosforilacions que afecten als substrats cABL, p53, NBS1, BRCA1, CHK2, i altres (Khanna & Jackson, 2001). Els defectes en la resposta cel·lular als trencaments de doble cadena del DNA poden aportar mutacions genètiques, amplificacions gèniques i reorganitzacions cromosòmiques, la qual cosa pot generar cèl·lules malignes. En general, ATM i ATR són dues proteïnes que estan molt implicades en la integritat del genoma. Quan ATM fosforil·la la proteïna p53, aquesta s'activa, s'estabilitza i perd la seva interacció amb MDM2 activant la transcripció de *P21/WAF1*. Alhora, quan MDM2 està fosforil·lada perd afinitat per p53, i facilita la seva ubiquïtinització i degradació. Així doncs, l'activació de p53 i la simultània atenuació de la funció inhibidora de MDM2 asseguren l'activitat de p53, la qual es basa principalment en la retenció del cicle cel·lular en la fase G1 per tal de donar temps a la cèl·lula perquè repari el dany genòmic. La proteïna BRCA1 també juga un paper important en la recombinació homòloga i en la reparació del DNA ja que serveix com a bastida pel posicionament d'ATM i ATR. BRCA1 també està implicada en l'arrest del cicle cel·lular en fase G1 i com a punt de control entre G2 i M. Les proteïnes CHK1 i CHK2 són quinases que estan fosforil·lades per ATM i ATR, que també poden fosforil·lar BRCA1 i CDC25A. Altres proteïnes implicades en aquesta xarxa de fosforil·lacions originades principalment per ATM i ATR són NBS1, SMC1 i FANCD2.

La relació directa entre la inestabilitat cromosòmica estructural i la resposta al dany genòmic encara no és del tot clara. Tot i això, hi ha alguns treballs que demostren que la haploinsuficiència cel·lular de determinats gens explicats anteriorment (*H2AX*, *MRE11* i *CHK1*) està associada a una major freqüència de reorganitzacions cromosòmiques (Bassing *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2003) També s'ha evidenciat que alteracions en *BRCA1* provoquen inestabilitat cromosòmica (Daniels *et al.*, 2004).

**UNIÓ D'EXTREMS PER REPARACIÓ NO HOMÒLOGA** A diferència de la recombinació homòloga, la unió d'extrems per reparació no homòloga (NHEJ, de l'anglès *non homologous end joining*) no utilitza l'homologia de la cromàtide germana per reparar els trencaments de doble cadena. Aquest sistema de reparació no només s'utilitza per reparar els DSBs generats per agents exògens, sinó també per reparar els DSBs originats com a intermediaris durant la recombinació dels gens de les immunoglobulines V(D)J (Karran, 2000). Generalment, el sistema NHEJ actua reparant els DSBs en fase G0 o G1 del cicle cel·lular. Les principals proteïnes involucrades en aquest sistema de reparació són el complex KU, que consisteix en un heterodímer format per Ku70/Ku86. Aquest complex identifica els extrems de DNA, s'hi adhereix i atrau la subunitat catalítica de la DNA-PK. Les dianes cel·lulars que aquesta proteïna fosforil·la són p53, el complex KU i ella mateixa. En aquest sistema de reparació també hi pren part el complex MRE11/RAD50/NBS1, el qual conté les activitats helicasa i exonucleasa. Una vegada aquest complex ha actuat sobre els extrems lliures del DNA, el complex lligasa IV i XRCC4 uneixen les cadenes de DNA.

### 1.3.2. CHECKPOINTS DEL DANY GENÒMIC

L'estabilitat del genoma és, principalment, cosa de dos. Per una banda, la cèl·lula controla la progressió de les diferents etapes del cicle cel·lular en funció de la integritat de genoma mitjançant els anomenats punts de control o *checkpoints* específics per cada fase del cicle cel·lular; i per altra banda, la idoneïtat dels mecanismes de reparació cel·lular per reparar les lesions ocasionades per agents exògens o endògens, permet la correcta transmissió del material genètic a les cèl·lules filles en cada divisió cel·lular. La interrelació entre aquests dos fenòmens permet que la cèl·lula quedi retinguda específicament en una fase del cicle cel·lular per donar temps suficient als sistemes de reparació per realitzar la seva tasca.

Al llarg de les diferents seccions d'aquest capítol ja s'han esmentat diferents factors que actuen com a punts de control del cicle cel·lular. En aquest apartat es comentarà breu i específicament els punts de control del dany genòmic que actuen al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular, obviant la resta de *checkpoints* que controlen la proliferació cel·lular a partir de senyals mitogèniques. La interconnexió entre els punts de control del dany genòmic i els que controlen la proliferació cel·lular ve donada per la proteïna ARF. O sigui, l'ARF connecta la via del retinoblastoma amb la de les proteïnes p53 i MDM2. Recentment, s'ha observat que la inactivació del retinoblastoma també produeix inestabilitat cromosòmica a través de defectes en E2F, la qual actua sobre MDM2 (Hernando *et al.*, 2004).

El fet més important que actua com a punt de control en el transcurs de G1-S és l'estabilització i activació de la proteïna p53, la qual al seu moment indueix la transcripció del gen *P21*, inhibidor del complex ciclina E-CDK2. Les senyals que regula p53 convergeixen en el trencament del complex p53 amb el seu regulador negatiu MDM2. ATM juga un paper clau en aquesta interrelació proteica. ATM fosforil·la ambdues proteïnes en residus aminoacídics específics provocant interferències en l'exportació nuclear del complex p53-MDM2. L'activació per fosforil·lació de la proteïna tirosina quinasa c-ABL per l'ATM també contribueix a l'estabilització de p53 fosforil·lant MDM2 (Goldberg *et al.*, 2002). Una de les altres proteïnes que intervé en aquesta regulació és CHK2. La forma fosforil·lada d'aquesta proteïna promou l'homodimerització amb una altra proteïna CHK2. Aquesta homodimerització facilita la *trans*-fosforil·lació del domini quinasa, la qual cosa és imprescindible per l'activació completa de CHK2. La seva funció està mitjançada per p53 i intervé en la detenció de la fase G1 en presència de dany genòmic (Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002).

Els punts de control en la fase S centren el punt de mira en dos processos, la replicació i la reparació del DNA (Falck *et al.*, 2002). La forma activa de CHK1 i CHK2 fosforil·len la proteïna fosfatasa CDC25A que activa la proteïna CDK2 per defosforil·lació, la qual és imprescindible per la síntesi del DNA. Per altra banda, l'activació del complex MRE11/RAD50/NBS1 actua sobre molts punts de control específics de fase S, per exemple sobre les proteïnes SMC1 i SMC3, "cohesines" que formen un complex per mantenir la cohesió de les cromàtides germanes.

La inhibició de la fosfatasa promotora de la mitosi CDC25C és el punt de control més important en la fase G2. CHK1 fosforil·la CDC25C evitant que aquesta activi el complex ciclina B-CDC2, i bloquejant així l'entrada a la fase M de les cèl·lules amb dany genòmic. L'activació de CHK1 la porta a terme la proteïna ATR (Brown & Baltimore, 2003). La proteïna 53BP1 és un mediador important en la senyalització del dany genòmic i alhora també juga un paper important en la detenció del cicle cel·lular com a resposta a punts de control en la fase S o G2. La proteïna 53BP1 s'uneix a p53, CHK2 i BRCA1, i regula la fosforil·lació de CHK2, SMC1 i BRCA1 en els llocs on s'han produït trencaments de doble cadena per efecte de l'exposició a radiacions ionitzants (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002).

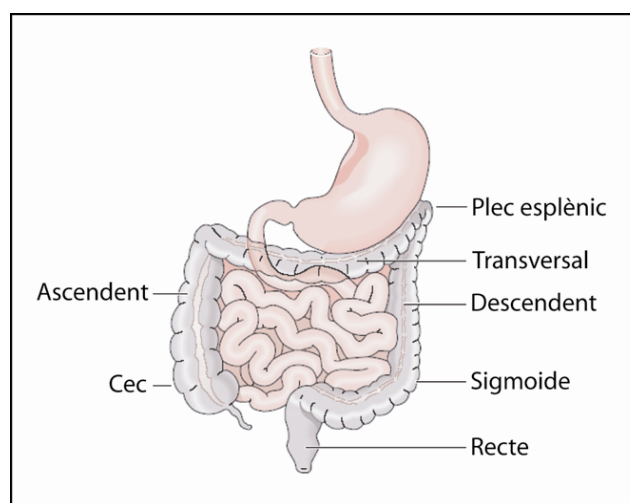
En la mitosi, els principals punts de control estan subjectes al correcte funcionament de les proteïnes del fus mitòtic i a la conseqüent segregació cromosòmica (veure apartat 1.2.2.2 i Taula 3).

## 1.4. MODEL DEL CÀNCER DE CÒLON

Com molts altres tipus de càncers, el càncer de còlon és una malaltia multifactorial. La dieta, el tipus de vida, l'edat (Boyle & Leon, 2002) i la predisposició genètica són causes conegudes que poden afectar al desenvolupament d'aquest tipus de càncer. Aproximadament el 50% de la població occidental desenvolupa un adenoma a l'edat de 70 anys. S'estima que un 12% i un 11% de nous casos de càncer de còlon i recte apareixen cada any en dones i homes, respectivament (Jemal *et al.*, 2002). L'edat mitja del diagnòstic del càncer de còlon és al voltant dels 67 anys, tot i que la incidència varia substancialment entre les edats de 50 i 80 anys. Tot i així, menys d'un 10% dels càncers de còlon i recte apareixen en edats inferiors als 40 anys. Aproximadament un 5% de la població occidental pateix càncer de còlon i recte, i sol ser més freqüent en dones que en homes.

### 1.4.1. ANATOMIA I HISTOLOGIA DEL CÒLON

L'intestí gros es divideix en quatre seccions: el cec i còlon ascendent, el transversal, el descendent i el sigmoide. Les dues primeres seccions formen el còlon proximal o dret, mentre que les dues últimes formen el còlon distal o esquerre (Figura 4). El còlon proximal i el distal tenen orígens embriològics i característiques biològiques diferents. El cec, el còlon ascendent i dues terceres parts del còlon transversal deriven de l'intestí mig, mentre que la part del còlon des del plec esplènic fins a la part superior del canal anal deriva de l'intestí posterior. Els diferents orígens embriològics dels diferents segments també es veuen reflectits en una dualitat en l'irrigació sanguínia, així l'artèria mesentèrica superior i la inferior irriguen el còlon proximal i distal, respectivament.



**Figura 4.** Anatomia de l'intestí gros.

El càncer de còlon deriva de la capa mucosa de la paret de l'intestí gros. De l'interior cap a l'exterior, la paret de l'intestí està composta per diferents capes, incloent la mucosa, la submucosa, la *muscularis propria* (que conté musculatura llisa) i la serosa. La capa més interna, la mucosa, és una monocapa de cèl·lules epitelials les quals s'estan dividint contínuament per tal de regenerar les cèl·lules que estan exposades al lumen de l'intestí gros. Aquest procés de reciclatge s'inicia a les cèl·lules que formen les criptes de Lieberkühn, les quals són les que pateixen els primers canvis genètics que poden conduir al càncer.

#### 1.4.2. CLASSIFICACIÓ I ESTADIATGE DEL CÀNCER DE CÒLON I RECTE

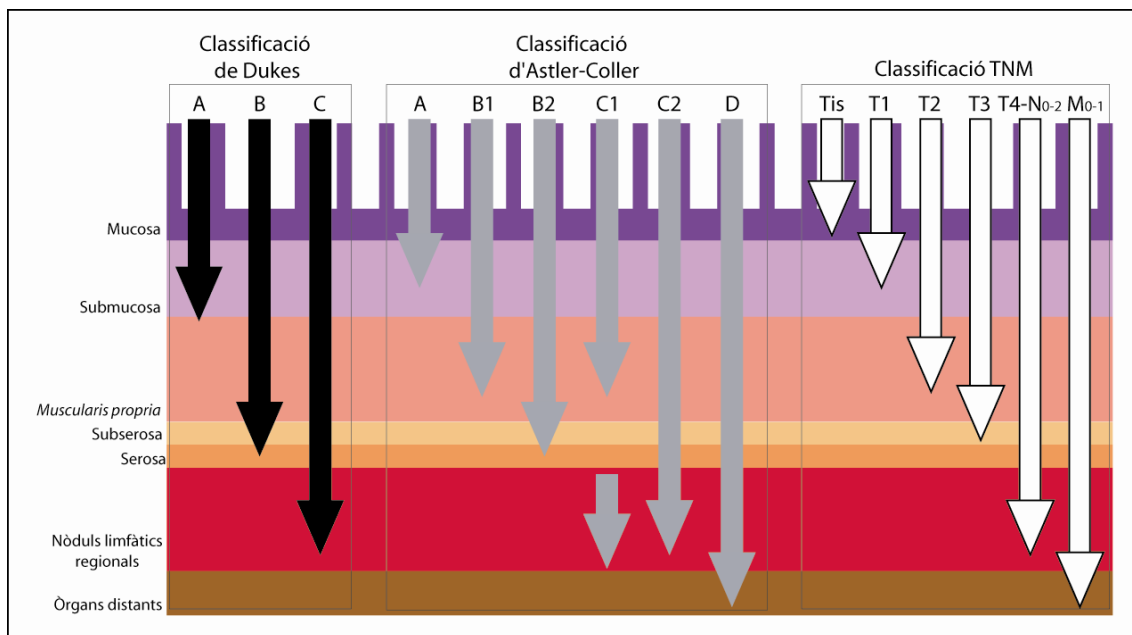
L'evolució clínica i els estadis del tumor es defineixen en funció del seu grau de desenvolupament, penetració a través de l'intestí gros i grau de disseminació (Figura 5).

La classificació de Dukes és la classificació original dels càncers de còlon i recte (Dukes, 1932). Es basa en l'extensió que ocupa el tumor primari a través de les diverses capes de l'intestí gros i afectació a òrgans veïns. Posteriorment es va desenvolupar la classificació d'Astler-Coller (Astler & Coller, 1954), la qual diferencia la carcinogènesi del càncer de còlon i recte en 6 grups. A continuació es defineixen els estadis de Dukes i Astler-Coller simultàniament donat el seu solapament en la nomenclatura:

- Dukes A: El tumor està confinat a la paret de l'intestí gros, mucosa i submucosa, sense penetrar en la capa *muscularis propria* (equivalent a l'estadi A i B<sub>1</sub> segons la classificació d'Astler-Coller).
- Dukes B: El tumor ha penetrat a la paret muscular, arriba a la capa serosa, tot i no afectar als nòduls limfàtics (equivalent a l'estadi B<sub>2</sub> segons la classificació d'Astler-Coller).
- Dukes C: El tumor ha metastatitzat als nòduls limfàtics regionals (equivalent a l'estadi C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> segons la classificació d'Astler-Coller).
- La classificació d'Astler-Coller defineix l'estadi D per incloure els tumors que han disseminat a òrgans distants (ex: fetge).

Més recentment, es va definir una tercera classificació per tal d'evitar confusions en les dues classificacions anteriors (Hutter & Sobin, 1986). El sistema de classificació TNM defineix millor la complexitat del desenvolupament del tumor i escapa de la visió reduccionista de la classificació de Dukes i d'Astler-Coller. Les sigles T, N i M, es refereixen a l'extensió del tumor a través de les capes del còlon (Tis-T4), l'absència o

presència de metàstasi a un o més nòduls limfàtics (N0-N2), i l'absència o presència de metàstasi a òrgans distants (M0-M1).



**Figura 5.** Esquema comparatiu dels diferents sistemes de classificació dels tumors de còlon i recte. En la classificació TNM només s'han indicat els subgrups de tumors caracteritzats per la sigla T, ja que són els que afecten les parets del còlon. Els tumors classificats com N1 i N2 impliquen la detecció de cèl·lules tumorals en 1-3 i 4 o més nòduls limfàtics, respectivament. Per altra banda, els tumors classificats dintre el grup M0 i M1 impliquen l'absència i la presència de metàstasi allunyada del punt originari del tumor primari.

### 1.4.3. PREDISPOSICIÓ I SUSCEPTIBILITAT AL CÀNCER COLORECTAL I MALALTIES ASSOCIADES

La major part dels càncers de còlon, entre un 65-95%, són considerats esporàdics, desenvolupant-se per l'acumulació d'alteracions genètiques al llarg de la vida. Aproximadament, el 10% dels càncers de còlon s'hereten, o sigui, una mutació en el DNA passa d'una generació a una altra. A més a més, existeix un conjunt de síndromes íntimament associades a mutacions en determinats gens que predisposen a l'aparició de tumors benignes i malignes. Aquests representen entre un 2-6% del total de càncers de còlon i recte. Majoritàriament presenten un patró d'herència mendeliana dominant i es subdivideixen segons si són poliposos o no. La síndrome no poliposa més important és la HNPCC (de l'anglès *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) i les seves variants, mentre que la síndrome familiar poliposa més freqüent és la poliposi adenomatosa familiar (FAP, de l'anglès *familial adenomatous polyposis*).

Existeix una sèrie de síndromes poliposes més rares amb pòlips hamartomatosos que són la poliposi juvenil, la síndrome de Peutz-Jeghers, i la síndrome de Cowden. En la Taula 4 hi ha un llistat de les síndromes més freqüents que predisposen al càncer de còlon.

**Taula 4.** Resum de les principals síndromes hereditàries que predisposen al càncer de còlon

Síndrome	Incidència	Gen	Localització	Funció
FAP	1/810.000 (<1%)	<i>APC</i>	5q21-q22	Inhibició de la via de senyalització WNT
HNPCC	1/1000 (2-6%)	<i>MLH1</i>	3p21.3	Errors en l'aparellament de bases de DNA
		<i>MSH2</i>	2p21	Errors en l'aparellament de bases de DNA
		<i>MSH6</i>	2p16	Errors en l'aparellament de bases de DNA
		<i>PMS2</i>	7p22.2	Errors en l'aparellament de bases de DNA
MAP	n.d. (0,4- 1,3%)	<i>MUTYH</i>	1p34.3- p32.1	Reparació per excisió de bases
Síndrome de Peutz-Jeghers	1/200.000	<i>STK11</i>	19p13.3	Activitat serina-treonina quinasa
Poliposi juvenil	1/100.000	<i>SMAD4</i>	18q21.1	Via de senyalització del TGF- $\beta$
		<i>BMPR1A</i>	10q22.3	Via de senyalització del TGF- $\beta$ i del BMP
Síndrome de Cowden	1/300.000	<i>PTEN</i>	10q23.3	Inhibició de la via de senyalització AKT

n.d., no determinat

**FAP** La síndrome poliposi adenomatosa familiar representa menys d'un 1% dels càncers colorectals. Presenta un patró d'herència dominant causada per mutacions germinals del gen *APC*. La penetrància d'aquesta síndrome és quasi del 100%. Histològicament, s'observen centenars de pòlips adenomatosos al recte, còlon i tracte gastrointestinal superior. Sense intervenció quirúrgica, algun d'aquests pacients desenvoluparà un càncer de còlon al voltant dels 40 anys. El coneixement detallat de la relació genotip-fenotip de la síndrome FAP ha contribuït a què l'anàlisi molecular de les mutacions sigui una eina complementària a les colonoscòpies alhora de realitzar un diagnòstic. Detalls de les mutacions en el gen *APC* es descriuen en el següent punt 1.4.4.

**HNPCC** La síndrome HNPCC representa entre el 2-6% de tots els càncers de còlon i recte. La mitjana d'edat en què es desenvolupa és als 44 anys, i la progressió d'adenoma a carcinoma pot ser ràpida. Acostumen també a desenvolupar tumors a l'endometri, a l'estómac i als ovaris. Aproximadament el 90% d'aquests càncers presenten mutacions en els gens de reparació dels desaparellaments del DNA (gens MMR) i, conseqüentment presenten inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) (Aaltonen *et al.*, 1994). Els gens afectats són *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* i *MSH6*. Entre aquests, els més representats són *MLH1* (Bronner *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994) i *MSH2* (Fishel *et al.*, 1993), els quals s'han trobat mutats en la línia germinal en un 55% i en

un 40% de famílies amb HNPCC, respectivament. La inactivació dels gens MMR implica l'herència d'una primera mutació en un al·lel, mentre que el segon al·lel patirà una mutació somàtica al llarg del temps. Aquest segon canvi pot ser una deleció somàtica per un procés de LOH (detectat en un 30 i 10% dels gens *MLH1* i *MSH2*, respectivament), una mutació puntual (rarament en portadors de mutacions en *MLH1*) (Yuen *et al.*, 2002) o pot donar-se una inactivació del gen per una hipermetilació del promotor (detectada en un 46% dels portadors de mutacions en *MLH1*). Aquests tipus de càncers són poc diferenciats, estan localitzats al còlon proximal i presenten infiltració limfocítica peritumoral. La metàstasi és un procés poc freqüent en aquest tipus de tumors i acostumen a respondre favorablement a la quimioteràpia adjuvant (Elsaleh *et al.*, 2000).

**MAP (*MYH-associated polyposis*)** La poliposi associada al gen *MYH* (MAP) presenta un patró d'herència recessiu. El gen *MYH* és una glicosilasa del DNA implicada en la reparació per excisió de bases (BER) en resposta al dany oxidatiu sobre el DNA. Les mutacions en el gen *MYH* estan associades a una major predisposició al càncer de còlon i a l'aparició d'adenomes en el tracte gastrointestinal. Els pòlips d'aquests pacients presenten mutacions poc freqüents en el gen *APC*. El fenotip de la síndrome MAP és semblant al que pateixen els pacients amb fenotips lleus o moderats amb les mutacions clàssiques a *APC*. Aquest tipus de tumors presenten un cariotip quasi-diploide i estabilitat de microsatèl·lits.

**POLIPOSI HAMARTOMATOSES** Els pòlips hamartomatosos apareixen en quatre síndromes hereditàries: Síndrome de Peutz-Jeghers, poliposi juvenil, síndrome de Cowden i síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley. Tot i que la freqüència d'aquestes síndromes en la població és baixa, tant la síndrome de Peutz-Jeghers com la poliposi juvenil estan fortament associades amb el càncer de còlon. Actualment, es coneixen els gens implicats en aquestes síndromes (Taula 4). Tot i així, aquests gens també els podem trobar implicats en el càncer de còlon esporàdic, per la qual cosa aquests gens estarien en un grup intermedi entre els gens d'alta i els gens de baixa penetrància. Aproximadament el 50% de les síndromes Peutz-Jeghers estan causades per mutacions en el gen *LKB1*. Quasi el 50% de les poliposis juvenils estan causades per mutacions en els gens *SMAD4* i *BMPR1A*. Ambdós gens codifiquen per proteïnes implicades en la via de senyalització de TGF- $\beta$ .

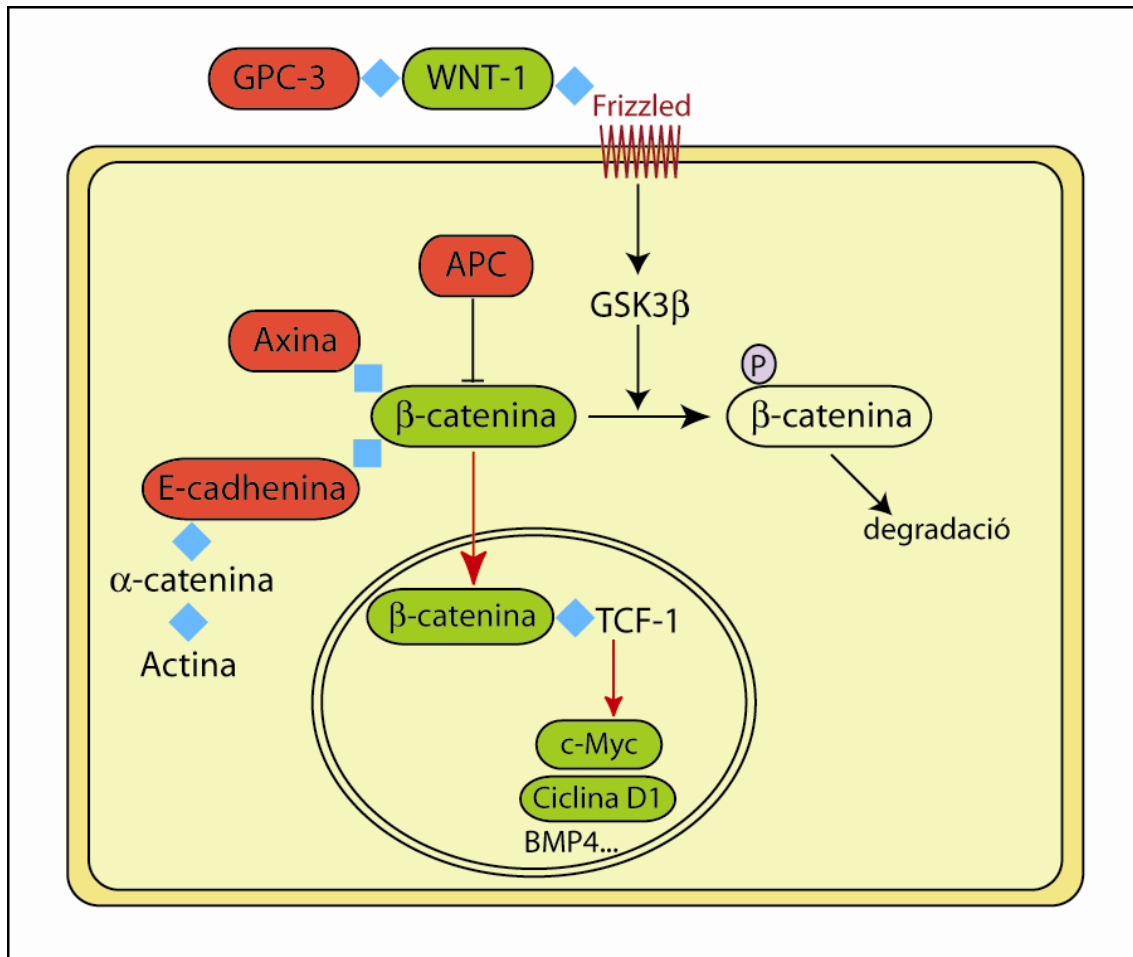


#### 1.4.4. GENS IMPLICATS EN LA CARCINOGENÈSI COLORECTAL

**APC i CTNNB1** El gen *APC* està format per 15 exons i codifica una proteïna de 310 kDa que posseeix múltiples dominis funcionals els quals s'uneixen a una gran varietat de proteïnes intracel·lulars, entre les quals destacaríem la  $\beta$ -catenina, la  $\gamma$ -catenina, la glicogen sintasa quinasa-3 $\beta$ , l'axina, la tubulina, EB1 i hDLG (Kinzler & Vogelstein, 1996). Les mutacions germinals en el gen *APC* han estat identificades en la síndrome FAP i les seves variants. El gen *APC* està localitzat a la banda cromosòmica 5q21. S'ha demostrat que quasi un 30% dels adenomes i carcinomes esporàdics de còlon presenten pèrdues d'heterozigositat en aquesta banda, essent el gen *APC* la principal diana d'aquestes pèrdues, per la qual cosa es va postular que era un gen supressor de tumors. El mecanisme pel qual es perd la funcionalitat del gen segueix el model d'inactivació bial·lèlica originalment proposat per Knudson. Estudis posteriors han demostrat que el gen *APC* està mutat en un 70% de tots els càncers de còlon esporàdics. Majoritàriament, les mutacions en *APC* en càncers de còlon esporàdics tenen lloc a l'extrem 5' de l'exó 15, i més d'un 90% de les mutacions originen un codó d'acabament prematur, provocant un truncament de la proteïna. S'han identificat altres mutacions associades a la síndrome FAP i les seves variants. Aquesta xifra tan elevada suggereix que la mutació en aquest gen és un fenomen primerenc en la carcinogènesi colorectal. Existeixen estudis que indiquen la presència de mutacions d'aquest gen en cèl·lules displàsiques de les criptes de Lieberhühn, a pesar que no hi ha dades definitives per indicar si les alteracions tindrien lloc en les cèl·lules mare de la base de la cripta amb una posterior expansió clonal (Calabrese *et al.*, 2004) o bé les mutacions tindrien lloc en les cèl·lules de les parets de la cripta podent-se desplaçar en direcció a la base de la cripta (Shih *et al.*, 2001a).

Les mutacions en *APC* provoquen una activació dels components de la via de senyalització WNT (Figura 6). La principal diana afectada per la mutació en *APC* és el gen de la  $\beta$ -catenina. Mutacions en el gen de l'*APC* impedeixen que la proteïna s'associï a la  $\beta$ -catenina. Normalment, l'*APC* s'associa amb la GSK3- $\beta$  i aquest complex fosforila la  $\beta$ -catenina entre altres proteïnes. La  $\beta$ -catenina fosforilada és posteriorment ubiquitinada i degradada per un complex proteosomal. Quan el gen *APC* està mutat, la GSK3- $\beta$  no fosforila la  $\beta$ -catenina, i aquesta s'acumula al citoplasma. La  $\beta$ -catenina es transloca a l'interior del nucli i interacciona amb factors de transcripció de la família TCF/Lef els quals activen la transcripció de gens que promouen la proliferació cel·lular com *CCND1*, *C-MYC*, *C-JUN*, *FRA1*, entre altres (He *et al.*, 1998; Shtutman *et al.*, 1999). Per altra banda, s'han descrit mutacions de canvi de sentit (*missense mutations*) en el gen de la  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), majoritàriament en l'exó

3, el qual conté una seqüència consens que codifica per un aminoàcid aspàrtic altament conservat que és la diana de fosforilació per part de la GSK3- $\beta$ . La incidència de mutacions en el gen *CTNNB1* és superior en adenomes benignes que en carcinomes invasius, la qual cosa suggereix que mutacions en aquest gen desafavoreixen la progressió tumoral (Samowitz *et al.*, 1999).



**Figura 6.** Diagrama de la via de senyalització cel·lular de WNT. Els cercles vermells indiquen gens supressors de tumors o productes gènics amb activitat supressora, mentre que els cercles verds indiquen oncògens o productes gènics amb acció oncogènica.

**K-RAS** Localitzat a 12p12.1, *K-RAS* representa el proto-oncogen de la família de gens *RAS* que apareix més freqüentment mutat en el càncer de còlon. La família de gens *RAS* codifiquen per un conjunt de proteïnes de 21 KDa, altament conservades i implicades en la transducció de senyals cel·lulars, especialment importants en la via de les MAP quinases, les quals són responsables de l'expressió de gens de resposta ràpida. El gen *K-RAS* està format per 4 exons i la longitud del pèptid que codifica varia segons les posicions de tall i unió (*splicing*). En general, la proteïna presenta tres

dominis que (i) s'uneixen a GTP o GDP, (ii) s'uneixen a la cara interna de la membrana plasmàtica i (iii) interaccionen amb dianes cel·lulars. La proteïna K-RAS inactiva està unida a una molècula de GDP. Quan K-RAS s'activa, es produeix un intercanvi entre el GDP i una molècula de GTP. La forma activa de la proteïna K-RAS interacciona amb molècules de senyalització cel·lular les quals promouen la proliferació. El funcionament normal de l'activitat proteica implica una hidròlisi intrínseca del GTP (activitat GTPasa), la qual ajuda a recuperar l'estat inactiu de la proteïna. L'activitat oncogènica de la proteïna està provocada per la disfunció de l'activitat GTPasa, situació que permet que K-RAS es mantingui en estat actiu permanentment.

Les mutacions de *K-RAS* més freqüents en el càncer de còlon i en altres càncers afecten als codons 12, 13 i 61. Entre ells, el codó 12 és el que es veu més afectat per mutacions de canvi de sentit (*missense mutations*). S'han detectat mutacions en un 37-41% dels carcinomes colorectals i s'ha observat que les mutacions en *K-RAS* tenen lloc en etapes primerenques del desenvolupament del tumor (Bos *et al.*, 1987).

**TP53** El gen *TP53* és un gen supressor de tumors localitzat a 17p13.1, i apareix mutat en més d'un 50% dels càncers humans, incloent els càncers del tracte gastrointestinal. Les mutacions en la línia germinal del gen *TP53* donen lloc a la síndrome de Li-Fraumeni, la qual es caracteritza per presentar varis tipus de tumors (Li *et al.*, 1988; Malkin *et al.*, 1990). El gen *TP53* codifica per una proteïna multifuncional que interacciona amb molts components cel·lulars i està implicada en el manteniment de l'estabilitat de genoma mitjançant la regulació de la progressió del cicle cel·lular i el control de l'apoptosi en resposta al dany genòmic i processos d'estrès. La proteïna p53 presenta quatre dominis: (i) transcripcional, (ii) domini d'unió al DNA, (iii) domini de tetramerització i (iv) domini regulador. En el cas particular del càncer de còlon, s'ha vist que *TP53* està mutat en un 50-70% dels carcinomes colorectals. Les mutacions es localitzen preferentment en els exons 5-8 del gen i acostumen a ser mutacions de canvi de sentit que afecten al domini d'unió al DNA. Generalment, la mutació d'un al·lel va acompanyada de la pèrdua de l'altre al·lel per una deleció, la qual cosa justifica l'acció supressora del gen. Les mutacions de *TP53* no són massa freqüents en adenomes, la qual cosa suggereix que la pèrdua funcional de p53 podria estar implicada en la transició d'adenoma a carcinoma.

En una cèl·lula normal, els nivells d'expressió de p53 són baixos, en part gràcies a la inactivació per part de MDM2. Situacions d'estrès o dany en el DNA (per exemple, radiacions gamma, ultraviolades, agents quimioteràpics o hipòxia) activen la seva expressió per mecanismes que encara actualment són parcialment desconeguts. Dues de les proteïnes que activen la p53 són ATM i CHK2, les quals fosforil·len el complex

p53-MDM2 que es dissocia i p53 queda activada. L'activació de p53 promou la transcripció de gens que regulen la proliferació cel·lular (*CDKN1A*, *GADD45*) i l'apoptosi (*BAX*, *GTSE-1*). L'expressió d'aquests gens bloqueja la replicació, atura la divisió cel·lular en fase G1 i activa els mecanismes de reparació del DNA.

Resumint, la proteïna p53 es coneix com “el guardià del genoma” per la seva activitat de bloqueig del cycle cel·lular i activació dels mecanismes de reparació o apoptosi en resposta al dany cel·lular.

### **GENS DE REPARACIÓ D'ERRORS D'APARELLAMENT DE BASES DEL DNA**

El sistema de reparació de desaparellaments del DNA consisteix en un conjunt de gens (gens MMR, de l'anglès *mismatch repair genes*) que codifiquen per proteïnes que corregeixen els errors d'aparellament de bases durant el procés de replicació (Taula 5). La inactivació d'aquesta maquinària cel·lular per mutacions germinals en aquests gens és una característica de la síndrome HNPCC i condueix a la inestabilitat de microsatèl·lits. La inactivació somàtica d'aquests gens dóna lloc a aproximadament un 15% de càncers de còlon esporàdics. S'han trobat alteracions en almenys sis gens que codifiquen per proteïnes implicades en la reparació de desaparellaments del DNA. Aquests gens inclouen *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* i *PMS2*. Les mutacions que tenen lloc en aquests gens són mutacions puntuals. El fet que les mutacions siguin extenses a qualsevol punt del gen dificulta l'aplicació d'assajos clínics per detectar mutacions germinals. Només en el cas del gen *MLH1*, les mutacions es localitzen preferentment en els exons 15 i 16. El mecanisme predominant per dur a terme la inactivació somàtica del gen *MLH1* és la hipermetilació d'illes CpG del seu promotor (Kane *et al.*, 1997; Veigl *et al.*, 1998), la qual cosa comporta un “silenciament” o inhibició de la transcripció i es dóna aproximadament en un 78% dels càncers de còlon esporàdics amb MSI.

**Taula 5.** Resum dels gens MMR i efecte que produeixen sobre llevats i mamífers

Gen	Localització cromosòmica	Efecte en llevat	Càncers en ratolins KO	Càncers en humans
<i>MLH1</i>	3p21.3	++	Limfomes de cèl·lules T, gastrointestinal	Còlon i recte
<i>MSH2</i>	2p21	++	Limfomes de cèl·lules T, gastrointestinal, pell	Còlon i recte, glàndules sebàcies
<i>PMS2</i>	7p22.2	++	Limfomes, sarcomes	Còlon i recte
<i>MSH6</i>	2p21	+	Limfomes, gastrointestinal, úter, pell	Còlon i recte, endometri
<i>MLH3</i>	14q24.3	+	n.d.	Còlon i recte ?
<i>EXO1</i>	1q42-q43	+	Limfomes	Còlon i recte ?
<i>MSH3</i>	5q11-q12	+	Gastrointestinal	n.d.
<i>PMS1</i>	2q31-q33	n.d.	n.d.	n.d.

Taula modificada de (Peltomaki, 2001); ++, Inestabilitat de microsatèl·lits severa; +, Inestabilitat de microsatèl·lits lleu; n.d., no determinat

**TGF $\beta$ RII** El factor de creixement transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) és una citoquina multifuncional capaç d'induir el creixement cel·lular, l'apoptosi i la diferenciació de les cèl·lules epitelials de l'intestí (Markowitz & Roberts, 1996). L'efecte cel·lular del TGF- $\beta$  està mediat per un receptor proteic heteromèric compost per dos components, el RI i el RII. Aquests dos components són quinases serina-treonina que quan hi interacciona el TGF- $\beta$  activen una cascada de senyalització mitjançant la fosforil·lació de les proteïnes MAD (Massague, 1996). Les proteïnes SMAD2, SMAD3 i SMAD4 formen un complex heterooligomèric que es transloca al nucli i actua com a modulador de la transcripció gènica (Chung, 2000) i de l'expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular. Alguns dels gens que estan clarament regulats per TGF- $\beta$  són *CCND1*, *CDK4*, *P21* i *RB* (Geng & Weinberg, 1993). Les primeres evidències de la relació entre el TGF- $\beta$  i el càncer de còlon, es van originar al comprovar que hi havia algunes línies cel·lulars que eren resistents als efectes inhibidors del creixement cel·lular que provoca la via de senyalització de TGF- $\beta$  (Hoosein *et al.*, 1989). És per aquesta raó que aquesta via està considerada com una via supressora de tumors.

Un dels mecanismes més comuns per adquirir resistència al TGF- $\beta$  en el càncer de còlon és mitjançant mutacions en el gen *TGF $\beta$ RII*. Aquestes mutacions es van observar preferentment en tumors de còlon que presentaven inestabilitat de microsatèl·lits (Markowitz *et al.*, 1995). El gen *TGF $\beta$ RII* presenta una seqüència de microsatèl·lits en l'exó 3, que consisteix en repeticions d'adenines al llarg de 10 parells de bases, la qual cosa la fa susceptible a mutacions de desaparellament en cèl·lules que presentin inactivació en els gens MMR. Com a resultat d'insercions o delecions d'una o dues adenines, la proteïna truncada perd el domini transmembrana i el domini quinasa. En estudis realitzats en tumors MSI, s'ha vist que un 90% dels casos presenten mutacions en ambdós al·lels del gen *TGF $\beta$ RII* (Parsons *et al.*, 1995), mentre que la incidència d'aquesta mutació en el total dels tumors de còlon es redueix al 30% (Grady *et al.*, 1999).

**SMAD2 i SMAD4** Aquests dos gens són els gens diana de la pèrdua heterozigòtica del cromosoma 18q. Tal i com s'ha comentat en l'apartat anterior, els seus productes proteics són mediadors intracel·lulars de la via de senyalització TGF- $\beta$ . El receptor tipus I del TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RI) recluta les proteïnes SMAD2 i SMAD3, i les activa per fosforil·lació en un residu de serina. Una vegada aquestes estan activades, interaccionen amb la proteïna SMAD4, i tot el complex sencer transloca dintre al nucli. Les dianes del complex SMAD són moltes i quasi totes estan implicades en la carcinogènesi (Siegel & Massague, 2003). La inactivació d'aquests gens per mutació

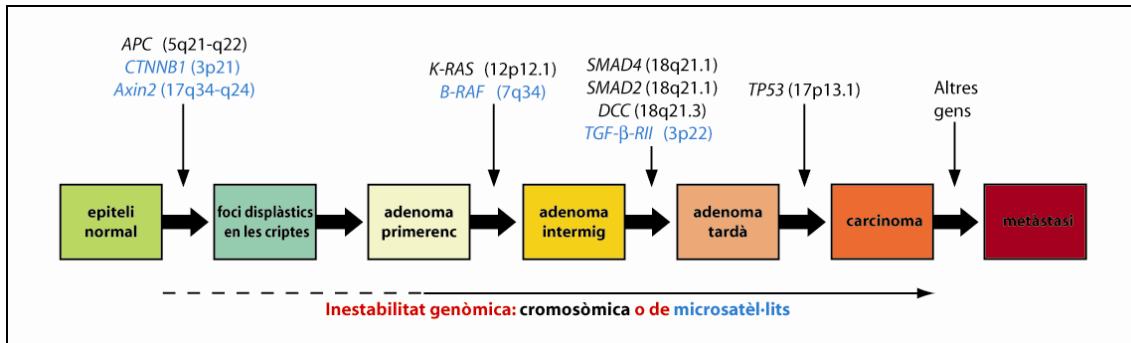
és molt elevada en càncer de pàncrees i és d'un 5-10% en càncer de còlon. Si aquesta inactivació juga un paper important en la progressió tumoral o si podria estar implicada en les primeres etapes del desenvolupament del tumor, representa un interrogant encara per elucidar.

**GENS DE BAIXA PENETRÀNCIA** Els gens descrits fins ara estan fortament associats a síndromes que predisposen al càncer de còlon. Són gens d'alta penetrància que sovint presenten un patró d'herència dominant. De totes maneres, existeixen polimorfismes o combinacions de diferents al·lells polimòrfics en gens de baixa penetrància que, juntament amb factors ambientals, condueixen al desenvolupament del càncer de còlon. Per exemple, polimorfismes en el gen *APC* (ex: I1307K) (Laken *et al.*, 1997) incrementen el risc de càncer de còlon, tot i causar una poliposi atípica. Mutacions en el gen *CDH1* (*cadherin 1*) també s'han associat a un increment del risc de càncer colorectal i d'estómac. Altres gens de baixa penetrància associats a una predisposició al càncer de còlon són: *TGF $\beta$ RI* (Pasche *et al.*, 2004), *PLA2G2A* (Cormier *et al.*, 1997), *COX-2* (Kargman *et al.*, 1995) i gens implicats en el metabolisme d'agents carcinògens (*MTHFR*, *NAT1* i *NAT2*, *GSTM1* i *GSTT1*) (revisat en Houlston & Tomlinson, 2001). En alguns estudis en germans bessons s'ha suggerit que el 35% dels casos de càncer de còlon presenten factors de predisposició hereditària (Kemp *et al.*, 2004). La predisposició genètica al càncer de còlon, que explicaria aquest tan per cent tant elevat, sembla estar associada a polimorfismes en al·lells de baixa penetrància.

#### 1.4.5. MODEL D'EVOLUCIÓ D'ADENOMA A CARCINOMA

Aproximadament un 40% de la població occidental desenvoluparà al llarg de la seva vida un adenoma de còlon (DiSario *et al.*, 1991; Rex *et al.*, 1991), però només una proporció més petita desenvoluparà càncer. El càncer té una naturalesa genètica i s'origina per l'acumulació de mutacions en la seqüència del DNA. En el cas particular del càncer de còlon, les mutacions genètiques tenen lloc en les cèl·lules epitelials que formen la mucosa de l'intestí gros al llarg de la vida de la persona. Una vegada la cèl·lula acumula un nombre llindar de mutacions (entre 5 i 10), el càncer es comença a desenvolupar. Actualment, el model més acceptat de desenvolupament del càncer de còlon és el proposat per Fearon i Vogelstein a principis dels anys 90 (Fearon & Vogelstein, 1990) (Figura 7). Aquesta via de progressió tumoral s'anomena també ruta supressora degut a l'elevada freqüència de deleccions cromosòmiques i a l'elevat nombre de gens supressors de tumors inactivats. La progressió tumoral del càncer de

còlon implica un creixement de la mida de l'adenoma i l'adquisició de característiques displàsiques del pòlip. Un carcinoma es caracteritza per la invasió a altres capes de la paret de l'intestí i per la disseminació de cèl·lules tumorals a òrgans distants o metàstasis.



**Figura 7.** Correlació entre la progressió del càncer de còlon i recte, i l'acumulació de mutacions genètiques segons l'adaptació del model de Fearon i Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990) i Kinzler i Vogelstein (Kinzler & Vogelstein, 1996). Les alteracions genètiques freqüentment trobades en tumors amb inestabilitat cromosòmica estan il·lustrades en negre, mentre que les que estan freqüentment associades a tumors amb inestabilitat de microsatèl·lits estan il·lustrades en blau.

Les mutacions en *APC* es troben amb freqüències semblants en adenomes i carcinomes (Vogelstein *et al.*, 1988), la qual cosa indica que aquest canvi és un pas primerenc en el desenvolupament de l'epíteli normal a teixit premaligne. El producte proteic del gen supressor de tumors *APC* interacciona amb un elevat nombre de proteïnes, incloent la  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), la glicogen sintasa quinasa (*GSK-3 $\beta$* ), EB-1, axina, tubulina i hDLG (Kinzler & Vogelstein, 1996). L'*APC* inactiva és incapaç de degradar la  $\beta$ -catenina la qual entra al nucli i promou la transcripció de gens com el *C-MYC*, *CCND1*, *MMP7* i *GAS* (Wong & Pignatelli, 2002). La següent mutació que s'estima que té lloc és la mutació de *K-RAS*. Quan aquest proto-oncogen està mutat manté la seva forma activa i, tal i com s'ha explicat anteriorment, és capaç de fosforil·lar els components de la cascada de RAS (RAF, MEK, MAPK i ERK), els quals incrementaran la transcripció gènica afavorint així la proliferació cel·lular. Les pèrdues d'heterozigositat en els braços cromosòmics 17p i 18q són esdeveniments primerencs en la carcinogènesi colorectal, i estan directament relacionats amb la pèrdua de gens supressors de tumors. Concretament, el gen diana en la pèrdua de 17p és *TP53*, el qual representa el gen més mutat en càncers humans (Greenblatt *et al.*, 1994), i ha estat àmpliament desenvolupat en apartats anteriors. Per altra banda, s'han descrit pèrdues d'heterozigositat en la regió cromosòmica 18q en un 70% dels adenocarcinomes colorectals. La incidència d'aquesta deleció és més elevada en

etapes tardanes que en etapes primerenques del desenvolupament del tumor. Aquesta pèrdua compartida per diferents tumors de còlon és indicativa de la presència de gens supressors de tumors importants per la carcinogènesi colorectal. D'entre ells, destaquen el *DCC* (Fearon *et al.*, 1990), i els gens *SMAD2* i *SMAD4*, relacionats amb la via de senyalització TGF- $\beta$  (Miyaki *et al.*, 1999b; Riggins *et al.*, 1996; Takagi *et al.*, 1996). Altres gens mapats en la regió 18q21-qter que són candidats a ser gens supressors de tumors, però que no s'han trobat implicats en el càncer de còlon i recte, són *BCL-2*, pèptid alliberador de gastrina i l'homòleg cel·lular de *YES-1*.

Aquesta via de progressió tumoral s'ha associat amb la inestabilitat cromosòmica. Les observacions experimentals que han conduït a aquesta hipòtesi són: (i) algunes línies cel·lulars de càncer de còlon, sense inestabilitat de microsatèl·lits, mostren inestabilitat genòmica deguda a defectes en la segregació cromosòmica (Lengauer *et al.*, 1997); (ii) mitjançant la citometria de fluxe s'observa que alteracions de la ploïdia en el desenvolupament primerenc del tumor afavoreixen l'acumulació de mutacions addicionals (Remvikos *et al.*, 1988; Steinbeck *et al.*, 1993); i (iii) estudis citogenètics mostren que la majoria de tumors de còlon i recte es caracteritzen per l'elevat nombre d'alteracions cromosòmiques, tant numèriques com estructurals, generalitzades i heterogènies (Mitelman *et al.*, 1997).

Paral·lelament a la ruta supressora, es va descriure la ruta mutadora pel càncer de còlon i recte. En aquesta ruta s'inclouen els tumors esporàdics que presenten mutacions en els gens de reparació de desaparellaments del DNA (MMR) (descrits anteriorment, veure apartat 1.4.4) i els tumors derivats de la síndrome HNPCC (revisat en Modrich, 1994). Les mutacions mutadores, al contrari de les supressores, no impliquen directament "els gens del càncer", sinó que la disfunció dels gens MMR pot provocar la incorrecta reparació de mutacions en determinats gens implicats en la proliferació cel·lular, podent així afavorir la carcinogènesi.

#### **1.4.6. ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES ASSOCIADES AL CÀNCER COLORECTAL**

Els tumors de còlon i recte, com molts dels altres tumors epitelials, es caracteritzen per presentar un elevat nombre de reorganitzacions cromosòmiques. Actualment, molts grups d'investigació dediquen els seus esforços a proposar models basats en les alteracions cromosòmiques per explicar la progressió d'adenoma a carcinoma. Els models descriptius de la carcinogènesi de tumors sòlids tenen el handicap de la heterogeneïtat genètica.



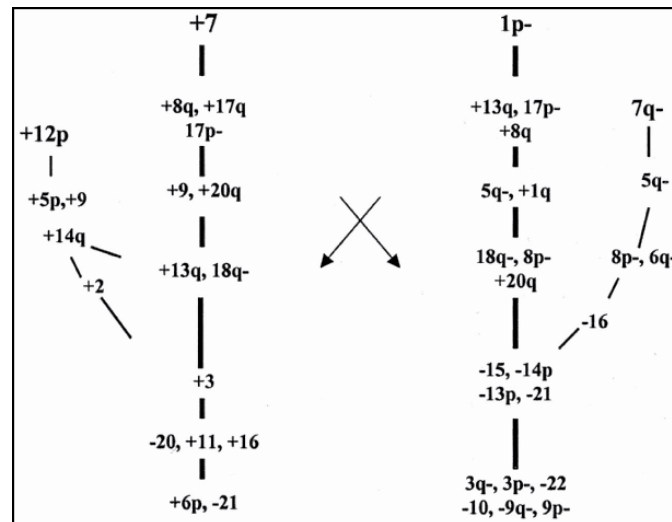
En base a estudis citogenètics de 100 tumors primaris de còlon i recte es va proposar agrupar els tumors colorectals en tres tipus diferents, acceptats com el model de Dutrillaux (Dutrillaux, 1995; Muleris *et al.*, 1988):

- **Tipus Monosòmic o MT (*Monosomic Type*):** Aproximadament el 70% dels tumors pertanyen a aquest grup. Es caracteritzen per presentar un nombre elevat d'alteracions cromosòmiques estructurals, freqüentment desequilibrades. Els cromosomes més afectats, en ordre decreixent, són el 17, 1, 8, 10, 5, 4 i 9 els quals presenten delecions parcials, i menys freqüentment duplicacions. Les alteracions numèriques que es detecten són pèrdues dels cromosomes 18, 14, 15, 21, 22, Y i X, i guany del 3, 20, 7 i X. Una altra característica comuna d'aquests tumors és l'elevada freqüència d'endoreduplicacions (65-70% de les cèl·lules), donant lloc a poblacions clonals tetraploides, les quals tendeixen a perdre cromosomes fins a establir-se al voltant d'una dotació cromosòmica modal triploide.

- **Tipus Trisòmic o TT (*Trisomic Type*):** Correspon a un 20-25% dels tumors. Es caracteritzen perquè les trisomies són les alteracions més freqüents d'aquest grup, mentre que les alteracions estructurals hi són molt poc representades. En ordre decreixent la freqüència de guany cromosòmic és +7, +13, +20, +12 i +X, donant lloc a fórmules cariotípiques amb 47-58 cromosomes.

- **Tipus Normal o NT (*Normal Type*):** Són aproximadament un 5-7% dels tumors. El fet de trobar únicament metafases normals va fer pensar en un possible origen no cancerós d'aquestes cèl·lules, però el seu caràcter maligne va ser demostrat per la seva capacitat de xenografiar en ratolins nus.

El desenvolupament de la tècnica de la hibridació genòmica comparada (CGH) sobre metafase, ha permès estudiar els desequilibris que apareixen de manera clonal en els tumors epitelials. Les delecions clonals més freqüentment detectades en tumors de còlon i recte afecten als cromosomes 18q, 4, 5q, 1p, 8p, 17p, 6q i 9p, mentre que els guanys afecten preferentment als cromosomes 20q, 7q, 8q i 13q (Al-Mulla *et al.*, 1999; Ried *et al.*, 1996). A pesar de nombrosos estudis que evidencien l'associació de determinades alteracions cromosòmiques a la progressió del càncer de còlon i recte (Knosel *et al.*, 2004), es creu que poden existir múltiples vies d'iniciació que podrien acabar convergint en dues grans vies d'evolució cromosòmica, una via hiperdiploide iniciada pel guany dels cromosomes 7 i 12p, i una pseudodiploide iniciada per les pèrdues de 1p i 7q (Hoglund *et al.*, 2002) (Figura 8).

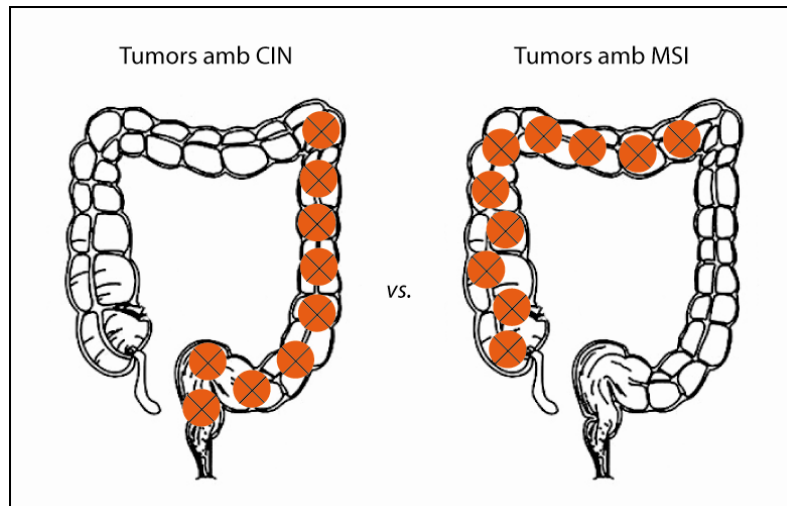


**Figura 8.** Vies d'evolució cariotípica del càncer de còlon i recte segons Höglund et al. (2002)

Aquest model de progressió, que inclou dues vies d'evolució cromosòmica, estaria d'acord amb els dos tipus més representatius de tumors colorectals segons la descripció de Dutrillaux (Dutrillaux, 1995), o sigui, el tipus monosòmic i el tipus trisòmic. La via que comença amb el guany del cromosoma 7 estaria d'acord amb el model *Trisomic Type*, mentre que la via que s'inicia amb la pèrdua de 1p representaria el model *Monosomic Type*.

#### 1.4.7. DOS CÒLONS, DOS CÀNCERS: EL PARADIGMA DE LA INESTABILITAT GENÒMICA

Generalment, quan parlem d'adenocarcinomes en l'intestí gros, els oncòlegs i cirurgians classifiquen diferencialment el còlon del recte en base a la seva localització a la cavitat peritoneal o a la pelvis, respectivament. Des d'un punt de vista genètic, els tumors localitzats en el còlon proximal representen una entitat diferenciada dels tumors en el còlon distal i recte (Figura 9). D'una manera molt breu i simple, podem dir que els tumors de còlon i recte que presenten inestabilitat cromosòmica estarien localitzats al còlon distal i al recte, mentre que els tumors que presenten inestabilitat de microsatèl·lits els localitzaríem al còlon proximal (Aaltonen *et al.*, 1993; Lothe *et al.*, 1993).



**Figura 9.** Distribució anatòmica dels tumors de còlon i recte segons si presenten inestabilitat cromosòmica (CIN) o inestabilitat de microsatèl·lits (MSI).

Tal i com s'ha vist en apartats anteriors, el grup de tumors CIN representa aproximadament un 85% de tots els tumors de còlon i recte, i es presenten majoritàriament de forma esporàdica. Per altra banda, aproximadament el 15% dels tumors de còlon i recte pertanyen al grup MSI, i majoritàriament presenten un caràcter hereditari. La simplicitat d'aquesta classificació es veu altament compromesa quan trobem tumors que no presenten ni MSI ni CIN. Aquests tumors són aparentment normals i amb poques mutacions, però són tant o més agressius que els tumors amb elevada inestabilitat de microsatèl·lits o cromosòmica. A més a més d'aquestes diferències genètiques, els tumors CIN i MSI també es diferencien per l'agressivitat i evolució patològica. Mentre que els tumors CIN acostumen a presentar una elevada agressivitat i una elevada eficàcia per metastatitzar, els tumors MSI presenten millor pronòstic, i les cèl·lules tumorals rarament migren als nòduls limfàtics. Els tumors CIN i MSI també presenten diferències pel que fa al pronòstic i a l'habilitat de reparar el dany cel·lular causat per agents quimioterapèutics. Hi ha diverses evidències que suggereixen que els tumors MSI responen millor al tractament amb 5-fluorouracil (Carethers *et al.*, 1999) i tenen millor pronòstic que els tumors CIN.

Més enllà de la diferenciació etiològica entre el còlon proximal i el distal, s'han proposat altres mecanismes per explicar les diferències tipològiques i evolutives entre els tumor de còlon i recte amb diferent localització anatòmica. Inicialment, diferents carcinògens actuarien específicament per explicar un fenotip cel·lular determinat. Així, el model de càncer amb MSI s'explicaria per l'acció d'agents carcinògens promotors de la hipermetilació del DNA, que provocarien errors en l'aparellament de bases del DNA i l'activació dels gens de reparació d'aquests errors; mentre que els càncers amb CIN

estarien causats principalment per agents carcinògens que provocarien reorganitzacions cromosòmiques, activant així els punts de control del cicle cel·lular (Breivik & Gaudernack, 1999). En aquest punt actua la selecció natural afavorint les cèl·lules amb inestabilitat genòmica, és a dir, afavoreix a les cèl·lules deficientes en els gens MMR i en els *checkpoints* de resposta al dany genòmic en tumors MSI i CIN, respectivament. Aquesta teoria no té en compte l'aneuploidia com a possible inici del procés carcinogènic.

Quan posem tots els paràmetres que hem utilitzat en aquesta introducció damunt la taula per descriure la inestabilitat genòmica, ens adonem que aquesta és el resultat del sinergisme entre diferents factors, entre els quals podem destacar l'aneuploidia, les mutacions específiques en gens del control del cicle cel·lular, les mutacions en els gens de reparació del DNA, transductors de senyal i la pressió selectiva que afavoreix el procés.

Recentment, s'ha descrit una via de la carcinogènesi colorectal en la qual la inestabilitat genòmica, ja sigui de microsatèl·lits o cromosòmica, seria un element inicial mantingut en les cèl·lules de la mucosa de l'intestí (Hermsen *et al.*, 2002). La formació de l'adenoma vindria precedida per mutacions en la via de senyalització WNT, i a continuació, l'evolució d'adenoma a carcinoma en els tumors amb inestabilitat cromosòmica estaria marcada per l'acumulació específica d'alteracions cromosòmiques, suggerint múltiples vies que convergeixen en la paraula càncer.

## ***2. PREMISSA i OBJECTIUS***

<<D'acord amb una vella dita, és millor viatjar amb esperança que no pas arribar. L'afany per descobrir alimenta la creativitat en tots els camps, no només en la ciència. Si arribéssim a la meta, l'esperit humà es marciria i moriria.>>

(Stephen Hawking, *L'Univers en una closca de nou*)

A principis dels anys 90 es va proposar una progressió lineal del càncer de còlon, en la qual es manifestava un conjunt seqüencial d'alteracions gèniques i cromosòmiques que pretenien explicar la carcinogènesi colorectal. Més endavant, es va introduir el terme de la inestabilitat genòmica per mostrar la velocitat d'adquisició de mutacions genètiques per part de les cèl·lules tumorals.

El càncer de còlon ha estat utilitzat durant molt de temps com un model únic per l'estudi de la inestabilitat genòmica. Si bé les causes genètiques de la inestabilitat de microsatèl·lits són bastant conegudes, les que causen la inestabilitat cromosòmica romanen encara per descobrir.

La perfectíssima complexitat intrínseca de la cèl·lula tumoral emmascara sovint la linealitat descrita en un començament i es transforma en un caos genètic que genera una extrema heterogeneïtat intratumoral. Molts autors, i alguns d'ells amb molt d'èxit, han intentat classificar aquest desordre mitjançant l'estudi del comportament cariotípic. La dificultat per entendre i mesurar la velocitat de generació d'aquest caos cromosòmic va significar un atractiu repte científic amb la finalitat d'aportar un bri de coneixement per esbrinar el funcionament biològic dels tumors de còlon que presenten inestabilitat cromosòmica.

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat l'estudi de la inestabilitat genòmica utilitzant com a model el càncer de còlon. Més concretament, ens hem centrat en el paper que la inestabilitat cromosòmica pot jugar en l'evolució i el desenvolupament de l'heterogeneïtat cel·lular en els tumors sòlids. A continuació s'enumeren els objectius concrets:

1. Estudi de l'evolució cariotípica des de cèl·lules del tumor primari fins a cèl·lules altament metastàtiques a fetge mitjançant tècniques de citogenètica molecular.
2. Utilització d'un model cel·lular *in vitro* per l'estudi de la relació entre els diferents tipus d'inestabilitat genòmica en càncer de còlon i recte.
3. Quantificació de la inestabilitat cromosòmica numèrica i estructural en línies cel·lulars de càncer de còlon.
4. Estudi de l'origen de les aneuploidies per no-disjunció o pèrdua anafàsica en cèl·lules binucleades de càncer de còlon.
5. Estudi de les diferències genòmiques i dels patrons d'expressió gènica entre tumors de còlon i recte que presenten inestabilitat de microsatèl·lits i tumors que no en presenten.

### ***3. MATERIALS i MÈTODES***

<<Els graus més alts de perfecció eren el resultat d'aquelles situacions que palesaven més competició. L'especialització creixent era el punt d'arrencada de tal competició,...>>

(Pròleg de Thomas Clix en  
*L'Origen de les Espècies* de Charles Darwin)

### 3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

En el nostre estudi hem utilitzat línies cel·lulars humanes de càncer de còlon i tumors primaris de còlon i recte.

#### 3.1.1. LÍNIES CEL·LULARS DE CÀNCER DE CÒLON

Les línies cel·lulars que hem utilitzat són: DLD-1, LoVo, HCT-116, SW480, HT-29. Totes elles han estat obtingudes de l'ATCC (de l'anglès *American Tissue Cell Culture*). A més a més, s'han utilitzat les línies cel·lulars de càncer de còlon KM12C, i els seus derivats metastàtics KM12SM i KM12L4. Aquestes línies cel·lulars van ser creades pel Dr. T Yeatman a partir d'implants de tumors de còlon humans a ratolins immunodeprimits. KM12SM i KM12L4 presentaven un potencial metastàtic molt més elevat respecte la línia KM12C. Totes les línies cel·lulars emprades han estat amablement cedides pel Dr. Miquel A. Peinado de l'IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, Barcelona. Les característiques de cultiu específiques per cada línia i algunes característiques moleculars estan esquematitzades en la Taula 6.

**Taula 6.** Característiques de les línies cel·lulars estudiades

Nom	Origen	Medi de cultiu base	Temps de duplicació	Ploidia	MSI	TP53	K-RAS	C-MYC
HCT-116	Adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~2n	+	-	+	-
LoVo	Adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~2n	+	+	+	+
DLD-1	Adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~2n	+	+	+	+
HT-29	Adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~3n	-	+	+	Amp.
SW480	Adenocarcinoma colorectal	Leivovitz, 10% FBS	~36 h.	~3n	-	+	+	Amp.
KM12C	Adenocarcinoma colorectal	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~2n	+	n.d.	n.d.	n.d.
KM12SM	Metastàtica a fetge	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~4n	+	n.d.	n.d.	n.d.
KM12L4A	Metastàtica a fetge	DMEM:F12, 10% FBS	~24 h.	~4n	+	n.d.	n.d.	n.d.

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FBS, *fetal bovine serum*

MSI, *microsatellite instability*

Amp., amplificació; h., hores; n.d., no determinat

#### 3.1.2. TUMORS PRIMARIS DE CÒLON I RECTE

Un total de 31 tumors primaris de còlon van ser utilitzats en aquest estudi. Les mostres van ser cedides pel Dr. Miquel A. Peinado i el Dr. Simó Schwartz Jr. del CIBBM de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron de Barcelona. Les característiques clíniques i



patològiques de les mostres de tumors primaris estan indicades en la Taula 7. La classificació de Dukes segons Aster-Coller i la classificació de TNM han estat les utilitzades per definir el grau d'evolució del tumor.

**Taula 7.** Característiques clíniques i patològiques dels tumors primaris

ID	Edat	Sexe	T	N	M	Dukes	Estadi	MSI
12T	50	F	3	0	0	B	II	-
29T	51	M	3	1	0	C	III	+
41T	75	M	3	2	0	C	III	-
50T	61	M	4	2	0	D	-	-
53T	61	F	4	3	0	C	II	-
62T	38	F	3	3	0	C	II	-
67T	68	M	3	0	0	B	II	+
71T	55	F	3	2	1	D	-	-
72T	77	F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+
79T	67	M	3	1	1	D	-	-
83T	67	F	4	2	0	C	III	+
87T	58	M	3	2	1	D	-	+
92T	75	F	3	0	0	B	II	+
99T	72	M	3	0	0	B	II	+
108T	62	M	3	1	0	C	II	-
109T	43	F	3	0	0	B	II	-
112T	69	F		0	0	A	-	-
114T	77	F	3	0	0	B	II	-
123T	55	F	3	1	0	C	II	+
124T	64	M	3	0	0	B	II	-
135T	63	F	3	0	0	B	II	-
136T	33	F	3	2	0	C	III	+
146T	53	M	2	1	0	C	III	-
154T	67	M	3	2	1	D	-	-
167T	46	M	3	1	0	C	II	+
172T	75	F	3	0	0	B	II	+
184T	54	M	3	0	0	B	II	+
190T	79	M	3	1	0	B	III	-
259T	74	F	3	0	0	B	II	+
274T	54	M	3	0	0	B	II	+
280T	43	M	4	0	0	B	II	+

MSI, *microsatellite instability*  
n.d., *no determinat*

## 3.2. METODOLOGIA EMPRADA EN EL PROCÉS EXPERIMENTAL

### 3.2.1. CULTIU DE CÈL·LULES EPITELIALS

#### A. Introducció a la tècnica

La utilització de cultius cel·lulars proporciona una visió reduccionista en l'estudi de tumors sòlids. Cada línia cel·lular constitueix una població individual i fenotípicament uniforme de cèl·lules que deriven d'un teixit. Les línies cel·lulars derivades de neoplàsies signifiquen una eina de treball molt útil a l'hora d'estudiar tant el comportament fisiològic, característiques bioquímiques així com característiques

morfològiques de les cèl·lules tumorals *in vitro*. La propagació cel·lular indefinida, la seguretat de treballar sense contaminació per cèl·lules normals, així com la possibilitat d'obtenir clons unicel·lulars, són clares avantatges que faciliten l'estudi de la ploïdia, el cariotip i alteracions genètiques relacionades amb la tumorigènesi. A pesar de la pressió selectiva a la que se sotmeten les cèl·lules tumorals per adaptar-se a un nou medi, l'equivalència de resultats en estudis fets amb tumors primaris i amb línies cel·lulars corroboren la fiabilitat d'aquesta estratègia. En aquest apartat de manipulació de cultius cel·lulars s'inclouen els protocols per congelar i descongelar cèl·lules, protocol de tripsinització, protocol d'extracció i fixació de cèl·lules per obtenir cromosomes metafàsics, protocol d'obtenció de clons a partir d'una sola cèl·lula, i protocol d'obtenció de cèl·lules binucleades.

#### B. Reactius i equipament

- Medi de Cultiu: DMEM:F12 Glutamax I / Leivobitz L-15 (Gibco®/Invitrogen)
  - 10% FBS inactivat (Sèrum Fetal Boví) (Gibco®/Invitrogen)
  - 1% L-Glutamina (Gibco®/Invitrogen)
  - 1% Penicilina / Streptomina (Gibco®/Invitrogen)
- Tripsina-EDTA (0.05% Trypsin with EDTA 4Na) 1X (Gibco®/Invitrogen)
- KARYO-MAX Colcemid Solution liquid (10µg/ml) (Gibco®/Invitrogen)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- Citocalasina B (Sigma-Aldrich)
- Trypan Blue Stain (Gibco®/Invitrogen)
- Formaldehid 37% (Panreac)
- Solució PBS
- Flascons de 25 i 75 cm<sup>3</sup> (BD Falcon™)
- Plaques de cultiu cel·lular de 96 pous (Nunc™)
- Tubs Falcon 15 ml (BD Falcon™)
- Criotubs de 2 ml (Nunc™)
- Plaques de 96 pous (BD Falcon™)
- Pipetes esterilitzades de 5 ml (BD Falcon™)
- Cambra de Neubauer (Brand)
- Bany a 37°C (Clifton)
- Estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C utilitzada específicament pel creixement de cèl·lules eucariotes (Forma Scientific)
- Centrífuga (Sorvall, TC6)
- Micropipetes 10 µl, 100 µl i 1000 µl.
- Campana de fluxe laminar (Cultek, Faster, Bio 48)

- Microscopi invertit (Leitz)

Qualsevol manipulació del cultiu cel·lular es realitzarà en una campana de flux laminar per evitar contaminacions.

### 3.2.1.1. DESCONGELACIÓ I CONGELACIÓ DE LÍNIES CEL·LULARS

La congelació i descongelació cel·lular són processos molt importants per mantenir la línia cel·lular. Concretament, el DMSO a temperatura ambient té un efecte tòxic sobre la integritat cel·lular, per la qual cosa en cada procés de congelació i descongelació perdem un nombre considerable de cèl·lules.

Protocol de descongelació:

- 1- Treure el criotub del tanc de nitrogen líquid i deixar-lo descongelar un parell de minuts al bany a 37°C.
- 2- Diluir el contingut del criotub en 10 ml de medi de cultiu mantingut a 4°C per tal de disminuir l'efecte nociu del DMSO.
- 3- Centrifugar 8 minuts a 1200 r.p.m.
- 4- Aspirar el sobrenedant.
- 5- Opcional: Realitzar un rentat del botó cel·lular amb PBS.
- 6- Resuspendre el botó cel·lular amb medi de cultiu ja temperat a 37°C.
- 7- Recompte cel·lular en una cambra de Neubauer per tal de comprovar la viabilitat cel·lular després de la descongelació. Tinció de les cèl·lules amb Trypan Blue. El Trypan Blue és un colorant que traspasa la permeabilitat de la membrana en cèl·lules que hagin mort, de manera que les cèl·lules vives s'observaran brillants i refringents, i les cèl·lules mortes s'observaran de color blau fosc. S'utilitzarà un microscopi invertit per realitzar el recompte cel·lular.
- 8- Sembrar de les cèl·lules en una placa de petri o en un flascó de 25 cm<sup>3</sup> a una concentració elevada per tal de facilitar l'adhesió a la superfície i el contacte cel·lular.

Protocol de congelació:

- 1- Preparació de medi de cultiu de congelació: FBS amb 10% DMSO. Aquest es deixa reposar en fred.
- 2- Resuspendre el botó cel·lular amb el medi de congelació.
- 3- Fer alíquotes de 1,5 ml en els criotubs.
- 4- Congelar els criotubs a -80°C.
- 5- Després de 24-48 hores, dipositar els criotubs en el tanc de nitrogen líquid.

### 3.2.1.2. CULTIU CEL·LULAR I TRIPSINITZACIÓ

Les cèl·lules es mantenen en el medi de cultiu adient indicat a la Taula 6 en una estufa a 37°C amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Aproximadament, la tripsinització es realitzarà cada 72 hores.

Protocol de tripsinització:

- 1- Aspirar el medi de cultiu del flascó.
- 2- Rentar les cèl·lules amb PBS a temperatura ambient (5 ml per un flascó de 75 cm<sup>3</sup>).
- 3- Aspirar el PBS i repetir el rentat.
- 4- Afegir tripsina-EDTA 1X (2 ml per flascó 75 cm<sup>3</sup>) i deixar el flascó a l'estufa.
- 5- Deixar actuar fins que les cèl·lules comencin a adoptar una forma arrodonida (aprox. 2 min). En aquest punt, donarem lleugers cops a la base del flascó per ajudar a desadherir les cèl·lules. Important: Massa temps amb tripsina pot danyar les cèl·lules perquè l'activitat enzimàtica pot afectar la integritat de la membrana plasmàtica.
- 6- Afegir com a mínim el mateix volum de medi de cultiu que de tripsina per tal de neutralitzar l'efecte d'aquesta
- 7- Recollir el sobrenedant en un tub de centrifuga de 15 ml.
- 8- Centrifugar a 1200 r.p.m. durant 8 minuts.
- 9- Aspirar el sobrenedant del tub vigilant de no endur-nos material cel·lular.
- 10- Resuspendre el botó cel·lular en un volum adequat (1-2 ml).
- 11- Recompte cel·lular en una cambra de Neubauer.
- 12- Ressemmbrar aproximadament 10<sup>6</sup> cèl·lules/ml en 5 ml de medi de cultiu per un flascó de 25 cm<sup>3</sup> i/o en 15 ml per un flascó de 75 cm<sup>3</sup>.

### 3.2.1.3. EXTRACCIÓ I FIXACIÓ: OBTENCIÓ DE CROMOSOMES METAFÀSICS

Protocol per l'obtenció de cromosomes metafàsics:

- 1- El millor moment per obtenir cromosomes mitòtics és quan el cultiu es troba en la fase exponencial de creixement. Aquesta situació es dona quan hi ha aproximadament un 70% de confluència, i s'observen moltes cèl·lules en divisió, adoptant una forma arrodonida.
- 2- En aquest punt s'afegeix l'agent citostàtic Colcemid (0,06 µg/ml) i es deixa actuar durant 1-2 hores. Aquest punt varia en funció del tipus cel·lular.
- 3- Transcorregut el temps necessari, s'evoca el sobrenedant en un tub de 10-15 ml, en el qual realitzarem la resta de l'extracció.

- 4- Afegir tripsina-EDTA 1X (0,5 ml en un flascó de 25 cm<sup>3</sup>)
- 5- Deixar actuar fins que les cèl·lules comencin a adoptar una forma arrodonida (aprox. 1,5 – 2 min). En aquest punt, donarem lleugers cops a la base del flascó per ajudar a desadherir les cèl·lules.
- 6- Neutralitzem l'efecte de la tripsina afegint al flascó el volum que havíem recollit anteriorment.
- 7- Traspassem tot el volum de l'interior del flascó al tub de centrifuga de 10-15 ml.
- 8- Centrifuguem durant 10 minuts a 1200 r.p.m.
- 9- Aspirar el sobrenedant tenint cura de no malmetre el botó cel·lular.
- 10- Resuspenem el botó cel·lular amb solució hipotònica de clorur de potassi, KCl (0,075 M), i ho deixem reposar en un bany a 37°C durant 30 minuts. El temps de xoc hipotònic pot variar en funció del tipus cel·lular.
- 11- Centrifuguem durant 10 minuts a 1200 r.p.m.
- 12- Aspirem el sobrenedant i afegim la solució de fixació (Solució Carnoy, metanol:àcid acètic en proporció 3:1) gota a gota en contínua agitació.
- 13- Repetim aquest pas dues vegades més.
- 14- Fer les extensions sobre portaobjets i guardar-los a –20°C fins la seva utilització, o guardar el botó cel·lular en solució Carnoy a –20°C.

#### **3.2.1.4. OBTENCIÓ DE CLONS A PARTIR D'UNA SOLA CÈL·LULA**

L'obtenció de clons es va fer per dilució límit. Els clons utilitzats en aquest estudi han estat generats a partir de la línia cel·lular parental SW480. Els clons s'han anomenat SW480 S1, S2 i S4. I a partir del clona S2, es van obtenir els clons S2.3 i S2.4.

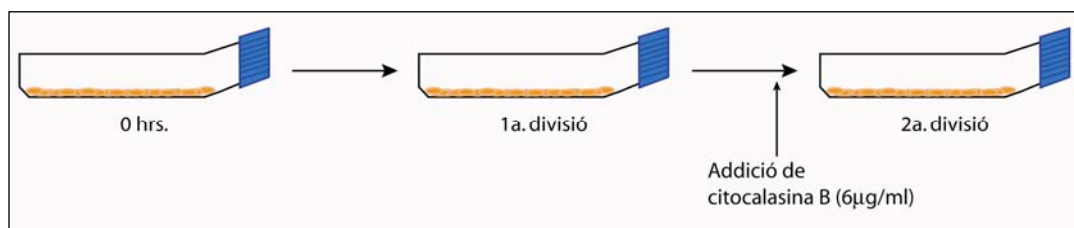
Protocol per l'obtenció de clons:

- 1- Preescalfem una placa de cultiu cel·lular de 96 pous amb 150 µl de medi en cada pou. El medi de cultiu per realitzar aquests processos de clonació serà suplementat amb 20% de FBS.
- 2- Després de tripsinitzar el cultiu, realitzem dilucions seriades fins a obtenir una concentració de com a màxim una cèl·lula per pou.
- 3- Deixem pous sense cèl·lules de manera que ens serveixin de control negatiu del creixement.
- 4- De la mateixa manera, en una sèrie de pous de la mateixa placa, afegim concentracions cel·lulars més elevades com a control positiu del creixement cel·lular.

- 5- El seguiment del creixement en cada pou s'ha realitzat a través d'un microscopi de contrast de fases.

### 3.2.1.5. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES BINUCLEADES

Per l'obtenció de cèl·lules binucleades és necessari afegir citocalasina B al cultiu cel·lular. La citocalasina B és un compost químic que inhibeix el procés de citocinesi, de manera que la cèl·lula, una vegada ha realitzat la divisió del seu material genètic, no pot realitzar la divisió citoplasmàtica. Com a resultat observem un únic compartiment citoplasmàtic amb dos nuclis. La citocalasina B s'afegeix al cultiu unes hores abans de la penúltima divisió cel·lular després de la qual volem realitzar l'extracció, així aconseguim que el nombre de cèl·lules binucleades sigui el màxim. Aquest moment dependrà del temps de duplicació de les cèl·lules amb què treballem. La concentració oscil·larà entre 3-6  $\mu\text{g/ml}$ . Finalment, establirem quina és la millor concentració per tal d'obtenir un nombre elevat de cèl·lules binucleades sense danyar el material cel·lular. Deixarem la citocalasina B unes 24 hores (fins la pròxima divisió cel·lular) i realitzarem l'extracció (Figura 10).



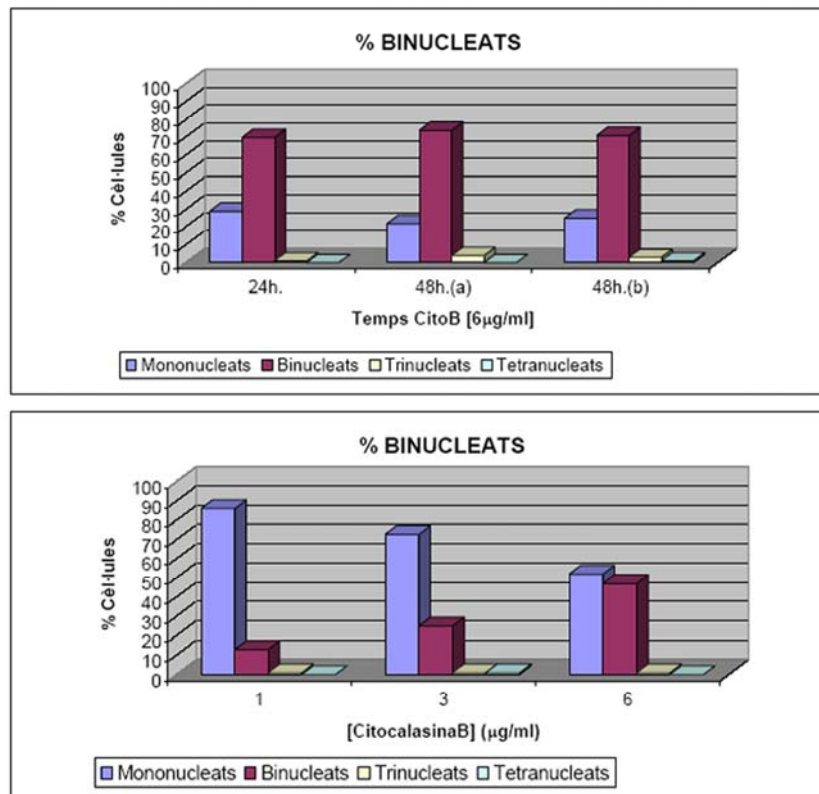
**Figura 10.** Cronograma del cultiu cel·lular per l'obtenció de cèl·lules binucleades.

Protocol d'extracció de cèl·lules binucleades:

Una vegada hem tripsinitzat les cèl·lules i tenim el material cel·lular en un tub de centrifuga de 10 ml, cal:

- 1- Centrifugar 8 minuts a 800 r.p.m.
- 2- Aspirar el sobrenedant fins a la part cònica del tub.
- 3- Resuspendre el botó cel·lular.
- 4- Afegir 5 ml de KCl 0,075 M a 4°C (gota a gota i amb agitació molt suau).
- 5- Immediatament centrifugar 8 minuts a 800 r.p.m.
- 6- Treure el sobrenedant fins a la part cònica. Resuspendre el botó cel·lular amb molta cura.
- 7- Afegir fixador Carnoy (metanol:àcid acètic en proporció 3:1) + 3 gotes de formaldehid 37%.

- 8- Centrifugar 8 minuts a 800 r.p.m.
- 9- Treure el sobrenedant fins a la part cònica.
- 10- Repetir el rentat amb Carnoy dues vegades més però sense posar formaldehid.
- 11- Resuspendre amb poc volum de Carnoy.
- 12- Tenyir la preparació (ex: Giemsa:PBS, 1:9 entre 8-10 minuts).
- 13- Comptatge de cèl·lules binucleades al microscopi (Figura 11).



**Figura 11.** Efecte de la citocalasina B en l'obtenció de cèl·lules binucleades en funció del temps i la concentració.

### 3.2.2. TÈCNiques DE CITOGÈNÈTICA CLÀSSICA: BANDES G

#### A. Introducció a la tècnica

La tècnica de bandes G representa la tècnica més habitual de bandeig cromosòmic, posant de manifest un patró de bandes clares i fosques específic de cada cromosoma metafàsic. Les bandes clares representen regions eucromàtiques, riques en GC (guanina i citosina), de replicació primerenca i presenten una elevada densitat gènica. Contràriament, les bandes fosques són regions heterocromàtiques, riques en AT (adenina i timina), de replicació tardana i amb poca densitat gènica. La resolució de les bandes G per detectar anomalies cromosòmiques és de ~ 10 Mb.

**B. Reactius i equipament**

- 2xSSC: Citrat sòdic salí (Merck) dissolt en NaCl (0,3 M)
- Colorant Wright (Sigma-Aldrich): 0,25% del colorant es dissol en metanol i s'agita durant 45 minuts, es filtra i s'envelleix a temperatura ambient durant una setmana o 3 dies a 37°C
- Colorant Leishman (Merck)
- Cubetes Coplin
- Estufa a 65°C
- Bany a 65°C

**C. Protocol**

- 1- Envelliment de les extensions cromosòmiques durant 12 hores en una estufa a 65°C, o bé 48 hores a temperatura ambient.
- 2- Pretractament de les extensions cromosòmiques. Dipositar les preparacions en una cubeta Coplin amb 2xSSC, prèviament escalfat a 65°C, durant tres minuts. Aquest temps pot variar lleugerament en funció de la preparació.
- 3- Rentar la preparació amb aigua i deixar assecar.
- 4- Tinció de les extensions cromosòmiques. La solució de tinció està composta per 3 ml de tampó Sørensen i 1 ml de solució Wright. La solució final es diposita sobre el portaobjectes durant 3 minuts aproximadament.
- 5- Rentar la preparació amb aigua i deixar assecar.
- 6- Si les bandes no es veuen correctament o si volem realitzar alguna altra tinció, podem procedir a destenyir els cromosomes deixant la preparació un minut en metanol i deixant-la assecar a l'aire.

**3.2.3. EXTRACCIÓ DE DNA****A. Introducció a la tècnica**

L'extracció de DNA es portarà a terme a partir de material congelat o a partir de cèl·lules en cultiu (mínim  $10^6$  cèl·lules). Aquesta es realitzarà mitjançant el mètode de fenol-cloroform ja que l'eficàcia alhora d'aplicar la CGH és millor que si s'utilitzen solucions d'extracció de DNA comercials. La manipulació d'aquests productes tòxics es realitzarà en una campana d'extracció de gasos.

**B. Reactius i equipament**

- Tampó de lisi (NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 7,6 25 mM, EDTA 10 mM, SDS, 0,5%)
- Proteïnasa K (concentració stock: 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich)
- Fenol (Fluka)



- Cloroform (Sigma-Aldrich)
- Alcohol isoamílic (Sharlab)
- NaCl 5 M
- Etanol absolut
- Etanol 70%
- RNasa (Sigma-Aldrich)
- Tubs de 15 ml (BD Falcon™)
- Tubs de 2 ml (Nunc™)
- Bany a 56°C
- Centrifuga (Sorvall, TC6)
- Campana d'extracció de gasos
- Micropipetes 10 µl, 100 µl i 1000 µl

### C. Protocol

El teixit congelat s'esmicolarà amb un martell sobre una plataforma de ferro envoltada de nitrogen líquid. En el cas de treballar amb una línia cel·lular, partim del botó de cèl·lules després de centrifugar-les durant 8 minuts a 1100 r.p.m.

- 1- Afegir 5 ml de tampó de lisi (o 500 µl/10<sup>6</sup> cèl·lules) en un tub on hi hagi la pols del tumor o el botó cel·lular.
- 2- Resuspendre molt acuradament.
- 3- Afegir 33,3 µl de proteinasa K (30 mg/ml).
- 4- Agitar manualment invertint el tub varies vegades.
- 5- Tapar el tub amb parafilm.
- 6- Deixar a 56 °C tota la nit
- 7- Afegir el mateix volum de fenol:cloroform:isoamílic que el volum de tampó de lisi a raó de 2,5:2,4:0,1 ml per 5 ml de tampó de lisi.
- 8- Agitar per inversió manual varies vegades.
- 9- Centrifugar durant 10 minuts a 8°C a 3000 r.p.m.
- 10- Passar la fase superior (o fase aquosa) a un altre tub.
- 11- Repetir de nou l'operació.
- 12- Afegir el mateix volum de cloroform:isoamílic que el volum de tampó de lisi a raó de 4,8:0,2 ml per 5 ml de tampó de lisi.
- 13- Agitar per inversió manual varies vegades.
- 14- Centrifugar 10 minuts a 8°C a 3000 r.p.m.
- 15- Passar la fase superior (o fase aquosa) a un altre tub.
- 16- Centrifugar 5 minuts a 8°C a 3000 r.p.m.
- 17- Passar amb molt de compte la fase superior (o fase aquosa) a un altre tub

- 18- Afegir NaCl 5 M a raó de 400 µl per cada 5 ml de solució.
- 19- Agitar cuidadosament.
- 20- Afegir etanol absolut fred a raó de 2 v/v (El volum està a 5 ml, fer-lo arribar fins 15-20 ml).
- 21- Agitar amb compte fins veure aparèixer la medusa de DNA.
- 22- Pescar el DNA, rentar-lo per immersió en un tub amb 5 ml d'etanol al 70% i passar-lo a un tub Nunc.
- 23- Assecar el DNA (deixar el tub tapat amb parafilm, fent forats a la part superior amb una agulla o assecar-lo a l'estufa 65° durant uns minuts).
- 24- Afegir H<sub>2</sub>O desionitzada o TE1X (ex: 100 µl H<sub>2</sub>O).
- 25- En determinats casos s'aplicarà un tractament amb RNasa: S'afegeixen 2 µl de RNasa (100 µg/ml) a la solució de DNA i es deixa incubar 30 minuts. Precipitar el DNA amb 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M i 3 volums d'etanol absolut durant tota la nit a -20°C. Després centrifuguem 15 minuts a 14.000 r.p.m. i resuspenem el botó de DNA amb H<sub>2</sub>O desionitzada o TE1X. Emmagatzemem el tub a -4°C.

### 3.2.4. QUANTIFICACIÓ DEL DNA

#### A. Introducció a la tècnica

Després de l'extracció, quantifiquem el DNA problema a partir de comparar la intensitat de la banda amb la d'un DNA de concentració coneguda en un gel d'agarosa.

#### B. Reactius i equipament

- Cubeta d'electroforesi (Ecogen)
- Tampó TBE
- Agarosa (BioRad)
- Bromur d'Etidi

#### C. Protocol

- 1- Preparar un gel d'agarosa 1% (35 ml TBE 1X, 3,5 mg d'agarosa).
- 2- Córrer els DNAs durant 1 hora a 100 V.
- 3- Tenyir el gel en una solució de bromur d'etidi diluït.
- 4- Observar el gel en una placa de llum ultraviolada.

### 3.2.5. TÈCNiques DE CITOGENÈTICA MOLECULAR: HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT

#### A. Introducció a la tècnica

La tècnica d'hibridació *in situ* aprofita la propietat del DNA per la qual les dues cadenes que formen la doble hèlix són complementàries i paral·leles per detectar seqüències específiques de DNA o RNA sobre preparacions citològiques, usant un DNA o RNA que anomenem *sonda*. Els enllaços dèbils per ponts d'hidrogen que mantenen aparellades les bases nitrogenades de les dues cadenes complementàries, faciliten la seva separació per un procés que s'anomena desnaturalització o dissociació, i una posterior renaturalització o reassociació quan les condicions fisico-químiques són les òptimes en cada un dels casos. Actualment el marcatge de la sonda més àmpliament utilitzat és el marcatge mitjançant fluorescència, per això parlem d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*). Aquest ha permès arribar a uns límits de detecció d'alteracions cromosòmiques de 2-3 Mb (~10 Mb usant la tècnica de bandes G) i localitzar segments d'una mida inferior a 100 kb.

Tipus de sondes que podem utilitzar:

- Sondes de DNA centromèric: Dintre aquest grup de sondes podem diferenciar les sondes de: (i) marcatge del DNA centromèric específic per cada parella de cromosomes homòlegs, (ii) marcatge de tots els centròmers de tots els cromosomes amb el mateix color (pan-centromèrica) i (iii) marcatge simultani dels centròmers de cada parell de cromosomes homòlegs amb un color diferent (cenM-FISH) (Nietzel et al., 2001). En general, són molt útils per detectar aneuploidies o alteracions que inclouen el centròmer dels cromosomes; per exemple, cromosomes dicèntrics i fragments acèntrics.
- Sonda de pintat cromosòmic: A partir de llibreries de seqüències de DNA del cromosoma a analitzar, construïm la sonda que ens servirà per identificar-lo. Aquest pintat pot ser específic d'un cromosoma sencer o pot ser-ho només d'un braç. Si la sonda pinta tots els cromosomes amb un color diferent per cada parell d'homòlegs, s'anomena M-FISH o SKY. I, si la sonda marca tots els cromosomes formant un patró de bandes, s'anomena Rx-FISH o mMCB. La combinació d'aquestes tècniques servirà per identificar qualsevol de les alteracions cromosòmiques estructurals. Uns dels avenços tecnològics més importants per desenvolupar aquest tipus de sondes van ser la citometria de fluxe, processos de PCR i tècniques de microdissecció a partir de cromosomes d'una metafase.

- Sonda específica de locus: Permet la detecció d'una seqüència única, la qual podrà ser quantificada mitjançant un software i determinar nivells d'amplificació gènica (poden ser sondes inferiors a 2 Kb). Permet també la identificació de fusions gèniques formades com a conseqüència d'una translocació.
- Sonda telomèrica: Marca els telòmers dels cromosomes. Pot ser específica d'un cromosoma, d'un braç o podem arribar a veure tots els telòmers pintats amb un mateix color (pan-telomèrica) o amb colors diferents (ToTelVysion™). Actualment també existeixen sondes comercials per les regions subtelomèriques.

El marcatge de les sondes pot ser directe o indirecte. (i) Marcatge directe: la molècula fluorescent és capaç d'unir-se directe i covalentment amb el DNA, cosa que permet marcar fluorescentment la sonda mitjançant la reacció enzimàtica. (ii) Marcatge indirecte: en aquest cas la sonda es marca, també per una reacció enzimàtica, amb un antigen unit a una seqüència de nucleòtids. Aprofitant la complementarietat antigen-anticòs, podem detectar el senyal fluorescent que porta associat l'anticòs corresponent. Mitjançant diverses reaccions antigen-anticòs, aconseguim augmentar la sensibilitat del senyal.

Aplicacions de la tècnica de FISH a l'estudi de tumors sòlids:

- Identificació d'alteracions numèriques (aneuploïdies i poliploïdies) i alteracions estructurals associades a un determinat tipus de tumor.
- Caracterització de marcadors cromosòmics.
- Identificació de l'heterogeneïtat intratumoral.
- Identificació dels punts de trencament i estudiar el truncament de gens o la formació de gens de fusió.
- Estudi dels patrons d'instabilitat cromosòmica característics de determinats tipus de tumors.
- Mapatge gènic: Aquestes tècniques permeten la localització de gens o de seqüències específiques sobre el genoma.
- Estudi de la organització territorial del DNA en nuclis interfàsics.
- Estudi del paper dels telòmers en les cèl·lules tumorals.

### **FISH Multicolor (M-FISH, Multiplex-FISH)**

Gran part del treball que es presenta a continuació ha estat realitzat mitjançant la tècnica de la M-FISH (Speicher *et al.*, 1996). Aquesta tècnica permet el pintat dels 24 cromosomes humans amb diferents colors en una sola imatge. Aquesta tècnica es basa en la combinació de  $n$  nombre de fluorocroms aplicada a la fórmula  $2^n - 1$ ; així, la

combinació de només 5 fluorocroms resulta en un total de 32 combinacions, cobrint els 24 cromosomes (Taula 8). La M-FISH captura els diferents canals de fluorescència per separat, i després un suport informàtic sobreposa els diferents plans de captura per obtenir la imatge final. Això ens permet treballar amb les imatges dels diferents plans de captura per separat. La resolució d'aquesta tècnica és aproximadament 8-10 Mb. Els cinc fluorocroms utilitzats com a sonda són: FITC (Spectrum Green™, pic d'excitació: 497 nm, pic d'emissió: 524 nm), Spectrum FRed™ (pic d'excitació: 655 nm, pic d'emissió: 675 nm), Spectrum Red™ (pic d'excitació: 592 nm, pic d'emissió: 612 nm), Spectrum Gold™ (pic d'excitació: 530 nm, pic d'emissió: 555 nm) i Spectrum Aqua™ (pic d'excitació: 433 nm, pic d'emissió: 480 nm).

**Taula 8.** Quadre de fluorocroms per la sonda SpectraVysion (Vysis)

#	SpectrumFRed	SpectrumAqua	FITC	SpectrumGold	SpectrumRed
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

Paral·lelament a la tècnica de FISH multicolor, es va desenvolupar la tècnica SKY (Spectral Karyotyping) (Schrock *et al.*, 1996). Aquesta tècnica de citogenètica molecular també permet el cariotipatge dels 24 cromosomes amb colors diferents. L'estratègia del marcatge de cada cromosoma és igual que la descrita per la M-FISH. A diferència de la M-FISH, en la tècnica SKY s'utilitza un microscopi acoblat a un interferòmetre que captura les diferents longituds d'ona emeses pels fluorocroms que

composen la sonda i n'obté una única imatge amb la combinació de colors específica per cada cromosoma.

La hibridació *in situ* fluorescent multicolor resulta molt útil a l'hora de realitzar un estudi complet del cariotip ja que, en un únic procés d'hibridació, permet la identificació d'alteracions cromosòmiques, tant numèriques com estructurals, que amb la tècnica de bandes G quedaven indefinides. L'ús de la tècnica M-FISH representa una aportació d'informació citogenètica a molts nivells. En el diagnòstic pre- i postnatal (Uhrig *et al.*, 1999), així com en la citogenètica clínica, amb aquesta tècnica podem caracteritzar tot el genoma sencer, alhora que podem identificar alteracions críptiques en pacients amb cariotips normals per bandes G. L'estudi citogenètic de leucèmies i tumors sòlids és un dels altres camps que es veu absolutament afavorit gràcies al desenvolupament de tècniques que permeten identificar els 24 cromosomes amb colors diferents (Chadwick *et al.*, 2000). A pesar de la complexitat dels cariotips que presenten els tumors sòlids i de la mala qualitat de les metafases obtingudes, la tècnica M-FISH permet identificar cromosomes aberrants que prèviament havien estat classificats com a normals, marcadors sense origen cromosòmic definit per bandes G, translocacions críptiques, reorganitzacions telomèriques, cromosomes en anell i diminuts dobles. La citogenètica comparativa entre diferents espècies i l'estudi de cromosomes de ratolí són altres camps on la tècnica de FISH multicolor pot aportar informació rellevant.

La tècnica M-FISH presenta algunes limitacions:

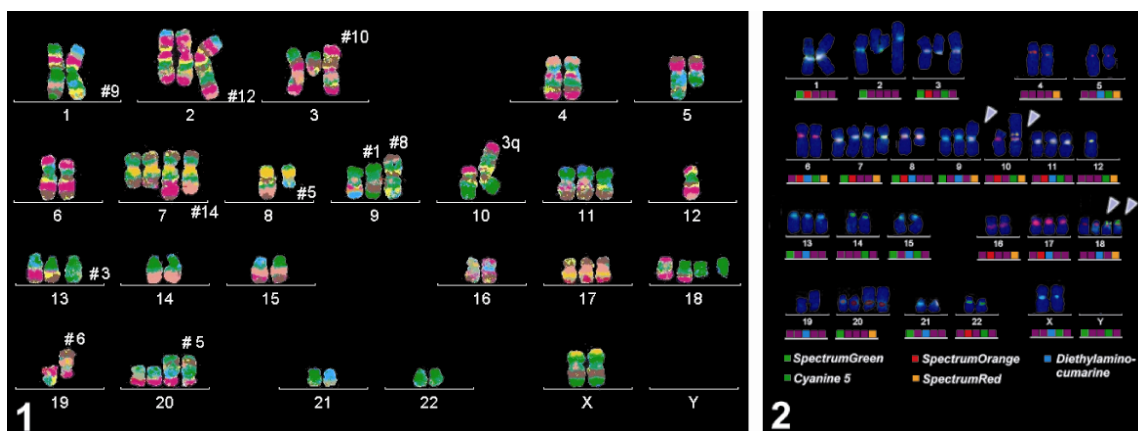
- Les reorganitzacions cromosòmiques que no facin variar la fluorescència no podran ser detectades (Devilee *et al.*, 2001). Les alteracions intracromosòmiques són reorganitzacions que poden passar desapercebudes aplicant únicament la M-FISH.
- El límit de resolució d'aquesta tècnica és de 8-10 Mb, o sigui, alteracions cromosòmiques que afectin a fragments més petits d'aquest tamany, no podran ser detectades; per exemple, les translocacions subtelomèriques que poguéssim sospitar haurien de ser confirmades mitjançant una sonda específica per aquesta regió.
- Una limitació no intrínseca de la tècnica, però no per això menys important, és la qualitat de les metafases sobre les quals realitzarem la hibridació. Obtenir una elevada quantitat de metafases sense superposicions cromosòmiques i amb cromosomes amb una longitud òptima, no és gens fàcil quan el material a estudiar són tumors sòlids.

Recentment, s'han desenvolupat tècniques de FISH multicolor marcant exclusivament els 24 centròmers amb colors diferents. Aquesta tècnica s'anomena cenM-FISH i la

vam aplicar per tal de caracteritzar completament la línia cel·lular SW480 (Figura 12) en col·laboració amb el Dr. Thomas Liehr (Institut für Humangenetik and Antropologie, Jena, Alemanya) seguint el protocol establert per Nietzel i col. (1998) i modificat per Oliver-Bonet i col (2003). La combinació de fluorocroms específica per cada centròmer està indicada en la Taula 9. En aquest mateix estudi, també s'ha aplicat la tècnica de bandejat mitjançant FISH o mMCB (*multitude multicolor banding*) en col·laboració amb aquest mateix grup d'investigació.

**Taula 9.** Quadre de fluorocroms per la sonda cenM-FISH

#	SpectrumGreen	SpectrumOrange	SpectrumRed	Biotin-Cy5	DEAC
1	Green	Orange			
2	Green				
3	Green	Orange		Green	
4			Red		
5 midi			Red	Green	Blue
6		Orange	Red	Green	Blue
7	Green	Orange	Red		
8	Green	Orange			Blue
9	Green		Red		Blue
10		Orange	Red	Green	
11		Orange		Green	Blue
12			Red	Green	
13 / 21	Green				Blue
14 / 22				Green	
15	Green			Green	Blue
16		Orange	Red		
17		Orange			Blue
18			Red		Blue
19 <sup>1/5</sup>					Blue
20	Green		Red		
22		Orange		Green	
X				Green	Blue
Y	Green			Green	



**Figura 12.** Exemple de dos cariotips obtinguts en la caracterització citogenètica molecular de la línia cel·lular SW480 mitjançant mMCB i cenM-FISH.

## B. Reactius i equipament

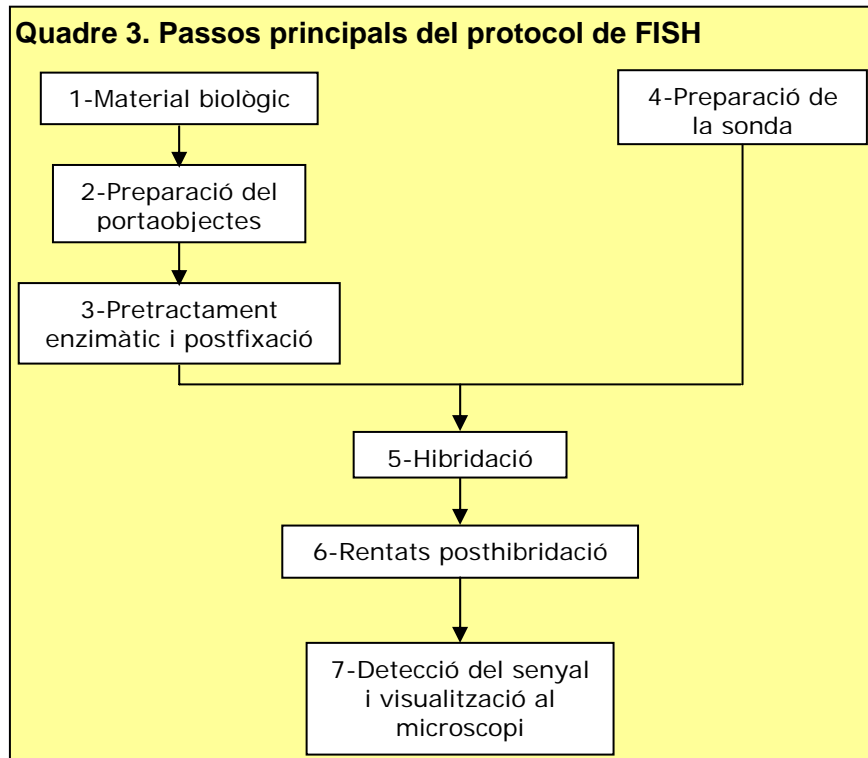
- 2xSSC
- 0,4xSSC
- PBS
- Etanols 70, 90 i 100%
- RNasa (Sigma-Aldrich)
- Pepsina (Sigma-Aldrich)
- HCl 1 M
- MgCl<sub>2</sub> 1 M
- Formaldehid 37% (Panreac)
- Formamida (Riedel de Hæn)
- Sondes de pintat cromosòmic pels cromosomes 7 i 18 (Vysis, Inc.)
- Sonda ProVysion (Vysis, Inc.)
- Sonda SpectraVysion (Vysis, Inc.)
- Sondes de DNA  $\alpha$ -satèl·lit pels cromosomes 4, 7, 15 i 18 (Vysis, Inc.)
- Sondes cenM-FISH i mMCB (cedides pel Dr. Thomas Liehr)
- Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- DAPI III (Vysis)
- DAPI (Sigma-Aldrich)
- Vectashield (Vysis)
- Cubetes Coplin
- Microscopi de fluorescència (Olympus BX-50)
- Càmera digital CCD (Photometrix Sensys / Olympus U-SPT)
- Filtres de fluorescència
- Paquet informàtic per la captura i anàlisi de les imatges (Isis, MetaSystems)

## Solucions de treball

- RNasa
- Pepsina: 49,5 ml d'H<sub>2</sub>O desionitzada  
0,5 ml HCl 1 M  
25  $\mu$ l pepsina (10 mg/ml en 2xSSC)
- Formaldehid: 41,14 ml H<sub>2</sub>O desionitzada  
2,5 ml MgCl<sub>2</sub> 1 M  
5 ml PBS 10X  
1,35 ml formaldehid 37%



### C. Protocol



- 1- Envelliment: Hi ha diverses opcions.
  - 1.1- 30 minuts en 2xSSC a 37°C.
  - 1.2- Preparar les extensions el dia anterior a la hibridació i deixar-les a l'estufa de 65°C durant tota la nit.
  - 1.3- Preparar les extensions 3 dies abans i deixar-les a temperatura ambient.
  - 1.4- Una hora a 80°C (Es pot utilitzar el HyBrite).
- 2- Submergir el portaobjectes en una cubeta Coplin amb PBS durant 5 minuts.
- 3- Deshidratar el portaobjectes en una sèrie d'etanols diluïts al 70, 90 i 100%, a temperatura ambient i durant un minut en cada un.
- 4- Tractament enzimàtic:
  - 4.1- Aplicar 50 µl de RNasa (100 mg/ml) sobre el portaobjectes i cobrir-ho amb parafilm. Deixar incubar-ho en una cambra humida a 37°C.
  - 4.2- Treure el parafilm.
  - 4.3- Rentar el portaobjectes amb 2xSSC durant 5 minuts (repetir-ho una altra vegada).
  - 4.4- Posar la solució de pepsina en una cubeta Coplin i atemperar durant 30 min a un bany a 37°C.

- 4.5- Submergir els portes dins la solució de pepsina durant 5-10 minuts en funció de la quantitat de citoplasma que observem a la preparació.
- 4.6- Fer dos rentats de 5 minuts cada un en 2xSSC a temperatura ambient.
- 4.7- Incubar els portes en la solució de pepsina preescalfada a 37°C durant aproximadament 5 minuts.
- 5- Postfixació:
  - 5.1- Incubar el portaobjectes en solució de formaldehid durant 2 minuts.
  - 5.2- Fer dos rentats de 5 minuts cada un en PBS.
  - 5.3- Deshidratar el portaobjectes en una sèrie d'etanols diluïts al 70, 90 i 100%, a temperatura ambient i durant un minut en cada un.
- 6- Desnaturalització del portaobjectes:
  - 6.1- Submergir el portaobjectes durant 2-3 minuts en formamida 70% a 72 ± 1°C.
  - 6.2- Deshidratar el portaobjectes en una sèrie etanols freds diluïts al 70, 85 i 100% durant 1 minut en cada un.
  - 6.3- Assecar el portaobjectes amb un assecador de mà, placa calenta o ventilador.
- 7- Desnaturalització de la sonda: Generalment la sonda es barreja amb tampó d'hibridació, el qual és proporcionat pel fabricant. La desnaturalització de la sonda dependrà del tipus de sonda que utilitzem (Taula 10).

**Taula 10.** Característiques de les condicions de desnaturalització de les sondes de DNA

Tipus de sonda	Temps	Temperatura
Pintat cromosòmic	5 minuts	74°C
DNA $\alpha$ -satèl·lit	5 minuts	70°C
Pan-centromerica <sup>(1)</sup>	5 minuts	75°C
Específica de locus	5 minuts	73°C
FISH multicolor	5 minuts	73°C
cenM-FISH	5 minuts	75°C
mMCB	5 minuts	74°C

(1) Cedida pel Dr.I. Roig

- 8- Rentats posthibridació: Una vegada hagi transcorregut el temps d'hibridació, traiem la goma i el cubreobjectes i realitzem els rentats posthibridació. Aquests rentats tenen la finalitat d'eliminar tot aquell material genètic que no hagi hibridat i afavorir que no aparegui soroll de fons en la preparació. En funció de l'astringència de les solucions de rentat obtindrem un senyal més o menys nítid i perfecte. Podem escollir entre dos protocols de rentat:

8.1- Rentats curts:

8.1.1- Traiem la cola i el cobreobjectes.

8.1.2- Deixem el portaobjectes 2 minuts en la solució 0,4xSSC / 0,1% NP-40 a 74°C en agitació.

8.1.3- Deixem el portaobjectes 2 minuts en solució 2xSSC / 0.1% NP-40 a temperatura ambient.

8.1.4- Deixem assecar el porta a l'aire.

8.1.5- Afegim 12 µl de DAPI (125 ng/ml) amb solució *antifade* per la contratinció. La concentració de DAPI que utilitzem depèn del tipus de mostra que analitzem i de l'aparell d'anàlisi que utilitzem. En el cas d'utilitzar la sonda SpectraVysion (Vysis), realitzarem la contratinció amb la solució DAPI III (Vysis) la qual està a una concentració inferior (32 ng/ml)

En el cas de la utilització de la sonda cenM-FISH és necessari realitzar un marcatge indirecte. Així, després del segon rentat, incubem la preparació a 37°C en una cambra humida durant 40 minuts amb una solució 1:80 d'estreptovidina anti-biotina conjugada amb el fluorocrom Cy5 en solució de bloqueig. Aquesta reacció ens permetrà visualitzar els centròmers marcats amb biotina. A continuació rentem la preparació amb 4xSSC / 0,005% Tween-20 durant 10 minuts i realitzem la contratinció amb DAPI amb *antifade* (32 ng / ml).

8.2- Rentats llargs:

8.2.1- Submergim el portaobjectes seqüencialment en tres cubetes Coplin amb 50% formamida durant 10 minuts cada una en un bany d'agitació a 45°C.

8.2.2- Passem el portaobjectes a una solució de 2xSSC a 45°C durant 10 minuts més.

8.2.3- Submergim el portaobjectes en una solució de 4xSSC/0.05% NP40 a 45°C 10 minuts.

8.2.4- Afegim 12 µl de DAPI amb solució *antifade* per realitzar la contratinció. La concentració de DAPI que utilitzem depèn del tipus de mostra que analitzem i de l'aparell d'anàlisi que utilitzem.

9- Captura i anàlisi al microscopi: Es captura un nombre d'imatges determinades en funció de les característiques del material i la sonda de DNA. En el cas de senyals puntuals sobre nuclis interfàsics, com per exemple les sondes específiques de locus o les sondes de DNA  $\alpha$ -satèl·lit,

s'estudia un mínim de 200 nuclis. És molt important saber distingir el nombre de senyals. Com a norma general, dos senyals seran interpretats com a tals quan la distància que els separi sigui igual o superior a 2/3 parts d'un d'ells. Si no és així, es considerarà un únic senyal. La duplicació dels senyals es pot deure a la descondensació del DNA o bé que la cèl·lula estigui en fase S tardana o G2, la qual cosa implica que el DNA ja estarà replicat. En el cas de l'estudi de metafases, ja sigui utilitzant sondes per marcar els 24 cromosomes o bé sondes de pintat cromosòmic específic, estudiarem un mínim de 10 metafases, i òptimament n'estudiarem fins a 25.

### 3.2.6. ASSAIG DE CÈL·LULES BINUCLEADES

L'estudi de les cèl·lules binucleades (CBMN, de l'anglès *cytokinesis-block micronucleus assay*) ha estat àmpliament utilitzat en assajos mutagènics per la detecció de l'efecte d'agents mutàgens mitjançant la identificació de micronuclis (Fenech *et al.*, 2003a; Fenech *et al.*, 2003b). La finalitat de l'ús d'aquesta tècnica en el treball experimental aquí presentat, és l'estudi del fenomen de l'aneuploïdia. L'aplicació de tècniques de FISH amb sondes de DNA centromèric específiques per a cromosomes i sondes pancentromèriques sobre cèl·lules binucleades, ens permet observar el mecanisme pel qual una cèl·lula filla presenta un guany o una pèrdua d'un cromosoma. L'aneuploïdia té l'origen en un problema de la segregació cromosòmica, i clàssicament existeixen dos mecanismes que la causen: la no-disjunció i la pèrdua anafàsica. La no-disjunció és el procés pel qual una de les cèl·lules filles presenta un cromosoma de més, mentre que la seva cèl·lula germana presenta un cromosoma de menys de la mateixa parella de cromosomes. Així, si sumem el total de senyals de centròmers de les dues cèl·lules filles per aquest cromosoma en concret, obtindrem el nombre de senyals corresponents a l'euploïdia de cada cèl·lula individual. El procés de no-disjunció originarà trisomies i monosomies. Per altra banda, si té lloc una pèrdua anafàsica, observarem que una cèl·lula filla ha perdut un cromosoma, però en aquest cas no l'ha heretat la seva cèl·lula germana, sinó que identificarem el senyal en l'interior d'un micronucli. Així, la pèrdua anafàsica originarà només monosomies.

Al mateix temps de l'observació del fenomen de l'aneuploïdia, també podem observar estructures anòmales del nucli (Figura 13). Aquestes estructures són: els micronuclis, els ponts anafàsics i les protuberàncies nuclears.

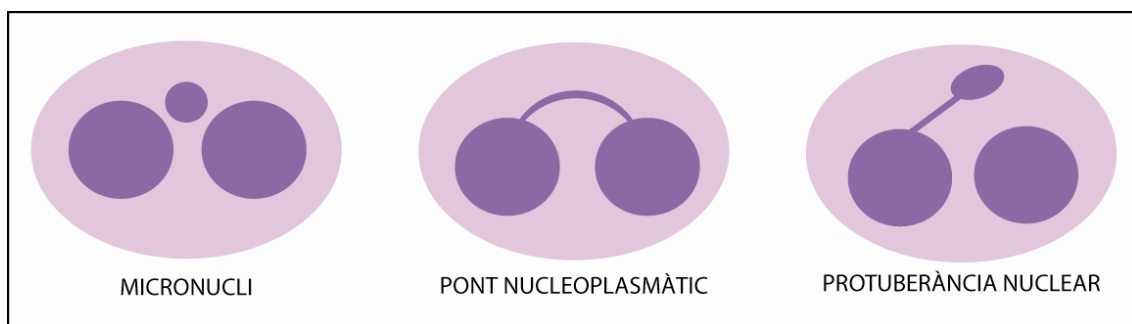
Un micronucli és un nucli petit separat del nucli principal i format en la telofase generalment per un cromosoma retardatari o uns quants, sencers o fragmentats

(Fenech, 2000). En la identificació i comptatge dels micronuclis hem de tenir en compte les següents característiques:

- i- Els micronuclis han de tenir la mateixa morfologia que el nucli principal, però el seu diàmetre ha de ser entre  $1/6$  i  $1/3$  respecte el diàmetre del nucli principal.
- ii- Els micronuclis no són refràctils, han de presentar la mateixa intensitat de tinció que el nucli principal.
- iii- Els micronuclis no poden estar connectats al nucli principal.
- iv- Els micronuclis poden tocar però no poden estar sobreposats al nucli principal.

Els ponts anafàsics o ponts nucleoplasmàtics són unions entre nuclis principalment causades per cromosomes dicèntrics els centròmers dels quals són desplaçats en pols oposats durant l'anafase. Generalment, l'amplada del pont nucleoplasmàtic no pot excedir  $1/4$  del diàmetre del nucli. Sovint, la presència de ponts nucleoplasmàtics va associada a la presència de micronuclis formats per fragments acèntrics els quals no segregaran en la placa mitòtica.

Les protuberàncies nuclears es defineixen com a expansions nuclears arrodonides o allargades de l'embolcall nuclear, connectades amb el nucli principal per filaments de material genètic.

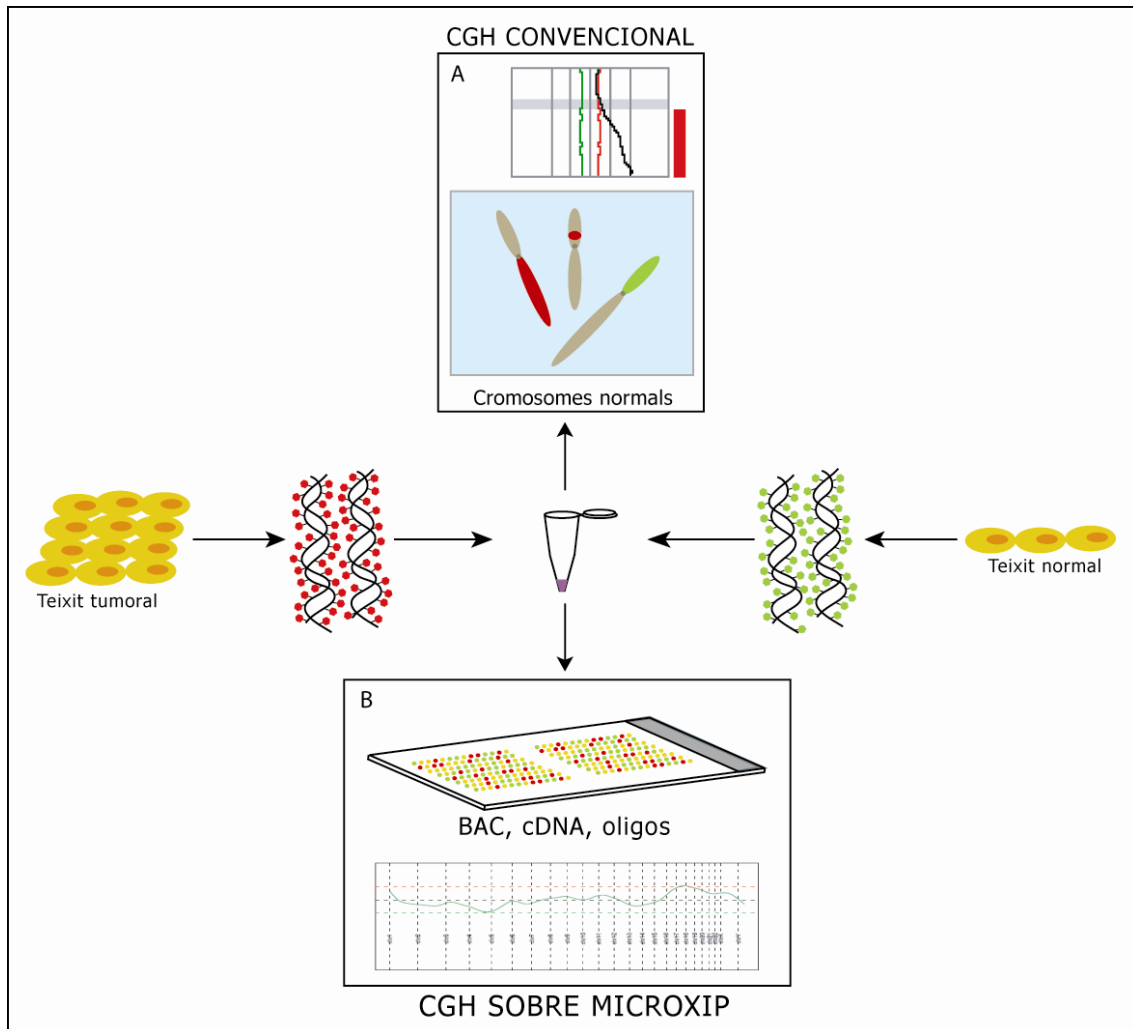


**Figura 13.** Esquema gràfic de les diferents estructures nuclears anòmales que es poden visualitzar mitjançant l'assaig de cèl·lules binucleades.

El protocol de FISH sobre cèl·lules binucleades manté els mateixos passos que el descrit a l'apartat anterior (veure apartat 3.2.5). Una diferència important és que el tractament enzimàtic és molt menys agressiu per tal de mantenir part del citoplasma que envolta la cèl·lula binucleada, la qual cosa ens permet la seva identificació quan estem realitzant l'anàlisi en el microscopi de fluorescència. En el nostre estudi vam comptar aproximadament 200 cèl·lules per cada ronda de FISH, utilitzant en cada una d'elles dues sondes per centròmers específics.

### 3.2.7. TÈCNIQUES D'ANÀLISI DEL GENOMA

Actualment, les tècniques que més eficientment permeten observar els desequilibris genòmics en un únic experiment són la hibridació genòmica comparada, aplicada sobre cromosomes o bé sobre matrius de seqüències de DNA (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema gràfic de la tècnica de (A) CGH convencional o sobre metafase, i (B) CGH sobre microxips.

#### 3.2.7.1. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA SOBRE METAFASE

##### A. Introducció a la tècnica

La hibridació genòmica comparada (CGH, de l'anglès *comparative genomic hybridization*) convencional va ser desenvolupada a principis dels anys 90 (Kallioniemi *et al.*, 1992). Aquesta tècnica permet l'anàlisi de guanys i pèrdues de DNA de tot el genoma en un sol experiment. Es basa en la hibridació simultània i competitiva d'un DNA problema i un DNA control marcats diferencialment sobre cromosomes metafàsics normals (Figura 14A). En aquesta hibridació, les diferències entre la unió

de les seqüències de DNA marcades amb fluorocroms diferents indiquen les regions del genoma que estan sobre- o infrarepresentades en la mostra problema. Un suport informàtic específic interpreta les diferents intensitats de fluorescència emeses, generant un perfil específic per cada cromosoma on s'hi indica les bandes guanyades i perdudes. En condicions de normalitat, la quantitat de DNA problema seria la mateixa que de DNA control, de manera que obtindríem un color homogeni amb un perfil normal. En condicions patològiques, si la mostra problema conté un guany de material genètic, observarem una major intensitat del fluorocrom amb què haguem marcat el DNA problema respecte el DNA control, i conseqüentment el perfil es veurà desviat cap a la dreta. Contràriament, si la mostra problema presenta una pèrdua de material genètic, observarem una major intensitat del fluorocrom amb què haguem marcat el DNA control, i el perfil es veurà desviat cap a l'esquerra. El programa informàtic d'anàlisi elabora un perfil mig final per cada cromosoma indicant els guanys i pèrdues en funció d'uns límits fixes o bé d'uns límits establerts a partir d'una desviació estàndard que genera el propi programa informàtic. Recentment, s'ha desenvolupat la CGH d'alta resolució, en la qual el propi sistema informàtic corregeix automàticament les intensitats no reals del fluorocrom, determinant les regions que s'han d'excloure.

Aplicacions de la tècnica de CGH:

- Detecció de desequilibris cromosòmics.
- Caracterització de llocs recurrents de reorganitzacions genòmiques desequilibrades.
- Anàlisi de la progressió i l'evolució clonal dels tumors.
- Classificació de tumors.
- Diagnòstic i pronòstic de determinats tipus de tumors.

Avantatges:

- Permet estudiar de forma simultània i en un sol experiment la totalitat de canvis en el nombre de còpies de DNA presents en el genoma.
- A diferència de la citogenètica clàssica o tècniques de FISH, no necessitem realitzar cap cultiu cel·lular, la qual cosa ens permet superar un dels passos limitants en l'estudi dels tumors sòlids.
- Es requereix poca quantitat de DNA (500 ng – 1 µg).
- Gràcies a les tècniques que permeten l'amplificació de tot el genoma (ex: DOP-PCR), podem aconseguir realitzar la CGH de petits grups cel·lulars obtinguts amb microdissecció.
- Podem utilitzar el DNA de mostres que hagin estat incloses en blocs de parafina per a la realització d'estudis retrospectius.

#### Desavantatges:

- La resolució de la CGH és de 10-20 Mb per delecions, 3-5 Mb per guanys i de 2-4 Mb per amplificacions (Kallioniemi *et al.*, 1994).
- No detecta alteracions cromosòmiques equilibrades, inversions ni reorganitzacions cromosòmiques petites.
- Les regions centromèriques, telomèriques i regions heterocromàtiques no les podem valorar per CGH ja que sovint resulten ser falsos positius. Tampoc es poden valorar les regions 1p, 9q34, 11q13, 12q24, 16, 19 i 22, les quals són riques en GC i amb una elevada densitat gènica (el-Rifai *et al.*, 1997). Aquestes regions de falsos positius poden variar en funció del marcatge de DNA que utilitzem (Larramendy *et al.*, 1998).
- No ens informa de la ploïdia de les cèl·lules que estudiem, ja que la quantitat de DNA de la mostra tumoral s'igualava amb el DNA control per tal de poder ésser comparades.
- Detecta canvis clonals només quan aquests estan presents en la majoria de cèl·lules que s'estudien. Així, en mostres de tumors on pot haverhi contaminació amb teixit normal, es requereix que entre el 60 i 70 % de la mostra siguin cèl·lules tumorals. Per altra banda, en tumors amb múltiples subpoblacions cel·lulars, la CGH no detectarà alteracions clonals que apareixen en les subpoblacions minoritàries.

#### B. Reactius i equipament

- *Kit Nick Translation* (Vysis, Inc.)
- SpectrumGreen i SpectrumRed dUTP (Vysis, Inc.)
- Marcador de DNA Ready to Load™ de 100 pb (Invitrogen)
- DNA Cot-1 humà (Vysis, Inc.)
- Portaobjectes amb metafases normals (Vysis, Inc.)
- Acetat sòdic 3 M pH 5,5
- Formamida (Riedel de Hæn)
- Formamida desionitzada
- Solució de Màster Mix
- 20xSSC pH 5
- 2xSSC
- 0,4xSSC
- Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich))
- DAPI (Sigma-Aldrich)



- Vectashield (Vysis, Inc.)
- Microcentrífuga
- Vòrtex
- Bany
- Cubetes Coplin
- Incubador 37°C
- Micropipetes 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Microscopi de fluorescència (Olympus BX-50)
- Càmera digital CCD (Photometrix Sensys / Olympus U-SPT)
- Paquet informàtic per la captura i anàlisi de les imatges (Metasystems)

#### Solucions de treball

- Màster Mix (20% dextrà sulfat): 2 g dextrà sulfat  
1 ml 20xSSC  
9 ml aigua desionitzada
- Formamida 70%: 49 ml formamida  
7 ml 20xSSC (pH 5,3)  
14 ml aigua desionitzada  
Ajustar el pH a 7-7,5
- 0.4xSSC/0.3% NP-40: 20 ml 20xSSC  
950 ml aigua desionitzada  
3 ml NP-40  
Ajustar a pH 7-7,5  
Ajustar a volum final 1l
- 2xSSC/0.1% NP-40: 100 ml 20xSSC  
850 ml aigua desionitzada  
1 ml NP-40  
Ajustar a pH 7-7,5  
Ajustar fins a volum d'1 l

### C. Protocol

#### 1- Marcatge de la sonda de DNA

##### 1.1- Preparació de la mescla (Taula 10).

**Taula 10.** Barreja de reacció per realitzar el marcatge de DNA mitjançant *Nick Translation*

Reactius	Volum de treball	Solucions de treball
dTTP (0,1 mM)	5 µl	10 µl 0.3 mM dTTP + 20 ml H <sub>2</sub> O lliure de nucleases
Nick Translation Buffer 10X	5 µl	500 mM Tris-HCl, pH 7,2; 100 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 mM DTT <sup>(1)</sup>
dNTP mix (0,1 mM c/u, dATP, dCTP, dGTP)	10 µl	10µl de cada 0.3 mM dATP, dCTP i dGTP
H <sub>2</sub> O lliure de nucleases	(22,5-X) µl	
DNA (900 ng)	X µl	(X = 900 ng <sup>(2)</sup> / [DNA] (ng/µl))
SpectrumGreen o SpectrumRed-dUTP (0,2 mM)	2,5 µl	SpectrumGreen: 10 µl 1 mM dUTP + 40 µl H <sub>2</sub> O lliure de nucleases SpectrumRed: 10 µl 1 mM dUTP + 40 µl H <sub>2</sub> O lliure de nucleases
Enzim <i>Nick Translation</i> <sup>(1)</sup>	5 µl	DNA polimerasa I, DNasa I en 50% glicerol; 50 mM Tris-HCl pH7,2; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,1 mM DDT; 0,5 mg/ml nucleasa lliure d'albumina sèrica bovina <sup>(1)</sup>
<b>Volum total</b>	<b>50 µl</b>	

(1) Aquests reactius venen preparats directament de la casa Vysis, Inc.

(2) Quantitats entre 600-900 ng també han estat utilitzades per realitzar la CGH.

##### 1.2- *Spin* de centrifuga.

1.3- Deixar la reacció enzimàtica 1 hora 30 minuts al bany a 15°C. És necessari estar atent a què la temperatura no variï molt al llarg d'aquest temps (s'aconsella realitzar aquests passos en una cambra fosca).

1.4- Parar la reacció posant els tubs 10 minuts a 70°C.

1.5- Deixar els tubs en gel com a mínim 15 minuts (Possible punt de parada del protocol).

1.6- Córre 9 µl de cada tub + 1 µl tampó de càrrega en el gel d'agarosa 1% (l'*smear* ha de quedar entre 300 i 3000 pb segons el marcador de 100 pb). Aquest gel serveix per comprovar que l'enzim de la *Nick Translation* hagi tallat correctament el DNA, d'aquesta manera assegurem que el marcatge hagi estat el correcte.

#### 2- Precipitació de les sondes

2.1- (Treballar a la cambra fosca) Barrejar el DNA control i el DNA tumoral en un mateix tub.

2.2- Afegir 10 µl de DNA Cot-1 humà (10 ng). El DNA Cot-1 bloqueja l'heterocromatina, així evitem que el DNA pugui hibridar

inespecíficament en zones d'heterocromatina que no ens resulten informatives.

- 2.3- Afegir 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5,5.
- 2.4- Afegir 2.5 volums d'etanol fred 100% i invertir. Aquests dos passos s'han de fer consecutius per cada tub; intentar deixar la gota d'acetat sòdic a la paret del tub i després arrossegar-la quan hi afegim l'etanol.
- 2.5- Agitar manualment.
- 2.6- Deixar precipitar el DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$  un mínim de 15 minuts (com més temps es pugui millor). (Possible punt de parada del protocol).
- 2.7- Centrifugar 30 minuts a 12.000 r.p.m.
- 2.8- Decantar el sobrenedant i eixugar l'etanol que hagi pogut quedar per les parets del tub mirant de no tocar el botó de DNA. El tub obert es deixa a l'estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durant 8 minuts per facilitar l'evaporació de l'alcohol.
- 2.9- Traiem els tubs de l'estufa i resuspenem el botó de DNA amb  $12\ \mu\text{l}$  de solució A o tampó d'hibridació: 50% formamida desionitzada + 50% Màster Mix). Spin de centrifuga.
- 2.10- Deixar els tubs a temperatura ambient a la cambra fosca fins el moment de desnaturalitzar.
- 3- Desnaturalització del portaobjectes.
  - 3.1- Marquem la part inferior del portaobjectes amb un llapis de diamant per tal de seleccionar les àrees d'hibridació.
  - 3.2- Desnaturalitzar el porta 5 minuts amb solució desnaturalitzant a  $74^{\circ}\text{C}$
  - 3.3- Deshidratar els portes amb una sèrie d'etanols freds (70, 90 i 100%) un minut en cada un.
  - 3.4- Deixar assecar a l'aire per evaporar l'etanol. Ens podem ajudar d'un ventilador o assecador.
- 4- Desnaturalització de la sonda: Dipositar el tub *ependorf* amb el DNA sonda en el bany a  $74^{\circ}\text{C}$  durant 8 minuts.
- 5- Muntatge del portaobjectes: Pipetejar el volum de sonda desnaturalitzada de dins l'*ependorf* ( $12\ \mu\text{l}$ ) i deixar-la sobre el portaobjectes. Una gota a cada meitat del porta i cobrir amb un cobreobjectes ( $22 \times 22\ \text{mm}$ ) per cada meitat del porta. Intentem treure les bombolles d'aire amb l'ajut d'unes puntes. Segellem tot el voltant del cobreobjectes amb cola, vigilant que no hi entri aire.
- 6- Hibridació: Deixem hibridar la preparació durant 36-72 hores a l'estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  en una cambra humida.

- 7- Rentats posthibridació.
  - 7.1- Treure la cola i el cobreobjectes.
  - 7.2- Deixar el portaobjectes 2 minuts en la solució 0.4xSSC calenta a 74°C procurant agitar-lo.
  - 7.3- Deixar el portaobjectes 2 minuts en solució 2xSSC/0.1% NP40 a temperatura ambient.
  - 7.4- Deixar assecar el portaobjectes a l'aire.
  - 7.5- Posar 12 µl de solució DAPI (125 ng/ml) a cada meitat del porta.
- 8- Observació al microscopi, anàlisi i interpretació dels resultats: Per la captura s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Olympus B-X50 (Olympus Optical, CO., Hamburg, Germany) equipat amb els següents filtres específics: U-MNIBA (FITC), U-MWIY (TexasRed) i U-MNU (DAPI), acoplat a una càmera digital (CCD, de l'anglès *coupled cooled device*) d'alta sensibilitat (Photometrix Sensys / Olympus U-SPT) connectada a un ordinador amb el programa informàtic de captura i anàlisi de dades específic per CGH Metasystems (Altussheim, Germany).

D'acord amb els criteris proposats per Kallioniemi i col (1994), l'anàlisi d'una determinada mostra implicarà la captura de 10-15 metafases de condensació cromosòmica semblant (400-500 bandes), ben extenses, amb el mínim d'entrecruaments cromosòmics, sense material citoplasmàtic o soroll de fons que pugui afectar l'anàlisi, amb un patró d'hibridació uniforme i no granulós, i amb una intensitat de fluorescència equivalent per cada fluorocrom (du Manoir *et al.*, 1995).

El sistema d'anàlisi redueix al màxim el soroll de fons i integra les intensitats dels dos fluorocroms per tal d'obtenir un relació entre ells (*ratio*). Aquesta *ratio* es calcula per tot el genoma, des d'1p fins a Xq. Quan el valor de la *ratio* és 1, es considera que la quantitat de DNA de la mostra problema és igual a la quantitat de DNA del control. Una *ratio* per sobre d'1,25 implicaria un guany de DNA en la mostra problema, mentre que si la *ratio* estigués per sota de 0,75 indicaria que la mostra problema ha patit una pèrdua de material genètic. L'interval de confiança utilitzat ha estat del 95%. Últimament, gràcies a programes d'anàlisi més acurats, aquests valors de tall fixes poden ser substituïts per uns valors de tall depenents d'una desviació estàndard que calcula el mateix programa informàtic en funció de les intensitats específiques de cada cromosoma en cada metafase. Per tal d'analitzar la significància de les alteracions cromosòmiques observades es va utilitzar el paquet estadístic SPSS 12.OS for Windows.

### 3.2.7.2. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA SOBRE MICROXIPS

#### A. Introducció a la tècnica

De la mateixa manera que en la CGH convencional o CGH sobre metafase, marquem el DNA de les cèl·lules tumorals i el de les cèl·lules normals amb fluorocroms diferents i el fragmentem mitjançant enzims de restricció. La mescla d'ambdós DNAs s'hibrida sobre microxips que contenen BACs (Ishkanian *et al.*, 2004), cDNA (Pollack *et al.*, 1999) o oligonucleòtids (Huang *et al.*, 2004), i que cobreixen parcial (ex: (Monni *et al.*, 2001) o totalment (ex: (Wilhelm *et al.*, 2002) el genoma humà a diferents resolucions. L'escanejat de la mostra mitjançant aparells altament desenvolupats permet mesurar la intensitat dels dos canals de fluorocroms per cada punt del microxip, i un programa informàtic defineix una ratio numèrica resultant de les diferències del número de còpies de DNA per una seqüència específica entre les cèl·lules tumorals i les normals (Figura 14B). Comparada amb la CGH en metafase, la CGH en microxips aporta una major especificitat i sensibilitat. La resolució d'aquesta tècnica oscil·la entre 100 kb i 1 Mb.

#### B. Reactius i equipament

- Enzims de restricció Alu 1 i Rsa 1 (Sigma-Aldrich)
- dNTP Set, 100 mM *Solutions* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 4 x 100 µmol (Amersham Pharmacia Biotech)
- tRNA de llevat (200 U/100 mg) (Sigma-Aldrich)
- poli-dA (40-60-mers) (Amersham Pharmacia Biotech)
- poli-dT (12-18-mers) (Amersham Pharmacia Biotech)
- Cy3-dUTP i Cy5-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech)
- RadPrime DNA Labeling System (Gibco BRL)
- Tampó TE (TrisHCl-EDTA)
- EDTA
- Fenol (Sigma-Aldrich)
- Cloroform (Sigma-Aldrich)
- Alcohol isoamílic
- Acetat sòdic 3 M pH 5,2
- Etanol
- Columnes Microcon YM-30 (Millipore)
- Centrifuga (Sorvall)
- Aparell de PCR
- Microcentrífuga refrigerada (Eppendorf)
- Vòrtex

#### Solucions de treball

- 10X dNTP:      12 ml de dATP  
                     12 ml de dGTP  
                     12 ml de dCTP  
                     6 ml de dTTP  
                     958 ml de tampó TE pH 8,0
- 0,1% SDS (2 ml 10% SDS + 198 ml H<sub>2</sub>O desionitzada)
- 0,5xSSC / 0,01% SDS (5 ml 20xSSC + 200 µl 10% SDS + 194,8 ml H<sub>2</sub>O desionitzada)
- 0,06xSSC (600 µl 20xSSC + 199,4 ml H<sub>2</sub>O desionitzada)

### C. Protocol

Protocol específic pels xips Human 1 cDNA Microarray Kit de la casa comercial Agilent Technologies. Aquesta plataforma conté clons per aproximadament 13.000 gens.

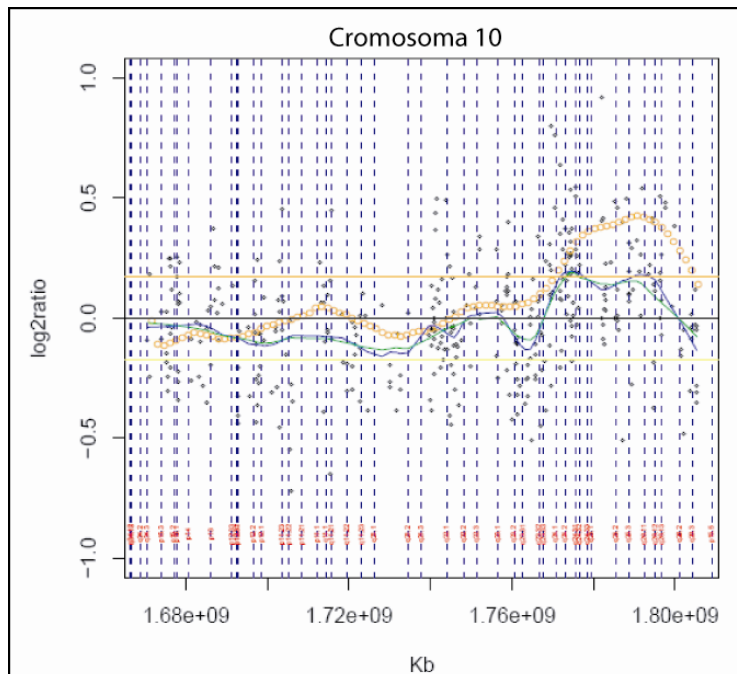
- 1- L'obtenció del DNA es realitza mitjançant el mètode de fenol-cloroform, tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior.
- 2- Mesurem la concentració del DNA amb espectrofotòmetre, i es corre un gel d'agarosa per comprovar la qualitat del DNA. Si les condicions del DNA són òptimes es pot continuar el procés.
- 3- Digestió: Partim del DNA de la mostra i del DNA control en tubs *ependorfs* separats.
  - 3.1- 20 µg de DNA.
  - 3.2- Afegim 10 µl de tampó SA 10X.
  - 3.3- Afegim 2,5 µl d'enzim Alu 1 (10 U/µl).
  - 3.4- Afegim 2,5 µl d'enzim Rsa 1 (10 U/µl).
  - 3.5- Afegim H<sub>2</sub>O desionitzada fins a un volum total de 100 µl.
  - 3.6- Incubem les mostres durant 12 hores a 37°C.
- 4- Purificació: El procés de purificació es realitza segons el mètode de fenol-cloroform.
  - 4.1- Afegim 100 µl de fenol-cloroform-àlcool isoamílic en una relació de 25:24:1. Ho barregem utilitzant el vòrtex.
  - 4.2- Centrifugam 5 minuts a 10.000 G. Transferim la fase superior en un nou tub. Repetir els passos 4.1 i 4.2 una o dues vegades.
  - 4.3- La precipitació del DNA es realitza afegint 1/10 part del volum d'acetat sòdic 3 M pH 5,2 i 2 volums etanol absolut fred. Barrejar al vòrtex i fer un pols de centrifuga.
  - 4.4- Es deixa incubar 2 hores a -20°C (o O/N)
  - 4.5- Centrifuguem 30 minuts a 12.000 G a -4°C

- 4.6- S'eliminen les restes d'etanol i s'afegeixen 0,5 ml d'etanol fred al 70%.
- 4.7- Centrifuguem 15 minuts a 12.000 G i eliminem l'etanol cuidadosament.
- 4.8- Es deixa assecat el botó de DNA a l'estufa a 55°C.
- 4.9- S'afegeix 35 µl d'aigua estèril, i es deixa dissoldre a la nevera 12 hores.
- 5- En aquest punt, prèviament al marcatge, s'ha de mesurar la concentració de DNA ja que durant el procés de purificació i precipitació es perd material. És adient que utilitzem el mateix aparell que hem utilitzat en la primera mesura.
- 6- Marcatge del DNA:
  - 6.1- Partim de 6 µg de DNA tumoral i de 6 µg de DNA de referència. Dividim els 6 µg en tres tubs de PCR.
  - 6.2- A cada tub afegim H<sub>2</sub>O desionitzada fins arribar a un volum de 21 µl.
  - 6.3- Afegim 20 µl de tampó 2,5X *Random-primer buffer mix*.
  - 6.4- Incubar 5 minuts a 98°C en un aparell de PCR. Transferir immediatament en gel una vegada hagi finalitzat el programa.
  - 6.5- Afegim a cada tub:
    - 5 µl de solució 10x dNTP
    - 3 µl de fluorocrom Cy5 en el DNA tumoral i Cy3 en el DNA referència.
    - 1 µl de l'enzim Klenow-DNA-polymerase (40 U/µl)
  - 6.6- Els tubs s'incuben 2 hores a 37°C en un aparell de PCR.
  - 6.7- Transferim les mostres en tubs *ependorfs* i afegim 5 ml d'EDTA 0,5 M pH 8 i 450 µl de tampó TE pH 7,4.
  - 6.8- Transferim les mostres a tres columnes Microcon 30 i centrifuguem 10 minuts a 8000 G. Ajustem el volum final a 20-40 µl en successives centrifugacions d'1 minut cada una. Invertim la columna, la dipositem en un nou tub, i facilitem que el volum que hi resta baixi al tub centrifugant 1 minut a 9000 G.
  - 6.9- En aquest moment combinem els volums de mostra marcada amb Cy5 amb els marcats amb Cy3, de manera que ens quedem amb 3 tubs.
  - 6.10- En cada tub afegim:
    - 50 µl de DNA Cot-1 humà
    - 5 µl de tRNA de llevat (20 µg/µl)
    - 4 µl de poli-dA (5 mg/ml)
    - 40 µl de poli-dT (500 µg/ml)
    - 450 µl de tampó TE pH 7,4

- 6.11- Transferim les mostres a quatre columnes Microcon 30 i centrifuguem 10 minuts a 8000 G. Ajustem el volum a 15-25  $\mu$ l. Invertim les columnes i obtenim la mostra en nous tubs centrifugant 1 minut a 9000 G. Ajuntem els volums des quatre tubs en solament un.
- 6.12- Transferim el volum d'aquest tub en una altra columna Microcon 30 i centrifuguem 2 minuts a 8000 G per ajustar a un volum final de 25  $\mu$ l. Invertim la columna i obtenim la mostra en nous tubs centrifugant 1 minut a 9000 G. Transferir el volum del tub a un tub de PCR.
- 6.13- Afegim 5,3  $\mu$ l de 20xSSC i 0,9  $\mu$ l de 10% SDS.
- 6.14- Els tubs es sotmeten a una temperatura de 100 °C durant 1,5 minuts i després s'incuben 30 minuts a 37°C en un aparell de PCR.
- 6.15- Centrifuguem durant 5 minuts a 16.000 G i transferim el sobrenedant a un tub net.
- 7- Hibridació:
  - 7.1- Es dipositen 25 ml del volum de la mostra sobre el microxip. S'hi situa un cobreobjectes amb molt de compte de no friccionar la superfície del microxip on hi ha les seqüències de DNA diana.
  - 7.2- Afegim 15 ml de 3xSSC en els pous laterals de la cambra d'hibridació.
  - 7.3- La cambra d'hibridació es tanca hermèticament,
  - 7.4- S'incuba en un bany a 65°C durant 17 hores en foscor.
- 8- Rentats posthibridació: Els rentats es realitzen en condicions estèrils i en constant agitació.
  - 8.1- Submergir el microxip en 0,1% SDS fins que el cobreobjectes caigui. A partir de llavors, deixar-ho incubar durant 3 minuts.
  - 8.2- Transferir el microxip a una solució de 0,5xSSC / 0,01% SDS durant 5 minuts.
  - 8.3- Transferir el microxip a una solució de 0,06xSSC durant 2 minuts
  - 8.4- Finalment, centrifuguem el portaobjectes 2 minuts a 400 G per tal d'assecar-lo completament.
- 9- Escanejat i anàlisi: El microxip va ser escanejat amb un escàner confocal (Agilent, G256AA). Les imatges dels microxips es van analitzar amb el paquet informàtic *Feature Extraction* (v. 6.1.1, Agilent Technologies), utilitzant una adaptació de la corba de regressió lineal localment ponderada. Cada punt del microxip és escanejat i s'obté un quocient entre el valor de fluorescència de Cy5 i de Cy3. Valors superiors a 1,3 indiquen guany mentre que valors inferiors a 0,7 indiquen pèrdues. Aquests valors es mostren en una taula conjuntament amb dades de cada seqüència del microxip com la



GeneBank ID, UniGene Cluster ID, i el nom del gen, entre altres. Se seleccionen aproximadament 10.080 punts, els quals contenen una posició coneguda en el genoma humà segons la informació disponible en el *Genome Browser Database* de la Universitat de Califòrnia a Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>, April 2003 freeze). Es va utilitzar el programa informàtic LOWESS com a eina complementària al *Feature Extraction* per tal de visualitzar millor les alteracions genòmiques donada l'elevada densitat de punts per cromosoma. Aquest programa genera un perfil aplanat segons una "f" igual a 0,2. Aquests paràmetres van ser determinats també per les dades crues de la CGH sobre metafase, la qual cosa ens va permetre analitzar els dos perfils en una mateixa gràfica (Figure 15). Per identificar alteracions en el nombre de còpies del genoma estadísticament significatives, es va definir la variació en el nombre de còpies com el  $\log_2 \pm 2$  desviacions estàndards de la meitat del 50% del quantil de dades. També vam utilitzar un algoritme de segmentació estadística anomenada segmentació circular binària, la qual analitza el quocient dels punts segons una mitjana similar tenint en compte la variació estàndard. Aquest algoritme treballa analitzant cromosoma per cromosoma, trobant la millor segmentació per cadascun.



**Figura 15.** Exemple del solapament dels perfils de la CGH sobre metafase i la CGH sobre microxip pel cromosoma 10 en la línia cel·lular HCT-116.

### **3.2.8. NOMENCLATURA CITOGÈNÈTICA**

La descripció dels cariotips caracteritzats al llarg d'aquesta tesi ha estat elaborada seguint les instruccions descrites al ISCN (*International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature 1995*).

#### **4. RESULTATS**

<< Moltes hores de camí i, suposant que hi hagi èxit, moltes hores pacients en una postura no massa còmoda. Hores sense enraonar i sense fer moviments bruscos. Hores per obtenir, en ocasions, un fruit escàs, una simple dada que afegida a moltes altres permet esbrinar com són i com es comporten aquests animals fins aleshores tan desconeguts.>>

(Jordi Sabater Pi, *El traç de la natura*)

Els resultats del treball experimental que han permès l'elaboració d'aquesta tesi doctoral estan breument resumits en les primeres pàgines d'aquest capítol i estan exposats en les publicacions originals subsegüents.

Una part important del treball ha estat basat en l'ús de línies cel·lulars humanes. En el cas del càncer de còlon, existeixen una sèrie de línies cel·lulars acceptades com a arquetip o model dels diferents tipus d'instabilitat genòmica. Una de les línies més utilitzades com a model d'instabilitat cromosòmica és la línia cel·lular SW480. Per tal d'aprofundir en l'estudi de la instabilitat cromosòmica utilitzant aquesta línia cel·lular, vam creure convenient realitzar el cariotip molecular més acurat possible utilitzant unes eines citogenètiques que s'acabaven de desenvolupar feia molt poc temps. Concretament, m'estic referint a la M-FISH, però sobretot a la tècnica cenM-FISH i mMCB. Aquestes dues últimes tècniques van ser desenvolupades per superar les limitacions de resolució de les tècniques de pintat cromosòmic específic per cada parella de cromosomes. L'aplicació d'aquestes tècniques en l'estudi de la línia cel·lular SW480 va donar lloc al **Treball I**, en el qual es descriuen alteracions que prèviament no havien estat identificades, i alhora s'ajusta molt més la definició dels punts de trencament i regions reorganitzades de poques megabases. La tècnica de cenM-FISH ens va permetre identificar la presència de cromosomes dicèntrics estables que molt probablement han patit la inactivació d'un centròmer però que són altament orientatius de l'origen de la reorganització cromosòmica i suggerents d'una elevada instabilitat cromosòmica. El paper d'aquests cromosomes dicèntrics críptics en el context de la instabilitat cromosòmica serà argumentat més detalladament en l'apartat 5.3.2.

Una vegada dominàvem les tècniques citogenètiques per realitzar els cariotips moleculars, vam utilitzar el model de les línies de càncer de còlon KM12 com a model cel·lular de la progressió des de carcinoma a metastasi (**Treball II**). Vam enfocar l'estudi en la interrelació entre la instabilitat de microsatèl·lits i la instabilitat cromosòmica, conclouent que ambdós subtipus d'instabilitats no eren excloents i que podien coexistir en una mateixa cèl·lula. Aquest model cel·lular també ens va servir per demostrar l'evolució cariotípica de les cèl·lules originàries del tumor de còlon primari i les poblacions derivades que donen lloc a la metastasi a fetge. En aquesta part de l'estudi vam poder concloure que la tetraploïdia era un fenomen genotípic clau per explicar les condicions fenotípiques i que existien unes reorganitzacions cromosòmiques fundadores clonals que s'originaven en el tumor primari i que perduraven en la forma metastàtica.

La imprecisió per mesurar la instabilitat cromosòmica demostrada fins al moment a la literatura ens va portar a l'elaboració del **Treball III**. Mitjançant tècniques de citogenètica molecular vam quantificar la instabilitat cromosòmica, tant la numèrica

com l'estructural, de dues línies cel·lulars de càncer de còlon, la HCT-116, amb inestabilitat de microsatèl·lits, i la SW480, amb elevada inestabilitat cromosòmica. L'estudi dels subclons de la línia SW480 queda justificat per la possible semblança a les condicions selectives que pot patir una cèl·lula tumoral *in vivo* quan es disposa o està capacitada per migrar des del tumor inicial a òrgans distants. Per abordar la inestabilitat estructural, ens vam centrar en l'estudi de les alteracions cromosòmiques estructurals no clonals, la qual cosa ens donava una idea de la taxa de reorganitzacions que les cèl·lules patien a pesar que aquestes no quedessin fixades en el cariotip cel·lular. Per altra banda, pel disseny experimental de l'estudi de la inestabilitat numèrica vam recórrer a una tècnica que sovint és molt utilitzada en estudis de mutagènesi. Concretament, m'estic referint a la tècnica d'obtenció de cèl·lules binucleades, sobre les qual hi vam aplicar sondes de DNA  $\alpha$ -satèl·lit marcades fluorescentment. Aquests experiments ens van donar una idea del dinamisme amb el qual les alteracions numèriques tenien lloc en la línia cel·lular SW480 i els seus subclons. Alhora, ens van permetre deduir quin era l'origen més freqüent de les aneuploidies en aquestes cèl·lules, la no-disjunció o la pèrdua anafàsica. L'anàlisi de les cèl·lules binucleades també ens va permetre estudiar els micronuclis, els ponts nucleoplasmàtics i les protuberàncies nuclears, estructures nuclears íntimament associades a la presència de reorganitzacions cromosòmiques i inestabilitat. La línia cel·lular HCT-116, cromosòmicament estable, presentava unes taxes d'alteracions estructurals i d'aneuploidia molt baixes. Els resultats d'aquest treball ens van permetre demostrar que la inestabilitat cromosòmica numèrica era invariable entre la línia cel·lular parental SW480 i els seus subclons, però per altra banda, la taxa d'inestabilitat cromosòmica estructural augmentava dràsticament quan es generaven els subclons a partir d'una sola cèl·lula. Aquests resultats explicarien l'heterogeneïtat estructural que presenten les cèl·lules tumorals *in vivo*, possible origen de les diferents subpoblacions cel·lulars, i l'elevada taxa d'aneuploidia, representada com a guanys i pèrdues de cromosomes.

Les diferències genòmiques entre els tumors que presenten inestabilitat cromosòmica i els que presenten inestabilitat de microsatèl·lits ens van conduir a realitzar el **Treball IV**. En aquest, vam utilitzar un espectre de tres tècniques per tenir una idea general de les alteracions genòmiques, tant comunes com específiques, que presentaven els dos grups de tumors. La hibridació genòmica comparada convencional (o sobre metafase) ens va aportar informació de les alteracions cromosòmiques (informació ja publicada per altres autors en la literatura), la hibridació genòmica comparada sobre microxips de cDNA va contribuir a donar una visió dels gens que més probablement podrien estar implicats en els guanys i pèrdues de DNA. Alteracions que ja mostrava la CGH sobre

metafase i que van ser corroborats amb més precisió per aquesta última tècnica. Finalment, i com a estudi pilot, vam analitzar les diferències entre els dos grups de tumors en funció del seu tipus d'inestabilitat a nivell d'expressió gènica utilitzant uns microxips d'elevada resolució que cobrien tot el genoma. A pesar del reduït nombre de mostres, sembla que clarament es podrien agrupar un conjunt de gens específics segons el tipus d'inestabilitat de les mostres. Aquest últim treball està pendent de ser revisat i modificat després de rebre les crítiques constructives de dos experts en la matèria.

---

#### **4.1. Treball I**

Camps J, Mrasek K, Prat E, Weise A, Starke H, Egozcue J, Miró R, Liehr T. Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol Rep.* 2004 Jun;**11**(6):1215-8.

Indexed by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 1,356

---

# Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480

JORDI CAMPS<sup>1</sup>, KRISTIN MRASEK<sup>2</sup>, ESTHER PRAT<sup>1</sup>, ANJA WEISE<sup>2</sup>, HEIKE STARKE<sup>2</sup>, JOSEP EGOZCUE<sup>1</sup>, ROSA MIRÓ<sup>1</sup> and THOMAS LIEHR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain;

<sup>2</sup>Institut für Humangenetik und Anthropologie, D-07740 Jena, Germany

Received December 4, 2003; Accepted January 30, 2004

**Abstract.** It has been demonstrated that 24-color FISH is not sufficient to understand completely the behaviour of chromosomal markers, especially in solid tumors. In the present study we show the usefulness of molecular cytogenetic techniques, such as multicolour banding (MCB) and centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH) performed on the colorectal cancer cell line SW480. Applying these approaches previously described chromosomal breakpoints could be redefined and six 'marker chromosomes' could be thoroughly characterised. Additionally, the cenM-FISH technique identified three stable dicentric chromosomes which have never been described before in SW480. In conclusion, here we present the first comprehensive characterisation of the complex karyotype of the colorectal cancer cell line SW480.

## Introduction

The colorectal cancer cell line SW480 was applied in ~500 studies according to a PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) search. Among others it served as a model for chromosome instability pattern (1,2), thus it is necessary to know its exact karyotype characteristics. Cytogenetic analyses of this cell line was carried out by several groups before, applying molecular cytogenetic techniques such as comparative genomic hybridisation (CGH) and multicolour FISH using whole chromosome painting probes (M-FISH and SKY) (3,4). In general, the results showed only little variation due to either clonal *in vitro* evolution or tedious differences in the interpretation. The only exception is the cell line used by Lengauer and co-workers (1) which seemed to be slightly different. As recently demonstrated, the application of

M-FISH or SKY combined with CGH and G-banding analyses is not sufficient to obtain a comprehensive characterisation of a complex karyotype (5). Thus, we applied in the present study for the first time a combinative approach of three molecular cytogenetic techniques: multitude FISH (M-FISH) (6), multitude multicolour banding (mMCB) (7) plus centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH) (8,9) to comprehensively characterise the karyotype of a cancer cell line.

## Materials and methods

Chromosomes of the colorectal cancer cell line SW480 (ATCC no. CCL-228) were obtained according to standard procedures. Molecular cytogenetics was done as previously described for the applied probe sets. Multitude FISH (M-FISH) was performed according to Senger and coworkers (10); multitude multicolour banding (mMCB) using all available MCB libraries (11) in one single hybridisation step was done as recently described by Weise and coworkers (7); centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH) (8) was applied using the modified probe set described in ref. 9.

## Results

After application of M-FISH (6,10) on chromosomes of SW480, to obtain an orientating classification of chromosomal rearrangements of the whole karyotype, we performed the so-called multitude multicolour banding (mMCB) probe set (7). The goal was to characterise exactly the breakpoints of chromosomal rearrangements and the orientation of rearranged chromosomal regions within the complex karyotype of SW480. The obtained results were aligned with those published before (Table I). To describe completely the karyotype of this cell line, we additionally applied the centromere-specific multicolour-FISH (cenM-FISH) probe set (8,9). CenM-FISH applied in cancer cytogenetics allows to study the behaviour of heterochromatic material in the genome of the cells; centromere amplifications (8,12) as well as dicentric chromosomes can easily be identified (Figs. 1-3).

The results of the study are summarised in Table I. Similar to other cell lines not all the chromosome aberrations appeared in 100% of the analysed cells. Thus, a composite

---

Correspondence to: Dr Thomas Liehr, Institut für Humangenetik und Anthropologie, Postfach, D-07740 Jena, Germany  
E-mail: i8lith@mti.uni-jena.de

**Key words:** colorectal cancer, multicolour-FISH



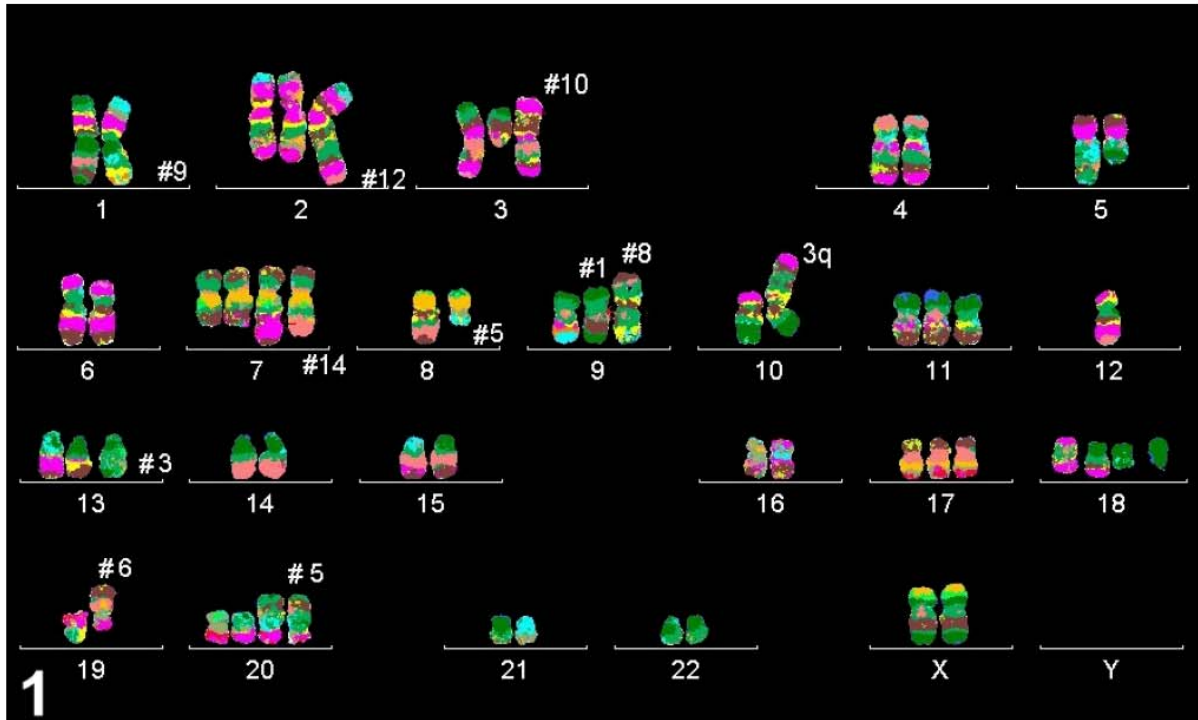


Figure 1. mMCB result for SW480, shown as pseudo-colour depiction. Fluorescence intensity ratios produced by the region-specific libraries along the chromosome longitudinal axis were used to assign pseudo-colours to chromosomal regions by means of the MetaSystems (isis) software (Altussheim, Germany) (for details [7; 11]). The detailed analysis of mMCB results was done by evaluating chromosome-region specific pseudo-colours and the corresponding fluorescence profiles. The mMCB pseudo-colours are repetitive on different chromosomes and their pattern is slightly variable as visible e.g. on the terminal pseudo-colour band in the p-arm of both normal chromosomes 2. However, chromosomal alterations in such regions can easily be excluded by evaluation the chromosome profiles (data not shown).

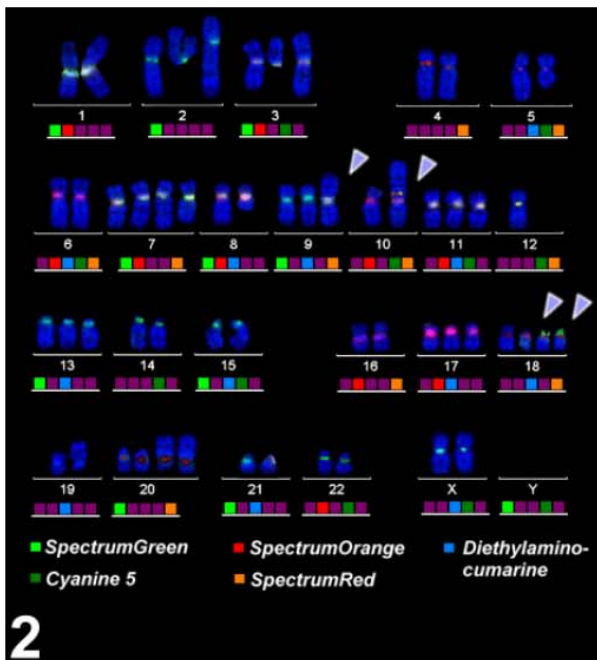


Figure 2. cenM-FISH result obtained for SW480; the dicentric chromosomes are marked with arrowheads. Instead of a pseudo-colour depiction an overlay of all 5 fluorochrome plus the counterstain (DAPI) channels is presented here. Thus, staining of some chromosomes seems to be similar, however, the corresponding fluorochromes applied are given in the five squares below each chromosome.

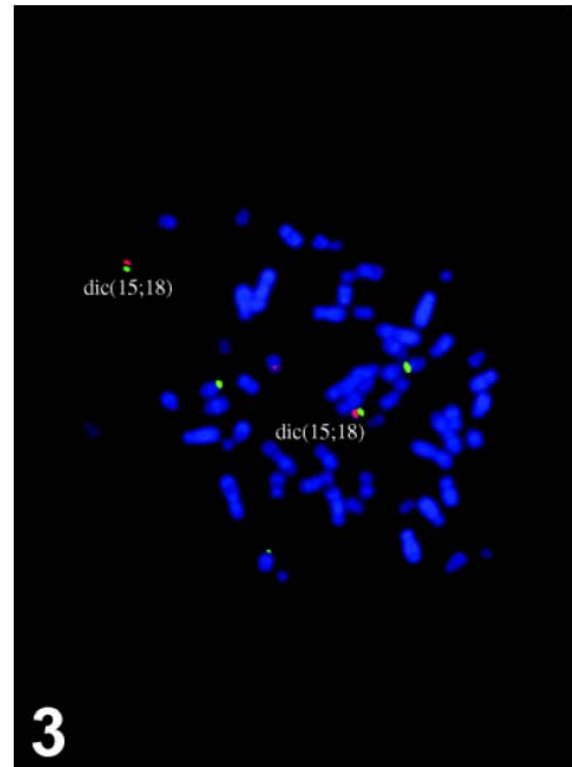


Figure 3. The cenM-FISH results for the dicentrics were confirmed by two-colour FISH - as example the dic(15;18) is shown.

Table I. Comparison among chromosomal markers of SW480 cell line obtained by multicolour banding and cenM-FISH, and the results characterised by means of SKY and M-FISH techniques.

Chromosome	SKY according to ref. 3	M-FISH <sup>a</sup>	MBC and cenM-FISH
1	der(1)t(1;9)(q12;q11)	der(1)t(1;9)(q12;q11)	der(1)t(1;9)(q21.1;q12)
2	der(2)t(2;12)(q24;q13)	der(2)t(2;12)(q37;q13)	der(2)t(2;12)(2pter→2q34::12q12→12qter)
3	del(3)(q11)	del(3)(q10)	del(3)(q12.1) der(3)t(3;10)(3qter→3p24::10p12→10pter)
4			
5	der(5)t(5;20)(q15;p12) der(5)t(5;20)(q11;??)	der(5)t(5;20)(q13;q13)	del(5)(q22)
7	der(7)t(7;13)(q22;q14)	der(7)t(7;13)(q32;q14)	der(7)dup(7pter→7q36.??::7q31.3→7qter)
8	der(7)t[inv(7);14] [(q22q36)(q22;q22)] der(8)t(8;9)(p11;q11)	der(7)t[inv(7);14] [(q22q36)(q22;q22)] der(8)t(8;9)(p11;q11)	der(7)t(7;14)(7pter→7q31::14q21→14qter) dic(8;9)(8qter→8p11::9p11→9qter) der(8)t(5;8)(8pter→8q21.1::5q?)
9	der(8)t(8;19)	der(8)t(8;19)(q12;??)	
9	der(9)t(1;9)(q12;q11)	der(9)t(1;9)(q12;q11)	der(9)t(1;9)(q21.1;q12)
10	der(10)t(3;10)(p13;p21)	der(10)t(3;10;12)(q13.2;p12;??)	dic(10;12)t(3;10;12)(3qter→3q13.3::12p11→12q11::10p14→10qter)
12	del(12)(q13)	del(12)(q13)	
13			der(13)t(3;13)(3pter→3p23::13q21→13pter)
18	del(18)(q12)	der(18)t(15;18)del(18)(q12)x2	dic(15;18)(15pter→15q11::18p11→18q21.1)(2x) i(18)(p10)
19	der(19)t(5;19;8;19)	der(19)t(5;19;8;19)	der(19)t(6;19)(6qter→6q22::19q13.1→19pter)
20		der(20)t(5;20)(q15;p12)x2	der(20)t(5;20)(5qter→5q22::20pter→20qter)x2

<sup>a</sup>Own M-FISH data.

karyotype is described according to the ISCN (13) after evaluating at least 10 metaphases by M-FISH, mMCB and cenM-FISH as follows: 57,XX,t(1;9)(q21.1;q12),+der(2)t(2;12)(2pter→2q34::12q12→12qter),del(3)(q12.1),+der(3)t(3;10)(3qter→3p24::10p12→10pter),del(5)(q22),+der(7)dup(7pter→7q36.??::7q31.3→7qter),+der(7)t(7;14)(7pter→7q31::14q21→14qter),der(8)t(5;8)(8pter→8q21.1::5q?)-9,+dic(8;9)(8qter→8p11::9p11→9qter),-10,-12,+dic(10;12)t(3;10;12)(3qter→3q13.3::12p11→12q11::10p14→10qter),+11,+der(13)t(3;13)(3pter→3p23::13q21→13pter),+17,+dic(15;18)(15pter→15q11::18p11→18q21.1)x2,i(18)(p10),der(19)t(6;19)(6qter→6q22::19q13.1→19pter),+der(20)t(5;20)(5qter→5q22::20pter→20qter)x2.

## Discussion

The SW480 karyotype contains 22 aberrant chromosomes and most alterations were unbalanced translocations. Small interstitial deletions or duplications were not detected, even though del(3) and the breakpoint of the deletion of

chromosome 18 could be described precisely. Only one chromosome alteration was cytogenetically balanced [i.e. t(1;9)]. New chromosome aberrations described by mMCB technique were: der(3)t(3;10)(3qter→3p24::10p12→10pter), del(5)(q22), der(7)dup(7pter→7q36.??::7q31.3→7qter), der(8)t(5;8)(8pter→8q21.1::5q?), der(13)t(3;13)(3pter→3p23::13q21→13pter), i(18)(p10) and der(19)t(6;19)(6qter→6q22::19q13.1→19pter). Breakpoints of the remaining chromosomal alterations were redefined (Table I).

Two chromosome markers appeared as duplicated in most of the cells. The observation of a 20% endoreduplicated cells could suggest that the origin of the polyploidy could be due to an endoreduplication process with the successive loss of chromosome and the formation of chromosome markers which became fixed in the karyotype. On the other hand, the high instability rate (data not shown) could also lead to fixed numerical and structural alteration without involving an endoreduplication process, resulting in the near-triploid mode. Then, the origin of duplicated markers might be a non-disjunction process.

The most interesting feature in the analysis of this cell line is the presence of dicentric chromosomes identified by cenM-FISH. We call them cryptic dicentrics, since they can not be identified by conventional staining techniques as two different primary constrictions. Thus, it is suggested that one of the centromeres of these dicentric chromosomes is inactivated. The mechanism of centromere inactivation is still partially unknown (reviewed in ref. 14). In the cases of dic(8;9)(8qter→8p11::9p11→9qter) and dic(15;18)(15pter→15q11::18p11→18q21.1) the inactivation of one centromere could be explained by its proximity to the other one, but this explanation would not be valid for the dic(10;12)t(3;10;12)(3qter→3q13.3::12p11→12q11::10p14→10qter) since both centromeres are slightly separate rather than nearby to each other. In this last case another inactivation mechanism could be involved. The inactivation of one centromere leads to fixing the translocation in the karyotype, and they may not be involved in breakage-fusion-bridge cycles. So, it is unlikely that these cryptic dicentric chromosomes make the karyotype of SW480 unstable. Further studies performing immuno-staining with antibodies against proteins belonging to CENP family would be required to elucidate the role of this heterochromatin material in such markers. It would also be useful to study these markers in order to improve our knowledge in the inactivation mechanisms of centromeres.

The cenM-FISH allowed to determine the unexpected breakpoints involved in such markers. For example, Melcher and co-workers (3) described the dic(8;9)(8qter→8p11::9p11→9qter) as der(8)t(8;9)(p11;q11), and they did not identify the presence of chromosome 12 material in the dic(10;12)t(3;10;12)(3qter→3q13.3::12p11→12q11::10p14→10qter). Abdel-Rahman and co-workers (4) were pioneers in identifying material of chromosome 12 involved in this rearrangement, but the limitations of the 24-color FISH technique using whole chromosome painting probes did not allow them to describe the  $\alpha$ -satellite DNA for chromosome 12. Finally, in all previous reports dic(15;18)(15pter→15q11::18p11→18q21.1) was described only as del(18)(q21.1), in spite of the detection of an unlabelled region in our experiments by M-FISH in 18p what suggested hybridisation characteristics common to heterochromatic regions.

Moreover, these dicentric chromosomes suggest the translocation evolutive pathway to obtain the present chromosome markers. For example, in dic(15;18)(15pter→15q11::18p11→18q21.1) we could hypothesise an ancestral translocation between chromosomes 15q and 18q. Afterwards, consecutive terminal deletions of chromosomes 15 and 18 reduced the translocated material until the described fragment sizes.

In conclusion, we report the necessity to apply the latest molecular cytogenetic techniques, such as FISH banding approaches like mMCB and cenM-FISH, to completely characterise structural chromosome alterations and define the rearrangement breakpoints involved. Together with 24-color FISH and CGH, they constitute a set of techniques extremely useful to describe solid tumor karyotypes.

## Acknowledgements

This research was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 00/81) and Generalitat de Catalunya (CIRIT 2001SGR-00201). It was also supported in parts by grants to T.L. by the Dr Robert Pflieger-Stiftung, the Wilhelm Sander-Stiftung (99.105.1-2), the Deutsche Krebshilfe/Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung (70-3125-Li1). J.C. and E.P. are supported by grants from the Universitat Autònoma de Barcelona and the IMIM, respectively.

## References

- Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-627, 1997.
- Ribas M, Masramon L, Aiza G, Capella G, Miro R and Peinado MA: The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J* 17: 289-291, 2003.
- Melcher R, Steinlein C, Feichtinger W, Muller CR, Menzel T, Luhrs H, Scheppach W and Schmid M: Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 88: 145-152, 2000.
- Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH and Edwards PA: Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2538-2543, 2001.
- Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U and Liehr T: Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multi-color banding. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 207-210, 2003.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S and Ward DC: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375, 1996.
- Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U and Liehr T: Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res* (In press).
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U and Liehr T: A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108: 199-204, 2001.
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, Navarro J and Benet J: Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 11: 879-883, 2003.
- Senger G, Chudoba I and Plesch A: Multicolor-FISH - the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *Bioforum* 9: 499-503, 1998.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A and Claussen U: Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9: 335-339, 2002.
- Neglia M, Bertoni L, Zoli W and Giulotto E: Amplification of the pericentromeric region of chromosome 1 in a newly established colon carcinoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 142: 99-106, 2003.
- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed). S. Karger, Basel, 1995.
- Warburton PE: Epigenetic analysis of kinetochore assembly on variant human centromeres. *Trends Genet* 17: 243-247, 2001.

---

#### **4.2. Treball II**

Camps J, Morales C, Prat E, Ribas M, Capellà G, Egozcue J, Peinado MA, Miró R. Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer*. 2004 Jul 20;110(6):869-74.

Indexed by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 4,416

---

## GENETIC EVOLUTION IN COLON CANCER KM12 CELLS AND METASTATIC DERIVATES

Jordi CAMPS<sup>1\*</sup>, Cristina MORALES<sup>2</sup>, Esther PRAT<sup>1</sup>, Maria RIBAS<sup>2</sup>, Gabriel CAPELLÀ<sup>3</sup>, Josep EGOZCUE<sup>1</sup>, Miguel A. PEINADO<sup>2</sup> and Rosa MIRÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

**So far, CRC cell lines have contributed to descriptions of 2 patterns of genetic instability, affecting either microsatellite sequences or chromosome number and structure. Often, these patterns are mutually exclusive; while near-diploid karyotypes usually appear with MSI and chromosomal stability, near-triploid or tetraploid cells display a high degree of CIN and are stable at the microsatellite level. In the present study, we describe the genomic instability pattern of KM12 CRC cells. KM12C and derived cell lines with different metastatic properties were analyzed by conventional cytogenetics, CGH and M-FISH. Results were compared to 5 cell lines usually used as model of MSI and CIN. Concordance between our results and previously published SKY data are also reviewed. Interestingly, the poorly metastatic KM12C cell line displayed a near-diploid karyotype with high levels of structural chromosome instability and microsatellite instability. The highly metastatic KM12SM and KM12L4A cell lines showed polyploid karyotypes and maintained CIN and MSI. A comparison between karyotypes of poorly and highly metastatic KM12 cell lines allowed us to delineate a cytogenetic evolution pathway. Our results clearly demonstrated that endoreduplication was the origin of the polyploid dosages in the highly metastatic forms following the monosomic model postulated for CRC. Therefore, we demonstrate that KM12C cells and their metastatic derivatives, KM12SM and KM12L4A, are a useful model of chromosomal evolution where MSI may coexist with CIN.**

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** colorectal cancer; chromosome evolution; chromosome instability; microsatellite instability

Most carcinomas show highly complex karyotypes, suggesting that one of the tumor-development events may be related to genomic instability.<sup>1,2</sup> Up to now, MSI has been the only type of genomic instability well characterized in a minority of tumors (about 15% of sporadic CRCs). These tumors show a deficiency in mismatch repair genes with a replication error phenotype and a stable near-diploid karyotype.<sup>3–7</sup> Chromosome instability has been described in some CRC cell lines, resulting in numerical changes<sup>8</sup> (CIN) or structural rearrangements.<sup>9</sup> Often, these patterns are mutually exclusive; while near-diploid karyotypes usually appear with MSI and chromosome instability, near-triploid or tetraploid cells display a high degree of CIN and are stable at the microsatellite level.

It has been postulated that primary alterations in solid tumors consist of submicroscopic mutations, whereas unbalanced chromosomal rearrangements, whether numerical or structural, are secondary events and most likely associated with selective pressures during tumor progression.<sup>10</sup> A previous report demonstrated clonal chromosomal aberrations in 87% of CRC tumors analyzed.<sup>11</sup> The most frequent numerical changes were, in order of decreasing frequency, +7, -18, -14, +13. Gain of chromosome 8q and loss of 8p, loss of 17p and gain of 17q as well as loss of the entire chromosome 22 are also unbalanced rearrangements that have been reported.<sup>11</sup> Based on cytogenetic alterations, Dutrillaux<sup>12</sup> proposed 3 different evolutionary pathways: monosomic-type tumors undergo structural rearrangements resulting in gains and losses of different chromosome arms and show a relatively high

rate of endoreduplication, leading to the formation of hypotetraploid clones that evolve to near-triploid cells; trisomic cells are characterized by tumors with a progressive increase in chromosome number but accompanied by a scarce number of rearrangements; tumors that display a near-normal karyotype and MSI were grouped into the normal type. Unbalanced chromosomal abnormalities would be secondary events and most likely associated with selective pressures during tumor progression.<sup>13</sup> Therefore, a role for structural chromosome instability in early tumor stages may be hypothesized, whereas observed numerical chromosomal alterations may represent a multistep convergent drift driven by selection.<sup>14</sup>

We analyzed the cytogenetic characteristics of chromosome instability in the CRC cell line KM12C and its metastatic counterparts, KM12SM and KM12L4A, using an array of molecular cytogenetic techniques. Five cell lines representing the archetypes of the 2 types of genetic instability and previously characterized by conventional cytogenetics and SKY were also analyzed by M-FISH and used as a control.<sup>15</sup> The model presented here is unique in that the 2 highly metastatic human colon cancer cell lines (KM12SM and KM12L4A) were derived from the parental, poorly metastatic cell line (KM12C) and, thus, are genetically related.

Structural chromosome instability is illustrated as the rate between number of nonclonal structural alterations (those that appear in single cells) and the number of metaphases analyzed. Finally, the combination of our data allowed us to describe patterns of chromosome instability.

---

The first 2 authors contributed equally to this work.

---

**Abbreviations:** CCD, charge-coupled device; CGH, comparative genomic hybridization; CIN, chromosome instability; CRC, colorectal cancer; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; hsr, homogeneous staining region; maxr, maximum rate; M-FISH, multicolor fluorescence *in situ* hybridization; MSI, microsatellite instability; p, cell culture passage; SKY, spectral karyotyping.

---

Grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología; Grant number: SAF 2000-081-C02-02; Grant sponsor: Generalitat de Catalunya; Grant number: CIRIT 2001SGR-00201.

---

\*Correspondence to: Laboratori de Citogenètica, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Fax: +34-93-5811025.  
E-mail: Jordi.Camps@uab.es

---

Received 7 August 2003; Revised 15 December 2003, 19 January 2004; Accepted 27 January 2004

---

DOI 10.1002/ijc.20195  
Published online 24 March 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

## MATERIAL AND METHODS

KM12C, KM12SM and KM12L4A are CRC cell lines established from carcinoma and liver metastases selected for varying metastatic potential in nude mice by Morikawa *et al.*<sup>16</sup> Briefly, subsequent to establishment in culture, KM12C cells, derived from Dukes' stage B colon carcinoma, were implanted intrasplenically or into the cecum of nude mice. Metastases in the liver, originated from cells implanted into the spleen (experimental metastasis), were cultured to yield KM12L4A. A spontaneous liver metastasis was harvested, established in culture and designated KM12SM (spontaneous metastasis).<sup>17</sup> Passages of each cell line are indicated in Table I. Initial and advanced passages of KM12SM cells were analyzed to evaluate differences in the accumulation rate of chromosomal alterations during *in vitro* culture. The following cell lines were studied as controls: HCT116, LoVo, DLD-1, SW480 and HT29. They were obtained from the ATCC (Rockville, MD). Cells were grown in standard culture conditions. After enzymatic treatment, slides were postfixed with formaldehyde solution, prepared fresh daily, and dehydrated in an ethanol series. The M-FISH<sup>18</sup> assay procedure was performed as described in the Vysis (Downers Grove, IL) protocol. A minimum 10-well-spread metaphase of each cell line was captured using a cooler CCD camera attached to an Olympus (Tokyo, Japan) microscope with the appropriate set of filters and linked to a Power Macintosh (Cupertino, CA) G3 computer with the Spectra Vysion Imaging System software (Vysis). Pseudocolored images were created on the basis of the fluorochrome composition, to facilitate the identification of each chromosome. The ProVysion Multi-Color Probe (Vysis) labeled the *LPL* gene located at 8p22 with Spectrum orange, the *c-myc* gene at 8q24 with Spectrum green and chromosome 8  $\alpha$  satellite DNA with Spectrum aqua for identification of copy number. We applied this probe to the same slides hybridized with the M-FISH probe in a second hybridization round to the following cell lines: HT29, KM12C and KM12SM. After 10 min in 0.4  $\times$  SSC/0.3% NP-40 solution at room temperature under agitation, the

hybridization protocol was followed as described for the Spectra Vysion assay. CGH analysis was performed according to the method described by Kallioniemi *et al.*<sup>19</sup> and modified by Prat *et al.*<sup>20</sup>

MSI was analyzed in KM12 cells. Due to the lack of paired normal tissue, MSI was analyzed in the parental cells and single-clone derivatives, as described by Shibata *et al.*<sup>6</sup> in 2 mononucleotide repeats, BAT25 and BAT26, which have shown high specificity and low polymorphic display in normal tissue,<sup>21,22</sup> and 4 dinucleotide repeats (D12S79, D21S415, D12S95 and D4S2948). PCR primers and assay conditions may be obtained from the authors.

## RESULTS

Karyotypes are listed in Table I according to ISCN nomenclature.<sup>23</sup> Nonclonal structural alterations that appeared only in one metaphase provided information about the level of structural chromosome instability in the cell line; for nonclonal numerical alterations, only chromosomal gains were taken into account.

Molecular and cytogenetic data obtained from this array of cell lines are shown in Table II. To measure the rate of instability of each cell line, which is also shown in Table II, we calculated the maxr of instability.<sup>9</sup> This rate takes into account only nonclonal alterations and assumes that they took place in the last generation (maxr = number of nonclonal alterations/number of cells). This assessment is an indicator of genetic instability irrespective of the viability of cells showing novel genetic alterations that may or may not be transmitted to further generations.

*Cell lines of the MIS pathway*

HCT116 and LoVo are diploid cells with modal numbers of 46 and 49 chromosomes, respectively. Molecular, G-banding and CGH analyses were previously performed in our laboratory by Masramon *et al.*<sup>24</sup> M-FISH results of HCT116, LoVo and DLD-1

TABLE I—KARYOTYPE DESCRIPTIONS BASED ON G-BANDING AND M-FISH ANALYSES, COMBINED WITH CGH DATA

Cell line	Karyotype
HCT116 [p29] <sup>1</sup>	45,XY,der(10)dup(10)(q24q26)t(10;16)(q26;q24),der(16)t(8;16)(q13;p13),der(18)t(17;18)(q21;p11.3)[17]/idem,-Y[8]
LoVo [p39]	49,XX,t(2;12)(q13;p11.2),+5,+7,+12,der(15)i(15)(q10)[8]/idem,-5[2]
DLD-1 [p36]	46,XY,dup(2)(p14p22)[17],der(6)t(6;11)(p23;??)[17],der(16)t(7;16)[2],+17[2][cp17]
SW480 [p58]	51~59(3n),XX,-X[28],-Y[28],-1[28],t(1;9)(q12;q11)[27],der(2)t(2;12)(q37;q13)[27],del(3)(q12)[27],-4[27],-5[29],der(5)t(5;20)(q13;q13)[29],-6[29],-7[4],der(7)t(7;13)(q13;q2)[24],+der(7)t[inv(7);14] [(q22q36)(q22;q22)[25],der(8)t(8;9)(q12;p13)[28],der(8)t(8;19)(q12;??)[28],-9[28],-10[28],der(10)t(3;12;10)(q13.2;??;p12)[28],-12[28],del(12)(q13)[28],-14[28],-15[28],-16[28],del(18)(q12)[28],der(18)add(18)(p?)del(18)(q12)[27],-19[28],der(19)t(5;19;8;19)[28],der(20)t(5;20)(q15;p12)x2[28],-20[4],-22[27][cp28]
HT29 [p112]	65~69(3n),XXX,+del(X)(p11.2)[15],der(3)t(X;3)(q26;q28)[15],der(3)ins(3p;12)[15],+del(4)(q21)[7],+del(5)(q11.2)[15],-6[15],t(6;14)(q23;q13)[15],del(7)(p15)[15],der(8)i(8q)hsr(8)(8q24)[15],der(9)ins(9;?) [15],-13[15],i(13)(q10)[15],-14[13],+15[15],der(17)t(17;19)(p11;q10)[15],i(18)(p10)[15],-19[15],dup(19)(q13.1qter)[15],+20[15],-21[15],-22[15][cp15]
KM12C [p20]	45,X,-Y,der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2),der(6)t(6;12;17),i(9)(q10),t(6;17)(q26;q23),-18,der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2)[10]/idem,del(X)(q13) <sup>2</sup> , -8,der(8)t(8;8)(p21;q11),der(13)t(X;13)(q13;34) <sup>2</sup> [9]/idem,der(4)t(4;8)(q11;q11),der(9)t(9;11)(p11;q11),del(11)(q11),der(15)t(4;15)(q11.2;p11)[3]
KM12L4A [p42]	75~81(3n),XX,-X[15],-Y[15],del(3)(q25)[3],der(3)t(2;3)(q11;p11)[15],der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2)[15],+der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2)[13],der(6)t(6;12)(p21;q13)[15],+der(6)t(6;12)(p21;q13)[12],+7[10],+8[14],+9[14]+10[9],der(12)t(12;14)(p13;q31)[15],+13[8],+14[10],+15[13],+16[4],+17[8],-18[15],+der(19)t(6;19)(q13;q13.3)[14],-20[14],der(21)t(12;21)[2],-21[4],der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2)[15],+der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2)[15][cp15]
KM12SM [p15]	75~82(4n),XX,-X[10],-Y[10],-1[8],del(1)(p11.2)[2],-2[10],del(2q)[2],del(3)(q25)[2],-4[10],del(4q)[2],der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2)x2[10],der(6)t(6;12)(p21;q13)x2[10],-12[5],-16[10],der(17)t(8;17)(q21;q22)[10],-18[10],-18[10],-20[10],der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2)x2[10],-22[10][cp10]
KM12SM [p83]	81~86(4n),XX,-X[14],-Y[14],del(1)(p11.2)[14],-2[14],-3[14],del(3)(q25)[10],-4[14],der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2)x2[14],der(6)t(6;12)(p21;q13)x2[14],i(8)(q10)[8],+t(8;12)(q12;q13)[14],der(11)t(11;12)(p11.2;p11.2)[11],-12[14],t(15;18)(q15;q12)[14],-16[14],der(17)t(8;17)(q21;q22)[14],-18[14],-20[14],der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2)x2[14],-22[14][cp14]

<sup>1</sup>Cell culture passages are indicated in brackets next to each cell line.<sup>2</sup>These alterations appear in addition to der(8)t(8;8) in only 20% of this subpopulation.

TABLE II – GENOMIC VARIABILITY AND CYTOGENETIC CHANGES OF THE CELL LINES

Cell line	MSI	Number of mitoses analyzed	Modal number	Structural chromosome aberrations <sup>1</sup>	Chromosome number variability <sup>2</sup>	Nonclonal structural aberrations <sup>3</sup>	Maxr <sup>4</sup>
HCT116	+	17	45/46 <sup>5</sup>	3	—	—	—
LoVo	+	10	49/48 <sup>5</sup>	3	—	—	—
DLD-1	+	17	46	2	4	—	—
SW480	—	28	58	16	22	8	0.285
HT29	—	14	68	14	6	4	0.26
KM12C	+	22	45	6/7/10 <sup>5</sup>	5	9	0.41
KM12SM [p15] <sup>6</sup>	+	10	81	11	7	5	0.5
KM12SM [p83]	+	14	81	15	7	10	0.71
KM12L4A	+	15	77	10	10	12	0.8

<sup>1</sup>Rearranged chromosome number refers to the composite karyotype. <sup>2</sup>Number of metaphases with the number of chromosomes different from the modal number. <sup>3</sup>Number of metaphases with nonclonal structural abnormalities. <sup>4</sup>Number of nonclonal alterations/number of cells. The maxr takes into account only nonclonal alterations and assumes they took place in the last generation. <sup>5</sup>Differences between clonal subpopulations within a cell line are indicated. <sup>6</sup>Cell culture passages are indicated in brackets.

cell lines confirmed previously published results by SKY.<sup>15</sup> In addition, we describe the alteration der(16)t(7;16) in 12% of the metaphases of DLD-1 cells. All 3 cell lines presented a near-diploid karyotype, displayed MSI and did not show any nonclonal structural aberration; thus, we suggest that structural chromosome instability does not exist in this group of cell lines (Table II).

Cell lines of the CIN pathway

The SW480 karyotype mostly agrees with previous reports,<sup>15,25–27</sup> adding some specifications (Table I). A total of 28 metaphases were analyzed by M-FISH, showing a substantial intermetaphase variation among them for both numerical and structural alterations (Table II). We also observed that 20% of metaphases endoreduplicated; these metaphases were not included in the M-FISH analysis of the karyotype.

The following description of the HT29 cell line closely agrees with that of Kawai *et al.*<sup>28</sup> and Kuechler *et al.*<sup>29</sup> and differs from older reports.<sup>30,31</sup> An insertion of undefined material of chromosome 12 into the short arm of chromosome 3 was identified in our laboratory as well as an insertion of material of unknown origin into chromosome 9. An unbalanced translocation between terminal regions of chromosomes Xq and 3q is also described (Table I, Fig. 1a). The large clonal marker chromosome described as i(8q)hsr(8)(8q24) in 100% of the cells, which was entirely colored as chromosome 8 material, deserves special attention. It showed a large hsr of 8q24 identified as an abnormally banded region by G banding and by CGH as a clear amplification in this region. The *c-myc* gene is a good candidate to undergo this amplification. The final confirmation of the amplification of *c-myc* was obtained by performing the array of specific probes for chromosome 8 described above. Multiple signals of the locus-specific probe for *c-myc* were located in both arms of the marker chromosome, corroborating the hypothesis of *c-myc* amplification (Fig. 1b).

SW480 and HT29 cells showed an MSI-negative phenotype. Moreover, the rate of structural alterations was 0.28 per cell for both cell lines (Table II).

KM12 cells

The poorly metastatic KM12C cell line was near-diploid with a modal chromosome number of 45 (Table I). CGH analysis showed gains in 8q11qter, 12q22qter and 20q13qter. Losses were detected in 4q28qter, 5p14pter, 6p21pter, 9p11pter and 18. M-FISH provided the information required to describe a comprehensive karyotype, which was in agreement with Yeatman *et al.*<sup>32</sup> and allowed definition of 3 cell populations, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>, with 6, 7 and 10 marker chromosomes, respectively (Table II). No amplifications were detected. The 3 populations shared the alterations der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2), der(6)(12qter;q13::6p21;q26::17q23;qter), t(6;17)(q26;q23) and der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2). The presence of chromosome 18 material in derivative 5 was confirmed by a whole-chromosome painting probe. Alterations



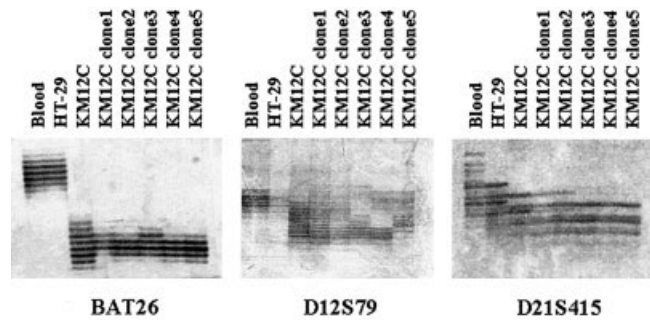
FIGURE 1 – M-FISH and CGH profiles. (a) Karyotype of pseudocolored chromosomes of a representative HT29 cell. (b) Example of i(8q)hsr(8)(8q24). G-banding analysis shows an abnormally banded region. M-FISH indicates that the marker is composed only of chromosome 8 material. The Provisyon probe elucidates the high copy number of the *c-myc* gene (Spectrum green). Amplification of 8q24 was confirmed by CGH analysis. (c) Karyotype of pseudocolored chromosomes of a KM12C metaphase from subpopulation A<sub>2</sub>. (d) Representative pseudocolored karyotype of clone A<sub>3</sub> of the KM12C cell line. (e) Pseudocolored karyotype of the cell line KM12L4A. (f) Pseudocolored karyotype of the cell line KM12SM (p83). Duplicated chromosomal rearrangements indicate that endoreduplication is the origin of the near-tetraploid karyotype. (g) CGH profiles of chromosomes 5, 6, 8, 12 and 20 of late passages of KM12SM.

der(6)12qter;q13::6p21;q26::17q23;qter) and t(6;17)(q26;q23) were present in all KM12C subpopulations but not in the highly metastatic forms. Note that the translocation between chromosomes 6 and 17 was balanced. Nearly 10% of the whole metaphases of KM12C were endoreduplicated; these cells had all of the chromosomal markers described in the near-diploid karyotype duplicated as well as single-copy new chromosomal rearrangements. The maximum of instability for this cell line was 0.41. Differences among the 3 populations were detected at the chromosome 8 level. On the one hand, there were 2 major subpopulations that differed in only one alteration in chromosome 8. One subpopulation had 2 normal 8 chromosomes ( $A_1$ ), whereas the other subpopulation showed one normal chromosome 8 and the marker chromosome der(8)t(8;8)(p21;q11) ( $A_2$ ) (Fig. 1c). On the other hand, in the minor cell population ( $A_3$ ), 2 normal 8 chromosomes and a derivative chromosome 4, t(4;8)(q11;q11), were identified. Moreover, this cell population accumulated other specific alterations of this clone involving chromosomes 9, 11 and 15 (Table I, Fig. 1d). Concerning alterations of chromosome 8, we performed the Provisyon probe hybridization. From a total of 40 metaphases analyzed, we concluded that the major cell population was the one with the marker chromosome der(8)t(8;8)(p21;q11) present in 60% of the total population, 2 normal 8 chromosomes were detected in 25% of cells and the clone with der(4)t(4;8)(q11;q11) was the least represented cell population, with 15% of the total.

KM12L4A is a highly liver-metastatic cell line derived from the KM12C line by 3 additional passages through nude mice.<sup>17</sup> It showed a near-triploid karyotype with a modal number of 77 chromosomes (range 75–81) (Table I, Fig. 1e). CGH analysis showed gains in 8p, 8q13qter, 12q22qter and 20q. Losses were detected in 5p14pter, 6p21pter, 11p12pter and 18. Common chromosomal rearrangements detected by M-FISH in all cells were der(3)t(2;3)(q11;p11), der(12)t(12;14)(p13;q31) and der(19)t(6;19)(q13;q13.3). After analyzing 14 karyotypes by M-FISH, we did not detect any subpopulation despite the high number of nonclonal chromosomal aberrations. In this case, the maxr of instability was 0.8 alterations per cell.

The highly liver-metastatic KM12SM cell line was near-tetraploid with a modal number of 81 chromosomes (ranges 75–82 and 80–86 for early (p15) and late (p83) cell culture passages, respectively) (Table I, Fig. 1f). In early passages of the cell culture, CGH analysis showed gains in 8q24 and 20q and losses in 5p14pter, 6p21pter and 18. CGH analysis of late-passage cells showed gains in 1q, 8, 12q22qter, 15, 17q21pter, 20q and 21. Losses were detected in chromosomes 4, 5p14pter, 6p21pter, 11p12pter, 18 and X (Fig. 1g). M-FISH karyotype description defined rearrangements that were unique to this highly metastatic cell line: del(1)(p11.2), del(3)(q25) and der(17)t(8;17)(q21;q22). They appeared to be clonal in both early and late passages. Changes affecting chromosome 8 were observed in late-passage cells especially. M-FISH results revealed that the cell line in a late passage accumulated more chromosomal alterations than the cell line in an early passage (Table II), with maxr of instability of 0.71 and 0.50, respectively. When we studied the behavior of chromosome 8 in the late passage of the KM12SM cell line using the multicolor Provisyon probe, we could clearly describe 2 clones,  $B_1$  and  $B_2$ . Both showed a total of 5 centromeric signals of chromosome 8. In both populations, the balanced t(8;12)(q12;q13) and the unbalanced t(8;17)(q21;q22) could be identified. In addition to these alterations, we found 3 normal chromosomes and an i(8q) ( $B_1$ ) in 60% of the cells analyzed, whereas in the other 40% 4 normal 8 chromosomes ( $B_2$ ) were detected. However, in both clones, the number of copies of the *c-myc* gene was at least 6.

Alterations common to KM12C, KM12SM and KM12L4A were der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2) and der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2). These markers appeared to be duplicated in the metastatic cell lines. The duplicated marker der(6)t(6;12)(p21;q13) was present only in KM12SM and L4A, while in KM12C this deriv-



**FIGURE 2** – Analysis of MSI in KM12C cells. DNA from normal tissue and the microsatellite-stable HT29 cell line were used as control. KM12C parental cells and single-cell clones show a clear deletion in the quasi-monomorphic BAT26 microsatellite and heterogeneity among clones in the 3 microsatellites shown here.

ative was translocated with chromosome 17. Although del(3)(q25) was detected in both metastatic cell lines, it was found in a low number of cells.

Regarding MSI, we found a positive phenotype in the KM12C cell line despite keeping a highly unstable karyotype. As expected, KM12SM and KM12L4A (Fig. 2) showed MSI together with the polyploid karyotype and the increased number of *de novo* nonclonal alterations in both early and late passages of *in vitro* culture (data not shown). The number of altered chromosomes as well as the rate of instability increased when cells acquired metastatic properties and through *in vitro* culture passages (Table II).

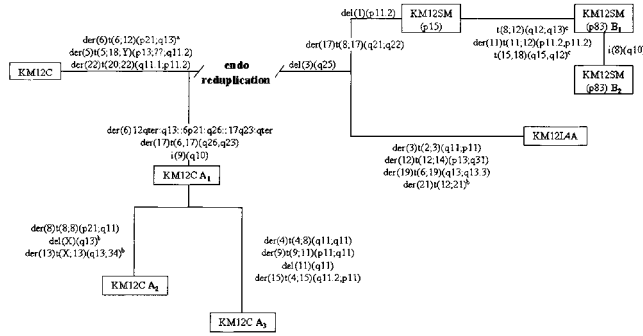
## DISCUSSION

The combination of M-FISH with CGH, FISH and karyotyping provided the most detailed description of chromosome markers of 8 CRC cell lines. Using this array of techniques, we were able to describe previously unidentified chromosomal rearrangements as well as determine the origin of most of them. Genetic gains or losses detected by CGH further improve the resolving power of M-FISH.<sup>33</sup> When we compared our results to those published in the same CRC cell lines using SKY,<sup>15,27,28</sup> we obtained the same results using both multicolor karyotyping techniques. By comparing karyotypes of these cell lines previously analyzed by G banding carried out in our laboratory,<sup>9,24</sup> we confirmed that M-FISH techniques allow easy characterization of clones, avoiding misidentifications of chromosome markers and allowing us to follow them along clone generations or *in vitro* culture passages.

Analysis of karyotypes showed frequent involvement of chromosomes 8 and 12 in structural rearrangements. Chromosome 8 is recurrently implied in balanced and unbalanced translocations as well as gains and losses of the q and p arms, respectively. Gain of 8q was seen in most cell lines and was very closely related to amplification of the *c-myc* gene at 8q24. A candidate tumor-suppressor gene in 8p23 has been reported.<sup>34</sup> Furthermore, alterations in chromosome 8 are enough to generate intercellular variability leading to different cell populations, *e.g.*, the KM12C cell line. Chromosome 12 is also frequently involved in translocations, and the short arm is often deleted.<sup>35</sup> We also observed frequent loss of chromosome 18q, which is in agreement with previous reports in primary colorectal tumors.<sup>11,36</sup>

HCT116, DLD-1 and LoVo cell lines are classified as MSI tumors since they show few chromosomal abnormalities and MSI. SW480 and HT29 are near-triploid colon cancer cell lines with unbalanced translocations and deletions as the most frequent alterations. These cell lines display the common CIN pathway, as previously described.<sup>8,9,37</sup> They show a near-triploid modal chromosome number with many chromosomal alterations and significant CIN rates. They are stable at the microsatellite level. None of





**FIGURE 3** – Clonal chromosome relationship between poorly and highly metastatic KM12 cell lines. Vertical lines represent intra-cell line variation. Subpopulation nomenclature is indicated in bold. <sup>a</sup>Note that this alteration does not appear in any of the KM12C cells analyzed, but its presence in the highly metastatic cell lines allowed us to deduce that it was present in the early stages of cell line generation. <sup>b</sup>These chromosomal rearrangements were not present in all cells analyzed, though they did not clearly define an independent subpopulation. <sup>c</sup>Balanced translocation. p, cell culture passage.

the markers described in HT29 and only one marker of SW480 cells were duplicated, suggesting that the origin of triploidy arises from the accumulation of aneuploidies and a subsequent chromosomal alteration selection rather than from an early endoreduplication event followed by chromosome loss. The real endoreduplicated metaphase spreads are those in which one can see 4 chromatids in each chromosome. Despite this rare event, we considered that metaphase spreads showing all or most chromosomal markers duplicated and more than approximately 100 chromosomes in the karyotype could have been previously involved in an endoreduplication cycle. Despite the presence of ongoing reduplication in SW480 cells (20% of metaphases endoreduplicated), our results from karyotypic analysis of the main cell population cannot confirm that endoreduplication is the origin of the near-triploid karyotype in this cell line.

In addition to the previously described models (MSI and CIN), KM12 cells constitute a new pathway characterized by structural chromosome instability and MSI in diploid status. After endoreduplication, KM12SM and KM12L4A keep high rates of chromosome instability. Moreover, according to our M-FISH results of these cell lines, it is possible to clearly define the cytogenetic evolution from the poorly to the highly metastatic stages (Fig. 3). In KM12 cells, der(5)t(5;18;Y)(p13;p11.2;q11.2), der(6)t(6;12)(p21;q13) and der(22)t(20;22)(q11.1;p11.2) are defined as early cytogenetic events that are maintained in highly metastatic forms.

The markers monitored by M-FISH also allow prediction of a pathway of chromosome evolution: derivatives 6 are present in the 3 cell lines; der(6)t(6;12)(p21;q13) is found in KM12SM and KM12L4A, and a translocation between this derivative and chromosome 17 was detected in KM12C. Since this rearrangement is not found in either KM12SM or KM12L4A, one can conclude that this alteration occurs in KM12C after its transformation into highly metastatic cells. When early passages of KM12SM were analyzed, the results suggested that the cytogenetic alterations associated with metastatic properties may be der(17)t(8;17)(q?;q22), del(1)(p11.2) and del(3)(q25). This last alteration is also detected in the KM12L4A cell line but only in a low percentage of cells. CGH analysis of metastatic KM12 cells revealed consistent pro-

files, confirming that the majority of structural abnormalities observed by M-FISH are not fixed in the karyotype. KM12SM showed gains in most chromosomes with clearly amplified regions at 12q22qter and 20q, and we identified losses in chromosomes 4, 5p14pter, 6p21pter, 11p12pter, 18 and X. Although we analyzed cell lines, CGH and M-FISH results are in concordance with previous studies comparing primary colorectal tumors with liver metastases.<sup>38–40</sup>

The presence of duplicated chromosomal markers in KM12SM and KM12L4A confirms that after some selective rearrangements an endoreduplication process originates the polyploidy. This is in agreement with the monosomic designation of Dutrillaux.<sup>12</sup> Overall, our data indicate that diploid KM12C cells keep heterogeneous chromosomal aberrations. While an early endoreduplicating process may lead to the highly metastatic population, later changes affecting KM12C result in the appearance of subpopulations A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> with *in vitro* selected chromosomal alterations. At the same time, in KM12SM, the high instability rate acquired through *in vitro* passages generates a high number of chromosomal rearrangements, which are not fixed in the tumor karyotype. It is remarkable that 2 of 4 clonal alterations generated in the late passages of KM12SM are balanced translocations.

The study of the KM12 model system allows us to describe a new pattern of genetic evolution in colon cancer cells. KM12C keeps a near-diploid karyotype and shares similar structural instability rates with typical CIN cell lines (*e.g.*, SW480 and HT29); the main difference is that KM12C shows MSI. Abdel-Rahman *et al.*<sup>15</sup> described the same characteristics for the CRC cell line HCA7. Moreover, it has been demonstrated by loss of heterozygosity that MSI and CIN are not always independent in primary tumors and can overlap.<sup>41</sup>

The high rates of aneuploidy and structural chromosome instability detected in KM12SM and M12L4A are characteristic of the CIN phenotype, with a near-tetraploid dosage originated by an endoreduplication, followed by loss of different chromosomes. As expected, both metastatic cell lines have the MSI phenotype. Interestingly, Hegde *et al.*<sup>42</sup> detected a decrease in expression of mutL homologues *hPMS1* and *hPMS2* by cDNA microarray in KM12 cells, suggesting that these cell lines were derived from a patient with HNPCC. However, our results did not discard the possibility that KM12C cells could be derived from a sporadic CRC with some deficiency in mismatch repair genes.

In conclusion, KM12 cells appear to be valuable not only to study the genetic changes related to the metastatic capacity of cells but also as a progression model in which MSI and CIN coexist. Whether this model may represent an actual *in vivo* scenario for a subset of tumors remains speculative. Nevertheless, better characterization of the molecular events underlying the karyotypic and biologic changes in the KM12 parental and derived cells (which are frequently detected *in vivo* neoplastic cells) may provide clues to different factors responsible for tumor progression in human colon tumorigenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

KM12 cells were kindly provided by Drs. A. Fabra (University of Texas, Houston, TX) and I. Fidler (University of Texas, Houston, TX). We thank Dr. F. Garcia (Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain) for cell culture services and Ms. A. Niubó for technical assistance. J.C. is the recipient of a fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona. E.P. is the recipient of a fellowship from Institut Municipal d'Investigacions.

REFERENCES

1. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23–8.
2. Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instability in human cancers. *Nature* 1998;396:643–9.
3. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812–6.
4. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal

- a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558–61.
5. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816–9.
  6. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994;6:273–81.
  7. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie AH, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1996;2:169–74.
  8. Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623–7.
  9. Ribas M, Masramon L, Aiza G, Capellà G, Miró R, Peinado MA. The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J* 2003;289–91.
  10. Höglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Johansson B, Mertens F, Mitelman F, Säll T. Multivariate analyses of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31:156–71.
  11. Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:97–109.
  12. Dutrillaux B. Pathways of chromosome alterations in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* 1995;67:59–82.
  13. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities—balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155–63.
  14. Tomlinson IP, Bodmer WF. Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med* 1999;5:11–2.
  15. Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH, Edwards PA. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2538–43.
  16. Morikawa K, Walker S, Jessup J, Fidler I. In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res* 1988;48:1943–8.
  17. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Milburn Jessup J, Fidler IJ. Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 1988;48:6863–71.
  18. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368–75.
  19. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridisation for molecular cytogenetics analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–20.
  20. Prat E, Bernués M, Caballín MR, Egozcue J, Gelabert A, Miró R. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* 2001;57:986–92.
  21. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300–3.
  22. Zhou HY, Hoang JM, Cottu PH, Thomas G, Hamelin R. Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene* 1997;15:1713–8.
  23. Mitelman F, ed. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger, 1995.
  24. Masramon L, Ribas M, Cifuentes P, Arribas R, García F, Egozcue J, Peinado M, Miró R. Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridisation, and whole chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:17–21.
  25. Tomita N, Jiang W, Hibshoosh H, Warburton D, Kahn SM, Weinstein IB. Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer Res* 1992;52:6840–7.
  26. Gagos S, Hopwood VL, Iliopoulos D, Kostakis A, Karayannakos P, Yatzides H, Skalkas GD, Pathak S. Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. *Anticancer Res* 1995;15:369–78.
  27. Melcher R, Steinlein C, Feichtinger W, Müller C, Menzel T, Luhrs H, Scheppach W. Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:145–52.
  28. Kawai K, Viars C, Arden K, Tarin D, Urquidi V, Goodison S. Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:1–8.
  29. Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:207–10.
  30. Chen TR, Drabkowski D, Hay RJ, Macy M, Peterson W. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;27:125–34.
  31. Bertrand V, Couturier-Turpin MH, Louvel A, Panis Y, Couturier D. Relationship between cytogenetic characteristics of two human colonic adenocarcinoma cell lines and their ability to grow locally or metastasize or both: an experimental study in the nude mouse. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113:36–44.
  32. Yeatman TJ, Cher ML, Mao W, Wloch M, Tedesco T. Identification of genetic alterations associated with the process of human experimental colon cancer liver metastasis in the nude mouse. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:246–52.
  33. Kytölä S, Rummukainen J, Nordgren A, Karhu R, Farnebo F, Isola J, Larsson C. Chromosomal alterations in 15 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;23:308–17.
  34. Sun PC, Uppaluri R, Schmidt AP, Pashia ME, Quant EC, Sunwoo JB, Gollin SM, Scholnick SB. Transcript map of the 8p23 putative tumor suppressor region. *Genomics* 2001;75:17–25.
  35. Sato Y, Kobayashi H, Suto Y, Olney HJ, Davis EM, Super HG, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Rowley JD. Chromosomal instability in chromosome band 12p13: multiple breaks leading to complex rearrangements including cytogenetically undetectable sub-clones. *Leukemia* 2001;15:1193–202.
  36. Bardi G, Parada LA, Bomme L, Pandis N, Willén R, Johansson B, Jeppsson B, Beroukas K, Heim S, Mitelman F. Cytogenetic comparisons of synchronous carcinomas and polyps in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997;76:765–9.
  37. Roschke AV, Stover K, Tonon G, Schäffer AA, Kirsch IR. Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* 2002;4:19–31.
  38. Al-Mulla F, Nicol Keith W, Pickford IR, Going J, Birnie GD. Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:306–14.
  39. Parada LA, Marañón A, Hallen M, Tranberg K, Stenram U, Bardi G, Johansson B. Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between primary and metastatic colon carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:471–9.
  40. Nakao K, Shibusawa M, Ishihara A, Yoshizawa H, Tsunoda A, Kusano M, Kurose A, Makita T, Sasaki K. Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analysed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy. *Cancer* 2001;91:721–6.
  41. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003;63:1608–14.
  42. Hegde P, Qi R, Gaspard R, Abernathy K, Dharap S, Earle-Hughes J, Gay C, Nwokekeh NU, Chen T, Saeed AI, Sharov V, Lee NH, et al. Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray. *Cancer Res* 2001;61:7792–7.

---

#### **4.3. Treball III**

Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egozcue J, Peinado MA, Miró R. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J.* 2005 May; **19**(7):828-30.

Indexed by Thomson-ISI Journal Citation Reports

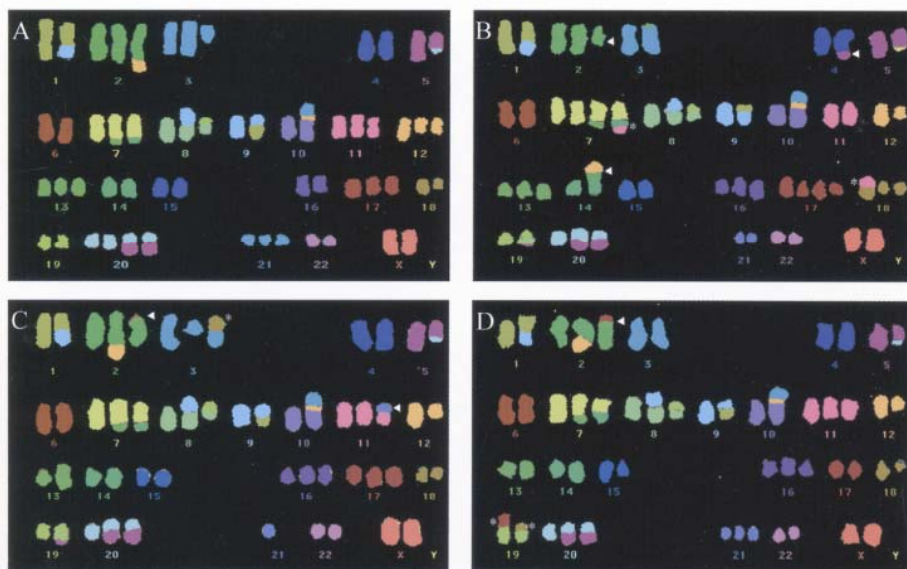
ISI 2004 Impact Factor: 6,820

---

# THE FASEB JOURNAL

A MULTIDISCIPLINARY RESOURCE FOR THE LIFE SCIENCES

MAY 2005  
VOLUME 19, NUMBER 7



## Measurement of chromosomal instability in cancer

### ALSO IN THIS ISSUE:

- ▶ Skeletal muscle gene expression
- ▶ Targeted particles in pathological inflammation
- ▶ TNF signaling and fever
- ▶ Effect of red wine extract on airway inflammation

Official Publication of the  
Federation of American Societies for Experimental Biology

# Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay

Jordi Camps,<sup>\*,1</sup> Immaculada Ponsa,<sup>\*</sup> Maria Ribas,<sup>†</sup> Esther Prat,<sup>\*</sup> Josep Egozcue,<sup>\*</sup> Miguel A. Peinado,<sup>†</sup> and Rosa Miró<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; and <sup>†</sup>IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

 To read the full text of this article, go to <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.04-2276fje>; doi: 10.1096/fj.04-2276fje

## SPECIFIC AIMS

In the present study, we quantify the ongoing structural chromosome alterations in two archetypes of colorectal cancer cell lines: HCT116, and SW480 and its single subclones using the multicolor-FISH. The application of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay allowed a detailed measurement of numerical instability, to elucidate the origin of the aneuploidy and to predict the structural chromosome instability level by measuring the abnormal nuclear shape events by performing centromeric and pancentromeric FISH.

## PRINCIPAL FINDINGS

### 1. Rates of structural chromosome instability

Several efforts have been assessed to characterize and quantify the ongoing appearance of structural chromosome instability. In the present study, multicolor-FISH and CGH were performed for both the parental cell lines, HCT116 and SW480, and its derivative subclones (S1, S2, S4, S2.3, and S2.4). To quantify the rate of structural instability of each cell line and its subclones, the maximum rate (maxr) of instability was calculated. This rate was assessed by the de novo nonclonal alterations divided by the number of cells analyzed. The parental cell lines did not display any de novo clonal chromosome rearrangements, but the subclones did show clonal alterations even though the rate was much lower than the nonclonal chromosome alterations. The SW480 subclones tended to display a maxr 3- to 5-fold higher than the parental cell line. De novo nonclonal alterations mostly appeared as unbalanced translocations and usually involved the whole arm of a chromosome with breakpoints near the centromere. Complex translocations were frequently observed. Our results

suggested that the structural heterogeneity observed in subclones not only was generated by remodeling chromosome markers observed in the parental cell lines, but also involved normal chromosomes. Low differences were observed between CGH data of parental cell line and its subclones, suggesting that structural rearrangements were not fixed in the genome. Consequently, these imbalances will not appear represented in a large enough population to be detected by CGH.

To understand the generation of these chromosome rearrangements, we might propose a dynamic engine of structural chromosome instability that permits the emergence of new chromosomal alterations, preferentially unbalanced over balanced. In our case, since the rate of structural chromosome rearrangements is significantly lower in the parental SW480 cell line compared with its subclones, we suggest a mechanism that triggers a karyotypic destabilization when subclones are generated. The chromosome aberration spectrum could be stabilized through the in vitro passages in a similar way to what has been observed during the in vivo progression.

### 2. Distribution and quantification of aneuploidy events

Intracellular chromosome number variability was evaluated as the percent of nuclei with a number of centromere signals for chromosomes 4, 7, 15, and 17 different from the modal number according to the composite karyotype of each cell line and subclone. The differences in the numerical variability average

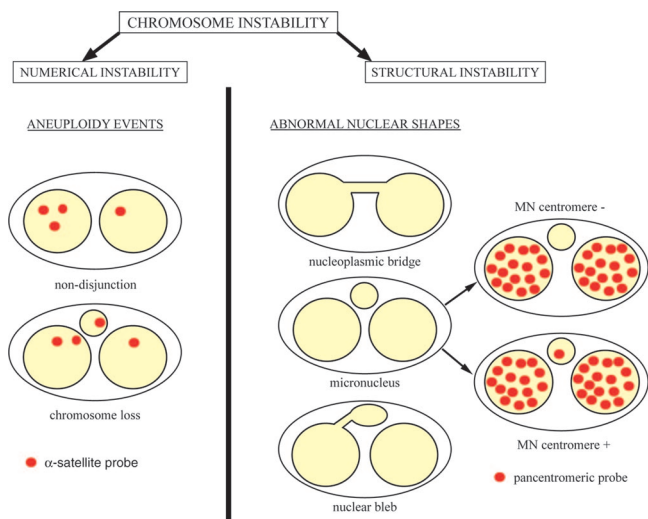
<sup>1</sup> Correspondence: Laboratori de Citogenètica, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: [jordi.camps@uab.es](mailto:jordi.camps@uab.es)

among HCT116 and SW480 were highly significant ( $P < 0.0001$ ), but the numerical variabilities displayed by the subclones of the SW480 were in the same range as the parental cell line.

The CBMN assay allowed us to elucidate the origin of the aneuploidy events, either nondisjunction or chromosome loss. By using chromosome-specific centromeric probes, different patterns were observed. Nondisjunction was considered as a gain of one or more centromeric signals in one daughter cell together with the corresponding loss in the other daughter cell. On the other hand, chromosome loss was detected when a micronucleus showed at least one or more centromeric signals, whereas the main nucleus lacked one or more signals (**Fig. 1**).

The analysis of the binucleated cells confirmed the low level of aneuploidy displayed by the HCT116 cell line. The SW480 cell line and its subclones showed a 10-fold higher rate of numerical instability when compared with HCT116 ( $P < 0.0001$ ). Only chromosome 15 showed notable differences between nondisjunction and chromosome loss events. In this case, nondisjunction events were predominant over chromosome losses.

From the analysis of the aneuploidy rate displayed by each chromosome analyzed (4, 7, 15, and 17), we calculate the aneuploidy rate for the whole genome applying a correction factor of  $mn/8$  to HCT116 and  $mn/14$  to the rates of parental SW480 and each subclone,  $mn$  being the modal chromosome number, and, 8 and 14 the number of total centromeric signals observed. No differences were observed among parental SW480 cell line and its subclones (**Table 1**). Nevertheless, differences in the aneuploidy rate for the chromosomes analyzed were detected and the most affected chromosome by an aneuploidy event was 15, followed by 7, 17, and 4.



**Figure 1.** Schematic diagram. Summary of the events which can be analyzed by the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. Aneuploidy events can be classified as nondisjunction or chromosome loss using an  $\alpha$ -satellite chromosome probe.

**TABLE 1.** Numerical chromosomal instability in colorectal cancer cell lines and SW480 subclones

	Total CL	Total ND	Aneuploidy rate	
			(Chr. 4, 7, 15, 17) <sup>a</sup>	(Whole genome) <sup>b</sup>
HCT-116	–	0.025	0.025	0.144
SW480	0.192	0.161	0.353	1.461
SW480 S1	0.268	0.254	0.522	2.050
SW480 S2	0.151	0.257	0.408	1.575
SW480 S4	0.068	0.316	0.384	1.536

<sup>a</sup> Aneuploidy rate for the chromosomes 4, 7, 15, and 17 measures cells affected by some aneuploidy generating event, either chromosome loss or nondisjunction. Thus, clonal chromosome number variability has not been considered as numerical instability. <sup>b</sup> Aneuploidy rate for the whole genome was calculated applying a correction factor of  $mn/8$  to HCT116 and  $mn/14$  to the rates of parental SW480 and each subclone,  $mn$  being the modal chromosome number and 8 and 14 (2#4, 4#7, 5#15 and 3#17) the number of total centromeric signals observed. CL = chromosome loss; ND = nondisjunction.

### 3. Abnormal nuclear shapes are a sensitive measure of chromosome rearrangements: application of the CBMN assay

The CBMN assay allowed us to score the abnormal nuclear shapes (ANS). This term includes micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear blebs (**Table 2**), and it has been associated to mitotic instability. The low frequency of ANS observed in the HCT116 cell line confirmed once more the chromosomal stability of these cells. On the other hand, SW480 parental cell line and its subclones displayed a major number of abnormal nuclear shapes, especially nucleoplasmic bridges and micronuclei, whereas nuclear blebs were much less represented. Among subclones, S2 displayed, in general, the highest number of ANS. These data agree with the high rate of structural chromosome instability detected by M-FISH in this subclone. When analyzing the relative frequencies of micronuclei with  $\alpha$ -satellite signals for the chromosomes tested, we did not find differences between parental SW480 cell line and its subclones, except for subclone S1.

To deeply study the ANS in the subclone S2, we hybridized with a pancentromeric probe. Results did not show differences between the frequency of micronuclei with centromere signal and micronuclei without it. Nevertheless, we noticed that most of the nuclear blebs (41 out of 43) showed centromeric signals, indicating that nuclear blebs could eliminate not only pools of fragmented DNA or gene amplifications, but also entire chromosomes, and could serve as a mechanism of chromosome loss.

### CONCLUSIONS AND SIGNIFICANCE

Genomic instability is described as one of the most important features during carcinogenesis. To date, only

TABLE 2. Summary of abnormal nuclear shapes detected in the study of binucleated cells<sup>a</sup>

Cell line/subclone	BN totals	BN + NPB	Frequency	BN + MN	Frequency	BN + NB	Frequency
HCT-116	403	6	1.50%	13	3.20%	–	–
SW480	412	42	10.00%	56	13.60%	24	5.80%
SW480 S1	403	51	12.60%	67	16.60%	14	3.40%
SW480 S2	431	110	26%	91	21.10%	22	5%
SW480 S4	413	116	28%	65	15.70%	17	8.10%

<sup>a</sup> BN, binucleated cells; NPB, nucleoplasmic bridge; MN, micronuclei; NB, nuclear bleb.

microsatellite instability (MSI) has been well-characterized, and it has been related to mutations of the mismatch repair genes. On the other hand, chromosomal instability (CIN) refers to an increased rate of imbalances in chromosome number (aneuploidy) or acquisition of chromosome rearrangements. In most of the cases these two patterns of instability do not coexist. To understand the origin of the chromosome instability, we have performed an array of molecular cytogenetic techniques which allow us to easily detect a rate of chromosome rearrangements and aneuploidies.

Our results demonstrate the stable karyotype of the HCT116 cell line and the high structural instability in SW480 cell line. Moreover, we reveal in this study that the parental SW480 cell line shows approximately the same aneuploidy rate than its subclones, and that subclones are clearly characterized by the acquisition of multiple chromosome rearrangements as a tool to generate tumor cell heterogeneity. These data suggest that some tumor cells are submitted to a mechanism which might destabilize the karyotype. Two interpreta-

tions are possible for the observed higher structural chromosome heterogeneity in the subclones as compared with parental cells: that the instability is higher in the subclones, or that the instability is the same but the effect (heterogeneity) is restrained in parental cells due to competitiveness. In either case, the biological implications are the same: clonal episodes appear to favor an increase of potential heterogeneity. Whether this structural instability might act in an *in vivo* situation is still to be determined.

FISH with chromosome-specific centromeric probes has been used on nuclei as a tool to measure cell-to-cell variations in chromosome number (heterogeneity). Using the CBMN assay in tumor cells, we precisely assess a rate of numerical instability, which allows the analysis of the nondisjunction and chromosome loss events. This study demonstrates that the CBMN assay, one of the most commonly methods used in mutagenesis, can provide a comprehensive measurement of chromosome breakages in tumor cells by means of the analysis of abnormal nuclear shapes. **FJ**

*FASEB Journal* express article 10.1096/fj.04-2276fje. Published online March 9, 2005.

## **Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay**

Jordi Camps,\* Immaculada Ponsa,\* Maria Ribas,<sup>†</sup> Esther Prat,\* Josep Egozcue,\* Miguel A. Peinado,<sup>†</sup> and Rosa Miró\*

\*Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; <sup>†</sup>IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Corresponding author: Jordi Camps, Laboratori de Citogenètica, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: Jordi.Camps@uab.es

### **ABSTRACT**

Most tumors show abnormal karyotypes involving either chromosome rearrangements and/or aneuploidies. The aim of our study is to measure the rate of both structural and numerical chromosome instability in two colorectal cancer cell lines: HCT116, and SW480 and its single subclones. To determine structural instability, we measured the nonclonal chromosome alterations of the last cell division by means of multicolor-fluorescence in situ hybridization (FISH). To quantify numerical instability, we used centromere-specific DNA probes to simultaneously detect chromosome loss and nondisjunctional events in binucleated cells obtained by cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN). After clonal episodes, the structural chromosome instability rate increased significantly, confirming the large contribution of structural rearrangements to the heterogeneity of cancer cells. On the other hand, the aneuploidy rate was high and conserved in both the parental SW480 cell line and its subclones. The ability to differentiate chromosome loss and nondisjunction by the CBMN assay allowed us to conclude that no significant differences were detected among these events. Analysis of nucleoplasmic bridges, micronuclei, and nuclear blebs also demonstrated the differences among the structural instability rates of the parental cell line and its subclones. Overall, our results demonstrate the prevalence of structural over numerical chromosome instability in the subclones when comparing them with their parental cell line, confirming the contribution of ongoing chromosomal reorganizations in the generation of tumor cell heterogeneity.

Key words: colorectal cancer • genetic instability • aneuploidy • nondisjunction • chromosomal rearrangements



Genomic instability appears to be a fundamental trait in the development of cancer cells (1-3). Most human tumors exhibit this instability at the chromosome level, resulting in numerical and structural alterations. A hypermutability state, induced by the generation of breakage-fusion-bridge (BFB) cycles and/or aneuploidy, leads to an altered gene expression and to the evolution of the cancer phenotype.

Multiple rearrangements, characterized by insertions, deletions, translocations, and amplifications, are very common in epithelial tumors. Frequent novel, structural chromosome alterations have been detected in prostate (4) and in colorectal cancer cell lines (5). An intratumor heterogeneity-generating event that could lead to structural chromosome instability is the BFB cycle (6). Recent data (7, 8) from primary cultures of solid tumors have confirmed that nucleoplasmic bridges (NPB), micronuclei (MN), and nuclear blebs (NB) were common features of a wide variety of cancer cells. Moreover, these abnormal nuclear shapes were closely related to the BFB cycles and should be regarded as indicators of genetic instability.

A direct consequence of chromosomal instability is an imbalance in the number of chromosomes per cell (aneuploidy), resulting in the gain or loss of chromosomes during cell division (9). The induction of aneuploidy may alter the dosage of oncogenes and tumor suppressor genes. Aneuploidy involving chromosomes that contain genes controlling the mitotic process leads to asymmetric segregation of chromosomes, initiating an autocatalytic karyotypic evolution generating preneoplastic and, finally, cancer cells (10, 11). There are two mechanisms involved in aneuploidy in somatic cells: nondisjunction of chromosomes during anaphase, and chromosome loss. In the first process, one daughter cell becomes trisomic and the other monosomic due to an aberrant segregation; in the second process, the lagging chromosome may be lost, form a micronucleus, or be randomly incorporated into either of the daughter nuclei. MN can contain a whole chromosome that lags at mitosis, or chromosome fragments, acentric or not, which were not incorporated into the daughter nuclei during cell division because of kinetochore dysfunctions or because of complex chromosomal rearrangements that may lead to mechanical difficulties during anaphase. However, the existence of genetic alterations does not by itself provide information about the rate of its occurrence; for this reason, measurement of numerical chromosomal variability does not always indicate the rate of chromosomal instability. The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay is an established cytogenetic method for the measurement of chromosome breakage, nondisjunction, and chromosome loss, particularly effective in the study of chromosome damage induced by ionizing radiation and genotoxins (12, 13). Recently, the inclusion of NPB analysis to the CBMN assay has been shown to provide a valuable measure of chromosome breakage/rearrangement (14).

In the present study, we have estimated the rate of chromosomal instability in two well-known colorectal cancer cell lines and five clonal derivatives. The quantification of chromosome instability is based on the existence of ongoing structural alterations, which appear as nonclonal rearrangements, and on numerical alterations. Herein are reported the results of a study of cytokinesis-blocked colorectal cancer cells using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific centromeric probes to simultaneously detect nondisjunction and chromosome loss. Thus, it is postulated here that the CBMN assay can be used to analyze the aneuploidy rate by measuring nondisjunction and chromosome loss events in order to quantify numerical chromosome instability. This assay also provided information about NPB, MN, and NB as nuclear shapes common to unstable cells, so through the study of binucleated cells it

allows researchers to further explore the relationship between abnormal nuclear shapes and chromosome instability.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell lines and clones**

Two colorectal cancer cell lines, SW480 and HCT-116, and five clones from SW480, S1, S2, S4, S2.3, and S2.4, were used. Clones were obtained by limiting dilution and were grown for 30–60 cell doublings. These single-cell subclone outgrowths were designed as p1. Before fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments, the cells went through a minimum of passages. Cells were cultured in Leibovitz's L-15 medium with 10% fetal bovine serum and 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies, Gaithersburg, MD) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Metaphase spreads were prepared according to standard methods. Cultured cells on chamber slides were treated with 4% paraformaldehyde for 5 min and then washed with phosphate-buffered solution (PBS). Staining was performed using conventional methods.

### **CBMN assay: cell culture and harvest protocol**

The CBMN assay was described by Fenech and Morely (15) and performed according to Ponsa et al. (16). Ninety-two hours after trypsinization, cytochalasin B (2 mg/ml stock solution in DMSO; Sigma, St. Louis, MO) was added at a final concentration of 6 µg/ml to block cytokinesis. Harvesting began 144 h after initiation of the cultures. The tubes were centrifuged at 650 rpm for 8 min, the supernatant was carefully removed, and the fixative (methanol:acetic acid, 3:1) was added and immediately followed by three drops of formaldehyde. The fixative was changed by centrifugation and resuspension. This procedure was repeated twice, except for the addition of formaldehyde, until the supernatant was clean. Cells were resuspended in a minimal amount of fresh fixative to give a milky suspension. Slides were air dried for 10 min before being stained with Giemsa (Sigma). Scoring criteria for the selection of binucleated cells, MN, and NPB were as described by Fenech et al. (17). In brief, MN were morphologically identical, but their diameters were from 1/6 to 1/3 of the diameter of the nuclei, nonrefractive, and not linked to the main nuclei. NPB were continuous nucleoplasmic links between the nuclei in a binucleated cell, and the width of a NPB usually did not exceed 1/4 of the diameter of the nuclei within the cell. Nuclear blebs were defined as round or oval protrusions of the nuclear membrane, connected to the main nucleus by a thin chromatin segment (7).

### **FISH and comparative genomic hybridization (CGH)**

The multicolor-FISH procedure (18) was performed as described in the Vysis (Downers Grove, IL) protocol, with slight modifications (19). The number of metaphases analyzed for the parental cell line and for each subclone, as well as cell culture passages and the number of generations, are shown in [Table 1](#). Results were reported using an abbreviated format of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (20). Variability in chromosome structure was assessed by the number of nonclonal structural rearrangements divided by the number of analyzed cells. Structural chromosome rearrangements found in two or more metaphases of the

same subclone were defined as clonal, and those found only once were defined as nonclonal aberrations.

Centromeric probes for chromosomes 4, 7, 15, and 17 (Vysis) were used for FISH in the CBMN assay according to the manufacturer's instructions. Two hybridization rounds were performed, one with centromeres 4 and 17 labeled with SpectrumAqua and SpectrumGreen, respectively, and the other one with centromeres 7 and 15, labeled with SpectrumOrange and SpectrumGreen, respectively. The slides were coded and examined under an Olympus BX-51 fluorescence microscope equipped with the appropriate filter set. More than 200 binucleated cells were scored from the parental HCT-116 and SW480 cell lines as well as the subclones S1, S2, and S4. Intracellular variability of numerical aberrations was estimated as the percentage of nuclei with a number of centromere signals different from the modal number of signals for that particular chromosome.

According to the criteria described above, each slide was scored for the following: distribution of fluorescence signals, number of MN, number of NB, and presence of NPB. By using chromosome-specific centromeric probes, different patterns could be observed: nondisjunction was detected when a daughter cell showed one or more centromeric signals than the modal number and the other cell showed one or more centromeric signals less than the modal number. Chromosome loss was detected when a micronucleus showed at least one centromeric signal and the main nucleus lacked one or more signals.

A pancentromeric probe was obtained by alphoid-specific PCR from genomic human DNA (21) and labeled with Cy3-dUTP by random priming, and was used to analyze subclone S2. Codenaturation using HyBrite (Vysis) at 75°C for 3 min was performed. Posthybridization washes were carried out following the standard protocol. CGH (22) was optimized following the protocol described by Prat et al. (23).

### **Statistical analysis**

Contingency tables were analyzed by the Chi-square or Fisher's exact test as appropriate. All *P* values were estimated from two-sided statistical tests.

## **RESULTS**

### **Structural chromosome instability**

Multicolor-FISH and CGH analyses were performed for both parental cell lines, HCT-116 and SW480 ([Fig. 1A](#)), and all subclones. The description of the composite karyotypes coincides with those previously reported (5, 24, 25).

The results for structural chromosome instability are indicated in [Table 1](#). To quantify the rate of structural instability of each cell line and its subclones, the maximum rate (maxr) of instability was calculated (5). This rate takes into account only nonclonal alterations and assumes that they took place in the last generation (maxr = number of nonclonal alterations/number of cells). HCT-116 showed no detectable structural chromosomal heterogeneity. Conversely, de novo structural alterations were frequently observed in SW480 cells ([Table 1](#)), with a fivefold increase in subclones, with regard to parental cells ( $P < 0.001$ ). These results are in agreement with previous

studies (5), although due to the technical differences in the assessment of chromosomal alterations by multicolor-FISH and G-banding, the absolute maxr values cannot be directly compared. The subclone with the highest maxr was S2, as previously shown (5). A conservative assessment that assumes the accumulation of clonal and nonclonal alterations through generations, minimum rate of instability (minr), was also calculated (minr = number of alterations/number of cells/number of generations). Results of minr ([Table 1](#)) showed that the differences in the accumulation of structural alterations were in concordance with the maximum rate for each subclone.

The parental cell lines, HCT-116 and SW480, did not display any de novo clonal alterations. However, the SW480 subclones displayed several de novo clonal chromosome aberrations, although they were not present in all of the cells analyzed. Regarding de novo nonclonal alterations, they mostly appeared as unbalanced translocations. They usually involved the whole arm of a chromosome, with breakpoints near the centromere; complex translocations were also frequently observed. Dicentric chromosomes were also present as nonclonal chromosome markers, but with a very low frequency. Furthermore, rearrangements found in subclones tended to involve both chromosome markers and nonrearranged chromosomes from the parental cell line. For example, der(14)t(2;12;14) appears as a new clonal alteration in subclone S1 ([Fig. 1B](#)). Material from chromosomes 2 and 12 proceeded from the chromosomal marker der(2)t(2;12) described in the parental cell line ([Fig. 1A](#)). The presence of de novo clonal and nonclonal alterations in SW480 subclones allowed the tracing of chromosome marker evolutionary paths. For example, subclone S2.4 keeps the der(2)t(2;13;17) generated in subclone S2 ([Fig. 1C](#) and [1D](#)). Variability in the chromosomes involved in novel aberrations was observed. Thus, chromosomes involved more than three times in new rearrangements in subclone S1 were 5, 12, 13, 14, and 17; in subclone S2 were 2, 3, 11, 13, 18, 19, and 21; in subclone S2.3 were 3, and in subclone S4 were 2, 18, and 19. Overall, our results suggest that the structural heterogeneity observed in subclones was not always generated by remodeling chromosomal markers from the parental cell line. Small differences were observed between CGH data of the parental cell line and the subclones.

### **Numerical chromosome instability**

Intracellular chromosome number variability was evaluated as the percent of nuclei with a number of centromere signals different from the modal number according to the composite karyotype of each cell line and subclone ([Table 2](#)). The variability of centromere signals for the analyzed chromosomes was 2% for the HCT-116 cell line, while the values for SW480 and its subclones was, on average, 22%. The differences in the average numerical variability among HCT-116 and SW480 and its subclones were highly significant ( $P < 0.0001$ ). These results agree with previously published data (5). SW480 subclones displayed heterogeneous chromosome number variability, but values were in the same range as those in the parental cell line.

The results of nondisjunction and chromosome loss events obtained by the analysis of binucleated cells are indicated in [Table 3](#) and [Fig. 2](#). As was expected, cell line HCT-116 showed a very low level of aneuploidy. It also indicated that the concentration of the cytochalasin B used did not induce either numerical changes or the formation of abnormal nuclear shapes. The SW480 cell line and its subclones showed a significantly higher rate of numerical instability when compared with HCT116 cells ( $P < 0.0001$  for all chromosomes analyzed). No differences

were observed between the parental SW480 cell line and the subclones ([Table 3](#)). When looking at the chromosomes analyzed in the same table, the most frequently affected chromosome was chromosome 15, followed by 7, 17, and 4. The total number of nondisjunctions and chromosome losses for the chromosomes analyzed ([Table 4](#)) allowed for the elucidation of the aneuploidy rate for these chromosomes and for the whole genome.

The CBMN assay showed that abnormal nuclear shapes were more frequent in the SW480 cell line and its subclones than in HCT-116 ([Table 5](#) and [Fig. 2G](#)). Subclone S2 displayed the highest number of abnormal nuclear shapes. On the other hand, subclone S4 showed the highest number of NB. Moreover, the relative frequencies of MN with  $\alpha$ -satellite signal (MN with signal/total MN) for the chromosomes analyzed were calculated ([Table 6](#)). These relative frequencies were similar in SW480 parental cell lines and its subclones, except for subclone S1.

The high number of abnormal nuclear shapes found in subclone S2, prompted us to analyze 136 binucleated cells of this subclone, which displayed some kind of abnormal nuclear shape with a pancentromeric probe ([Fig. 2H](#) and [2I](#)). We found 64 binucleated cells with MN, 43 with NB, and 32 with NPB. When the behavior of centromeres in these cells was analyzed, no differences between the frequency of micronuclei with a centromere signal and MN without it were detected. On the other hand, when we analyzed NB, we found centromere signals in most of them, and only 2 out of 43 did not show centromere signals in the NB. Centromeric signals were observed in 6 out of 32 NPB.

Cell culture analysis showed cytoplasmic bridges connecting neighboring cells through cytoplasmic channels in both the parental SW480 cell line and its subclones. HCT-116 cultures did not show these intercytoplasmic connections. The observation of cytoplasmic bridges among neighboring cells in culture not only agrees with the hypothesis of intercellular connections in malignant tissues (7), but also offers the possibility to inhibit cell division, allowing transactivation of apoptosis pathways preventing cell survival.

## DISCUSSION

Overall, our results reveal that the parental SW480 cell line and subclones show high and similar levels of ongoing aneuploidy rates. The subclones are clearly characterized by multiple chromosome rearrangement events when they were compared with parental cell line SW480. CGH analysis is unable to detect the striking heterogeneity of structural alterations observed by multicolor-FISH analysis. These results imply that chromosome reorganizations resulting in new chromosome markers in the clones are not acquired in the majority of the tumor cell population as substantial gains or losses of DNA. In the same way, the high levels of aneuploidy rate do not imply that de novo numerical chromosome aberrations will be fixed in the karyotypes.

These results are consistent with our previously published data (5) in which, by means of G-banding, we found higher maximum instability rates than in the current study. Thus, the use of M-FISH in this study allows for complete identification of all chromosome rearrangements and can justify the differences in the instability rates. Consequently, the structural instability levels are lower because of the improved identification of the chromosome markers.

The results obtained confirm the low unstable status of the HCT-116 cell line, in agreement with previous reports (26). To the contrary, results of SW480 and subclones showed that, in spite of the presence of a similar composite karyotype, there is a mechanism of rearrangement generation characterized by a continuous disruption of chromosomal integrity (6). This dynamic engine of structural chromosome instability, also proposed for prostate and ovarian cancers (4, 26), allows for the emergence of new chromosome rearrangements. The level of stabilization depends on the maximum structural instability rate and, obviously, on a selective advantage to growth in cell culture. In this case, since the rate of structural chromosome rearrangement formation is significantly lower in the parental SW480 cell line compared with its subclones, we suggest a mechanism that triggers a karyotypic destabilization when subclones are generated. Thus, two interpretations are possible for the observed higher structural chromosome heterogeneity in the subclones as compared with parental cells: that the instability is higher in the subclones or that the instability is the same but the effect (heterogeneity) is restrained in parental cells due to competitiveness. In any case, the biological implications are the same: clonal episodes appear to favor an increase of potential heterogeneity.

So far, FISH with chromosome-specific centromeric probes has been used as a tool to measure cell-to-cell variations in chromosome number (heterogeneity). The average numerical variability ([Table 2](#)) measures the number of cells with a chromosome number different from the modal number, but these data do not indicate the dynamic rate for the accumulation of aneuploidy. The rates of aneuploidy for each cell line are indicated in [Table 3](#). To the best of our knowledge, this report is the first contribution to the quantification of the aneuploidy rate by means of the CBMN assay in tumor cells and also the first to analyze the nondisjunction and chromosome loss events in colorectal cancer cell lines. The study of cell line HCT-116 demonstrated a low numerical variability and was extremely useful as a negative control for the CBMN assay, since some authors have reported a possible genotoxic effect of cytochalasin B at high concentrations (27). When comparing numerical instability rates between the parental SW480 cell line and its subclones, we observed that all rates were very similar, suggesting a continuous generation of numerical alterations without stabilizing them.

The two main mechanisms to generate aneuploidy have been analyzed herein: nondisjunction and chromosome loss. The low frequency of both events in HCT-116 is in agreement with the low frequency of numerical heterogeneity. In the parental SW480 cell line and its subclones, chromosomes showing the highest rates of aneuploidy were chromosomes 7 and 15. A possible explanation could be the involvement of chromosome 7 in two structural aberrations, and the implication of  $\alpha$ -satellite signals for chromosome 15 in the formation of semi-unstable dicentric chromosomes in this cell line (28). Notwithstanding, chromosome 4 displayed the lowest aneuploidy rate, which coincides with the low intermetaphase heterogeneity observed by M-FISH. Interestingly, only chromosome 15 showed significant differences between nondisjunction and chromosome loss events.

Assuming that aneuploidy events occur randomly over the whole genome, a correction factor of  $mn/8$  and  $mn/14$  was applied to the rate of HCT116 and the rates of parental SW480 and each subclone, respectively,  $mn$  being the modal chromosome number, and 8 and 14 the number of total centromeric signals observed. Thus, the definitive aneuploidy rates were 1.46 per cell division in the parental SW480 cell line, and 2.05, 1.57, and 1.53 per cell division in subclones S1, S2, and S4, respectively ([Table 4](#)).

The CBMN assay also permits the detection of abnormal nuclear shapes indicative of clastogenic events. BFB cycles may lead to a considerable intercellular heterogeneity participating in the formation of dicentric or ring chromosomes and, in turn, generating anaphasic bridges (7). According to Thomas et al. (14), the CBMN assay is one of the best and simplest methods to measure NPB because the inhibition of cytokinesis prevents the loss of this structure, which would otherwise occur if cell division was completed. In general, both the parental SW480 cell line and its subclones showed frequencies of NPB clearly higher than control lymphocytes studied in our laboratory (16). Complex chromosome alterations such as those found in the metaphases analyzed in this study could also be involved in the formation of NPBs. When we compared the values of the subclones with the parental cell line, and among themselves, we saw that subclone S2 accumulated the highest number of abnormal nuclear shapes. On the other hand, we noticed that subclone S4 was the one that showed the highest number of NB. These data agree with the structural chromosome instability analysis by M-FISH, because subclones S2 and S4 seemed to be the ones with the highest rates of structural chromosome instability. When the binucleated cells with MN were analyzed, we found no significant differences between SW480 and its subclones.

By extrapolating the frequencies of MN with an  $\alpha$ -satellite signal for the chromosomes tested to achieve genomic relative frequencies, we observed that, as expected, the majority of MN contained whole chromosomes. However, by using the pancentromeric probe in subclone S2, we observed that only 50% of the MN showed a centromere signal, suggesting that acentric fragment losses in this subclone were higher than those theoretically expected. Interestingly, when the results of the pancentromeric hybridization in subclone S2 were analyzed, we noticed that most of the NB showed centromere signals, indicating that NB could eliminate not only pools of fragmented DNA (8) or gene amplifications (29), but also entire chromosomes, and serve as a chromosome loss mechanism to the cell. Assuming that NB might act as putative MN, one could explain the discrepancies between data obtained by using the pancentromeric probe and those obtained by calculating relative genomic frequencies in subclone S2.

Overall, we can conclude that the parental SW480 cells and its subclones showed numerical and structural chromosome instability, both measured by the CBMN assay. Whereas numerical instability is maintained in parental and subclonal cells, structural instability increased in subclones, suggesting that structural alterations appear to play a major role in conferring genetic heterogeneity, potentially surpassing the variability observed at the numerical level. These data suggest that a “hit” mutation might destabilize the karyotype, thus generating structural chromosome instability. Finally, this study demonstrates that the CBMN assay is not only one of the most commonly used methods to measure DNA damage in cells exposed to genotoxic compounds, but it also provides a comprehensive measurement of chromosome breakage, rearrangements, aneuploidies (by nondisjunction or chromosome loss), gene amplification, necrosis, and apoptosis (30). In the present report, the importance of using this assay in the analysis of genome instability in tumor cells is shown and we highly recommend it to study the presence of nuclear atypical shapes in primary tumor cells.

## ACKNOWLEDGMENTS

The research was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2003/5821) and by the Generalitat de Catalunya (CIRIT 2001SGR-00201). JC is supported by a grant from the

Universitat Autònoma de Barcelona. IP is supported by the Consejo de Seguridad Nuclear. EP is a recipient of a fellowship from IMIM. We thank Dr. Francisca Garcia for cell culture service and Ms. Àngels Niubó for technical assistance.

## REFERENCES

1. Nowell, P. C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28
2. Loeb, L. A., Springgate, C. F., and Battula, N. (1974) Errors in DNA replication as a basis of malignant change. *Cancer Res.* **34**, 2311–2321
3. Loeb, L. A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**, 3075–3079
4. Beheshti, B., Park, P. C., Sweet, J. M., Trachtenberg, J., Jewett, M. A., and Squire, J. A. (2001) Evidence of Chromosomal Instability in Prostate Cancer Determined by Spectral Karyotyping (SKY) and Interphase FISH Analysis. *Neoplasia* **3**, 62–69
5. Ribas, M., Masramon, L., Aiza, G., Capellà, G., Miró, R., and Peinado, M. A. (2003) The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J.* **17**, 289–291
6. Gisselsson, D., Pettersson, L., Hoglund, M., Heidenblad, M., Gorunova, L., Wiegant, J., Mertens, F., Dal Cin, P., Mitelman, F., and Mandahl, N. (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5357–5362
7. Gisselsson, D., Bjork, J., Hoglund, M., Mertens, F., Dal Cin, P., Akerman, M., and Mandahl, N. (2001) Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am. J. Pathol.* **158**, 199–206
8. Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., Strombeck, B., Dal Cin, P., Hoglund, M., Mitelman, F., Mertens, F., and Mandahl, N. (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 12683–12688
9. Lengauer, C., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1998) Genetic instability in human cancers. *Nature* **396**, 643–649
10. Duesberg, P., and Li, R. (2003) Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidization. *Cell Cycle* **2**, 202–210
11. Fabarius, A., Hehlmann, R., and Duesberg, P. (2003) Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet. Cytogenet.* **143**, 59–72
12. Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* **455**, 81–95



13. Fenech, M. (2002) Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today* **7**, 1128–1137
14. Thomas, P., Umegaki, K., and Fenech, M. (2003) Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* **18**, 187–194
15. Fenech, M., and Morley, A. A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* **147**, 29–36
16. Ponsa, I., Barquinero, J. F., Miró, R., Egozcue, J., and Genescà, A. (2001) Non-dijunction and chromosome loss in gamma-irradiated human lymphocytes: A fluorescence in situ hybridization analysis using centromere-specific probes. *Radiation Research* **155**, 424–431
17. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65–75
18. Speicher, M. R., Ballard, S. G., and Ward, D. C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* **12**, 368–375
19. Gutierrez, N. C., Camps, J., Hernandez, J. M., Garcia, J. L., Prat, E., Gonzalez, M. B., Miro, R., and San Miguel, J. F. (2003) Multicolor fluorescence in situ hybridization studies in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematol. J.* **4**, 67–70
20. ISCN (1995) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (Mitelman, F., ed), S. Karger, Basel
21. Weier, H. U., Kleine, H. D., and Gray, J. W. (1991) Labeling of the centromeric region on human chromosome 8 by in situ hybridization. *Hum. Genet.* **87**, 489–494
22. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridisation for molecular cytogenetics analysis of solid tumors. *Science* **258**, 818–820
23. Prat, E., Bernués, M., Caballín, M. R., Egozcue, J., Gelabert, A., and Miró, R. (2001) Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology* **57**, 986–992
24. Masramon, L., Ribas, M., Cifuentes, P., Arribas, R., García, F., Egozcue, J., Peinado, M., and Miró, R. (2000) Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridisation, and whole chromosome painting. *Cancer Genet. Cytogenet.* **121**, 17–21

25. Abdel-Rahman, W. M., Katsura, K., Rens, W., Gorman, P. A., Sheer, D., Bicknell, D., Bodmer, W. F., Arends, M. J., Wyllie, A. H., and Edwards, P. A. (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 2538–2543
26. Roschke, A. V., Stover, K., Tonon, G., Schäffer, A. A., and Kirsch, I. R. (2002) Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* **4**, 19–31
27. Norppa, H., Renzi, L., and Lindholm, C. (1993) Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* **8**, 519–525
28. Camps, J., Mrasek, K., Prat, E., Weise, A., Starke, H., Egozcue, J., Miró, R., and Liehr, T. (2004) Molecular cytogenetic characterization of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol. Rep.* **11**, 1215–1218
29. Toledo, F., Le Roscouet, D., Buttin, G., and Debatisse, M. (1992) Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J.* **11**, 2665–2673
30. Fenech, M., and Crott, J. W. (2002) Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat. Res.* **504**, 131–136

*Received July 23, 2004; accepted January 19, 2005.*

**Table 1****Genomic variability and structural chromosome instability in colorectal cancer cell lines and its subclones<sup>a</sup>**

Cell Line/ Subclone	No. of generations	No. of metaphases analyzed	Modal chromosome number	Variability of chromosome number <sup>b</sup>	De novo structural alterations				
					Clonal	Nonclonal	Total	Minr <sup>c</sup>	Maxr <sup>d</sup>
HCT-116 [p. 29]	—	17	45/46	—	—	—	—	—	—
SW480 [p. 58]	—	28	58	22	0	8	8	—	0.285
SW480 S1 [p. 2]	45	19	55	14	6	21	27	0.031	1.105
SW480 S2 [p. 7]	43	12	54	3	5	26	31	0.060	2.166
SW480 S4 [p. 5]	52	18	56	14	2	24	26	0.027	1.333
SW480 S2.3 [p. 5]	48	10	51	2	4	14	18	0.037	1.400
SW480 S2.4 [p. 9]	52	11	52	6	1	11	12	0.021	1.000

<sup>a</sup>Cell culture passages for the parental cell lines and subclones are indicated in brackets. <sup>b</sup>Number of metaphases with a number of chromosomes different from the modal number. <sup>c</sup>The minimum rate of instability (minr) indicates the number of alterations/number of cells/number of generations. <sup>d</sup>Maximum rate of instability (maxr) indicates number of alterations (only nonclonal) per cell assuming that all of them took place in the last cell division (maxr = number of nonclonal alterations/number of cells).

**Table 2****Numerical chromosome variability in colorectal cancer cell lines and SW480 subclones<sup>a</sup>**

<b>Cell Line/Subclone</b>	<b><math>\alpha</math>-sat chr. 4</b>		<b><math>\alpha</math>-sat chr. 7</b>		<b><math>\alpha</math>-sat chr. 15</b>		<b><math>\alpha</math>-sat chr. 17</b>		<b>Average</b>
HCT-116	[2]	—	[2]	4.2%	[2]	3.2%	[2]	0.5%	2%
SW480	[2]	4.2%	[4]	17.5%	[5] <sup>b</sup>	51.7%	[3]	9.5%	20.7%
SW480 S1	[2]	4.2%	[4]	27.8%	[5]	31.3%	[3]	5.2%	17.1%
SW480 S2	[2]	5.8%	[4]	56.7%	[5]	46.7%	[3]	9.3%	29.6%
SW480 S4	[2]	11.5%	[4]	24.3%	[5]	33.6%	[3]	14.6%	21%

<sup>a</sup>Interphase FISH with  $\alpha$ -sat DNA for chromosomes 4, 7, 15, and 17 was performed on both parental cell lines HCT-116 and SW480, and on the subclones of SW480. Numbers in brackets indicate the modal number for each chromosome tested. Percentages indicate the fraction of cells whose number of signals was different from the modal number. At least 400 cell nuclei were analyzed. <sup>b</sup>The modal number for chromosome 15 was considered to be 5 according to previous results (27).

**Table 3****Distribution of chromosome loss and nondisjunctional events**

<b>Cell Line/Subclone</b>	<b>BN analyzed<sup>a</sup></b>	<b>Chromosome loss</b>	<b>Nondisjunction</b>
<b>Chromosome 4</b>			
HCT-116	203	—	—
SW480	210	4 (1.90%)	4 (1.90%)
SW480 S1	202	8 (3.96%)	2 (0.99%)
SW480 S2	230	2 (0.86%)	5 (2.17%)
SW480 S4	208	1 (0.48%)	7 (3.36%)
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>18</b>
<b>Chromosome 7</b>			
HCT-116	200	—	2 (1.00%)
SW480	202	16 (7.92%)	8 (3.96%)
SW480 S1	201	17 (8.45%)	21 (10.44%)
SW480 S2	201	6 (2.98%)	8 (3.98%)
SW480 S4	205	7 (3.41%)	21 (10.24%)
<b>Total</b>		<b>46</b>	<b>60</b>
<b>Chromosome 15</b>			
HCT-116	200	—	3 (1.50%)
SW480	202	15 (7.42%)	13 (6.43%)
SW480 S1	201	22 (10.94%)	21 (10.44%)
SW480 S2	201	13 (6.46%)	35 (17.41%)
SW480 S4	205	4 (1.95%)	26 (12.68%)
<b>Total</b>		<b>54</b>	<b>98</b>
<b>Chromosome 17</b>			
HCT-116	203	—	—
SW480	210	4 (1.90%)	8 (3.81%)
SW480 S1	202	7 (3.46%)	7 (3.46%)
SW480 S2	230	11 (4.78%)	5 (2.17)
SW480 S4	208	2 (0.96%)	11 (5.28)
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>31</b>

<sup>a</sup>BN indicates binucleated cells.

**Table 4****Numerical chromosome instability in colorectal cancer cell lines and SW480 subclones<sup>a</sup>**

	<b>Total CL</b>	<b>Total ND</b>	<b>Aneuploidy rate (Chr. 4, 7, 15, 17)<sup>b</sup></b>	<b>Aneuploidy rate (Whole genome)<sup>c</sup></b>
HCT-116	—	0.025	0.025	0.144
SW480	0.192	0.161	0.353	1.461
SW480 S1	0.268	0.254	0.522	2.050
SW480 S2	0.151	0.257	0.408	1.575
SW480 S4	0.068	0.316	0.384	1.536

<sup>a</sup>CL, chromosome loss. ND, nondisjunction. <sup>b</sup>Aneuploidy rate for chromosomes 4, 7, 15, and 17 measures cells affected by some aneuploidy-generating event, either chromosome loss or nondisjunction. Thus, clonal chromosome number variability has not been considered as numerical instability. <sup>c</sup>Aneuploidy rate for the whole genome was calculated applying a correction factor of  $mn/8$  to HCT116 and  $mn/14$  to the rates of parental SW480 and each subclone,  $mn$  being the modal chromosome number, and 8 and 14 (2#4, 4#7, 5#15, 3#7) are the number of total centromeric signals observed in each cell line and subclones.

**Table 5****Summary of the abnormal nuclear shapes detected in the study of binucleated cells<sup>a</sup>**

<b>Cell Line/Subclone</b>	<b>BN totals</b>	<b>BN + NPB</b>	<b>Frequency</b>	<b>BN + MN</b>	<b>Frequency</b>	<b>BN + NB</b>	<b>Frequency</b>
HCT-116	403	6	1.50%	13	3.20%	—	—
SW480	412	42	10.00%	56	13.60%	24	5.80%
SW480 S1	403	51	12.60%	67	16.60%	14	3.40%
SW480 S2	431	110	26%	91	21.10%	22	5%
SW480 S4	413	116	28%	65	15.70%	17	8.10%

<sup>a</sup>BN, binucleated cells; NPB, nucleoplasmic bridge; MN, micronuclei; NB, nuclear bleb.

**Table 6**

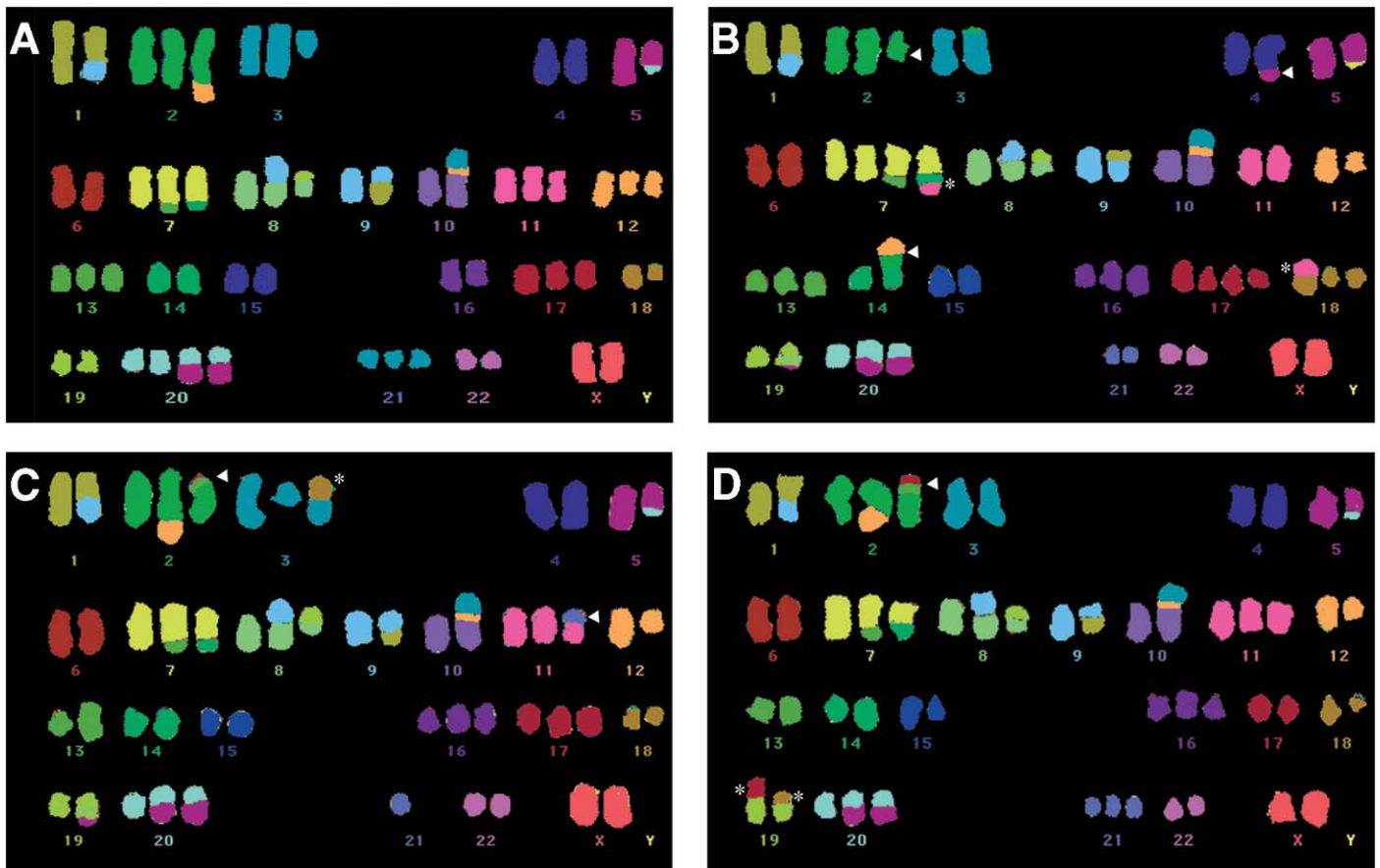
**Relative frequencies of micronuclei containing an  $\alpha$ -satellite signal for the chromosomes tested and for the whole genome<sup>a</sup>**

<b>Cell line/ Subclone</b>	<b>Total MN</b>	<b>MN without signal</b>	<b>Frequency</b>	<b>MN with signal</b>	<b>Frequency</b>	<b>Genomic frequency<sup>b</sup></b>
HCT116	14	14	1	0	0	0
SW480	88	64	0.727273	24	0.272727	1.129
SW480S1	59	21	0.355932	38	0.644068	2.532
SW480S2	108	83	0.768519	25	0.231481	0.892
SW480S4	70	55	0.785714	15	0.214286	0.857

<sup>a</sup>MN, micronuclei. <sup>b</sup>Relative frequencies for the whole genome were calculated applying a correction factor of mn/8 to HCT116 and mn/14 to the rates of parental SW480 and each subclone, mn being the modal chromosome number, and 8 and 14 (2#4, 4#7, 5#15, 3#7) are the number of total centromeric signals observed in each cell line and subclones.

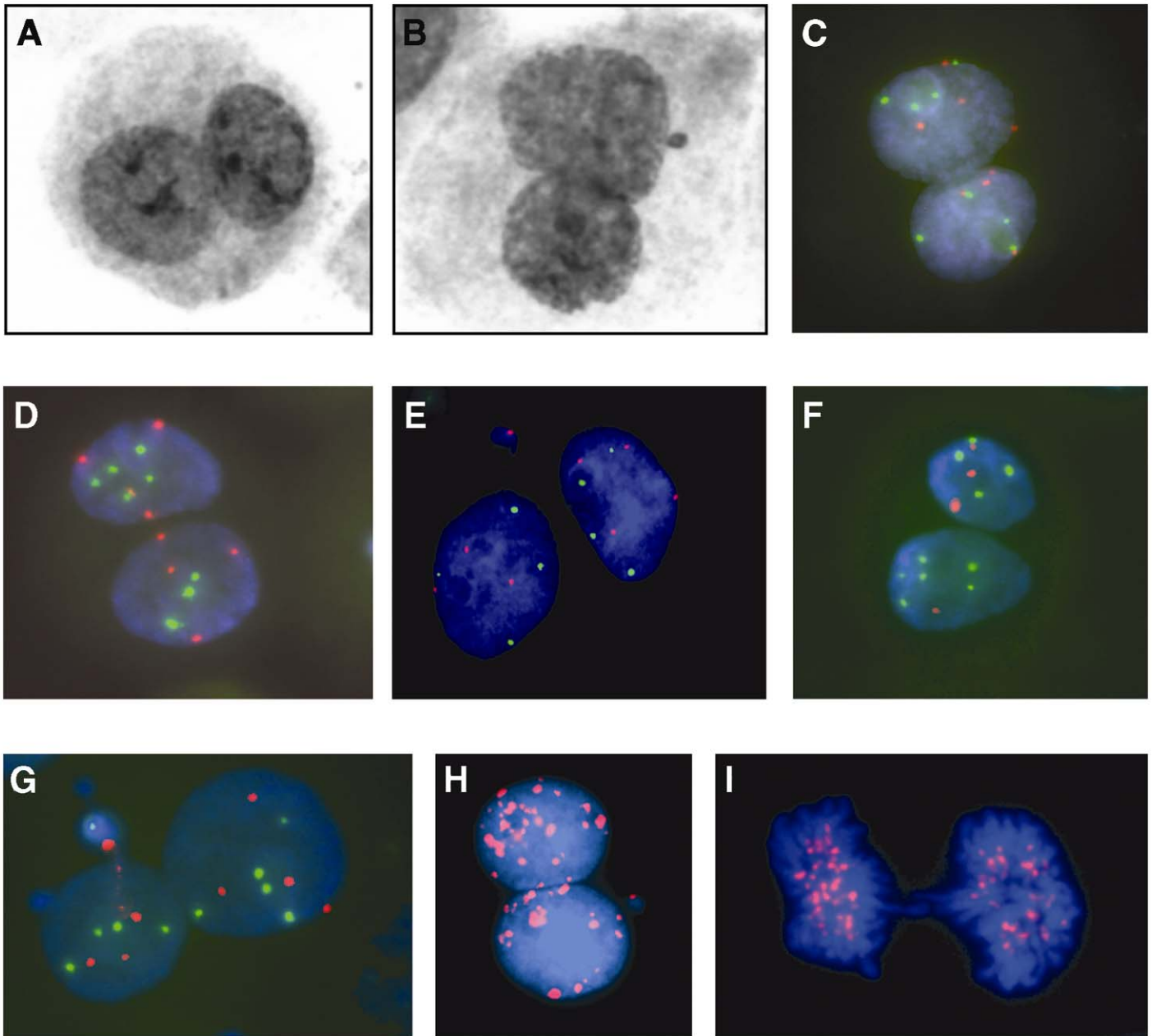


Fig. 1



**Figure 1. Pseudocolored karyotypes of SW480 and its subclones by multicolor-FISH.** Arrowheads indicate de novo clonal chromosomal alterations present in the subclone, and asterisks indicate de novo nonclonal chromosomal alterations. **A)** Karyotype of the SW480 parental cell line. The chromosome alterations of this karyotype were shown in most of the metaphases. **B)** Karyotype of subclone SW480 S1. It showed three clonal alterations in most metaphases. **C)** Karyotype of the subclone SW480 S2. **D)** Karyotype of subclone SW480 S2.4. The same de novo clonal chromosomal rearrangement ( $\text{der}(2)\text{t}(2;13;17)$ ) was shown for subclones S2 and S2.4.

**Fig. 2**



**Figure 2. Images of several events in binucleated cells.** *A*) Normal binucleated cell using Giemsa staining. *B*) A binucleated cell with a micronucleus stained with Giemsa. *C*) Normal binucleated cell of the parental SW480 cell line using centromeric probes for chromosomes 7 (SpectrumOrange) and 15 (SpectrumGreen). Both nuclei of this cell show four signals for the chromosome 7 and four signals for chromosome 15. *D*) A nondisjunction event has occurred in a cell of the parental SW480 cell line. One nucleus presents five signals for the centromere of chromosome 15, while the other nucleus shows only three. *E*) A chromosome loss event in a cell of the parental SW480 cell line. Here, the micronucleus contains the signal for the centromere of chromosome 7. What this probably means is that the whole chromosome has been removed from the main nucleus. *F*) Both chromosomes, 7 and 15, are involved in two nondisjunctional events that have occurred in subclone S1. *G*) Centromeric probes for chromosomes 7 and 15 were detected in a nuclear bleb in subclone S1. *H*) A centromeric signal detected in micronuclei when we performed the pancentromeric probe in subclone S2. *I*) Anaphasic bridge without a centromeric signal was frequently observed in the analysis of subclone S2 using a pancentromeric probe.

---

#### **4.4. Treball IV**

Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano J, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miró R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. (En revisió, *Carcinogenesis*, ref. Carcin-2005-00340)

Indexed by Thomson-ISI Journal Citation Reports

ISI 2004 Impact Factor: 5,375

---

**Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors**

Jordi Camps<sup>1</sup>, Gemma Armengol<sup>2</sup>, Javier del Rey<sup>1</sup>, Juanjo Lozano<sup>3</sup>, Hanna Vauhkonen<sup>4</sup>, Esther Prat<sup>1</sup>, Josep Egozcue<sup>1</sup>, Lauro Sumoy<sup>3</sup>, Sakari Knuutila<sup>4</sup>, Rosa Miró<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia and Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>2</sup> Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

<sup>3</sup> Programa de Bioinformàtica i Genòmica, Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Laboratory of Cytomolecular Genetics, Department of Pathology, Haartman Institute and HUSLAB, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland.

Correspondence should be addressed to:

Prof. Sakari Knuutila, Laboratory of Cytomolecular Genetics, Haartman Institute, POB 21 (Haartmaninkatu 3, 4<sup>th</sup> floor), FI-00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland. E-mail: [Sakari.Knuutila@helsinki.fi](mailto:Sakari.Knuutila@helsinki.fi); and Jordi Camps, Laboratory of Citogenetics, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain E-mail: [Jordi.Camps@uab.es](mailto:Jordi.Camps@uab.es)

ABBREVIATIONS: CIN, chromosome instability; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; CRC, colorectal cancer; CGH, comparative genomic hybridization

SHORT TITLE: Genomic alterations in MSS and MSI colorectal tumors.

## ABSTRACT

Genomic copy number changes are frequently found in cancers and they have been demonstrated to contribute to carcinogenesis; and it is widely accepted that tumors with microsatellite instability (MSI) are genetically stable and mostly diploid. In the present study we compared the copy number alterations and the gene-expression profiles of microsatellite stable (MSS) and MSI colorectal tumors. A total number of 31 fresh-frozen primary tumors (16 MSS and 15 MSI) were used. Twenty-eight samples (15 MSS and 13 MSI) were analyzed with metaphase comparative genomic hybridization (CGH), nine of which plus one additional sample (4 MSS and 6 MSI) were further analyzed by cDNA-based array CGH. Gene expression analysis was performed with six samples (3 MSS and 3 MSI, four of these used in metaphase CGH analysis) to identify differentially expressed genes possibly located in the lost or amplified regions found by CGH, stressing the biological significance of copy number changes. Metaphase and array CGH analysis of two colon cancer cell lines (HTC116 and SW480, reported as MSI and MSS archetypes) gave comparable results. Alterations found by metaphase CGH in MSS tumors were +20, +8q, -8p and -18q. Interestingly, 1p22, 4q26 and 15q21 were found deleted preferentially in MSS tumors, while 22q13 was found gained in MSI tumors. The regions of alterations identified by array-CGH were gains at 8q24, 16q24.3, and 20q13, and the loss of 5q21, appearing in the both types of tumors. Gene expression analysis revealed genes with specific associations with the copy number changes of the corresponding genomic regions. As a conclusion, colorectal cancer is a heterogeneous disease, demonstrated by the genomic profiles of individual samples. However, our data shows that copy number changes do not occur exclusively in the MSS phenotypes.

## INTRODUCTION

The majority of colorectal cancers (CRC) are considered sporadic, having developed from an accumulation of mutations throughout the course of a lifespan. Genetic instability is a defining characteristic of most of cancer cells. Two forms of genetic instability have been identified in sporadic colorectal tumors: chromosomal instability (CIN), and microsatellite instability (MSI). Briefly, more than 80% of CRCs correspond to CIN tumors. They are caused by mutations in genes that are required to maintain chromosomal stability, leading to the accumulation of gains and losses of chromosomes (aneuploidy) as well as by structural chromosomal rearrangements [1-3]. On the other hand, MSI tumors show mutations in the mismatch repair genes leading to mutations in microsatellite DNA sequences and in genes close to them [4,5]. These tumors usually show a stable, diploid karyotype. Nevertheless, recent studies have demonstrated that MSI tumors can also present genetic imbalances [6], and both forms of genetic instability can coexist in some colorectal primary tumors [7] and cell lines [8,9].

The molecular cause of genomic instability is one of the most active research areas in cancer biology. MSI tumors are characterized by mutations in proofreading genes coding for mismatch repair enzymes, such as *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, and *PMS2* [10,11], and by silencing the *hMLH1* promoter by methylation. Somatic mutations in *APC* (5q), *DCC*, *SMAD2* and *SMAD4* (18q), *TP53* (17p), *KRAS* (12p), and  *$\beta$ -catenin* (3p) genes are involved in CRC tumorigenesis [12,13]. Other genes related to CIN tumors have also been reported. Thus, genes affecting the double-strand breakage repair mechanisms, e.g., *MRE11*, *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, and *BRCA2*, and genes involved in ploidy maintenance and the chromosomal segregation, e.g., *BUB1B* [14] and *SMAD4* have been demonstrated to be involved in the genomic stability of cancer cells.

Classical cytogenetics from primary colorectal tumors reported that the most frequent numerical changes were, in order of decreasing frequency, +7, -18, -14, +13, and -22. The gains of chromosome arms 8q, 17q, 20q, and the losses of 8p and 17p are also unbalanced chromosomal alterations previously identified [15,16]. To overcome G-banding limitations, conventional comparative genomic hybridization (CGH) has been used to detect aneuploidies and chromosomal alterations in colorectal tumors [17-20]. In these studies, CRCs have often shown extra copies of chromosomes 1, 13, and 20 and of chromosome arms 7p and 8q, whereas chromosome 4 and chromosome arms 8p and 10q were frequently underrepresented. Cytogenetic/CGH data are documented in the Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), and at [www.helsinki.fi/cmug](http://www.helsinki.fi/cmug) [21].

Recently, microarray technologies have provided new ways to explore genomic imbalances and different gene expression [22,23]. Array-based CGH represents a magnificent tool to study gene dosage imbalances in solid tumors [24]. Recent studies using BAC-arrays covering the human genome at about 1Mb resolution have been reported in CRC [25-27]. Consistent frequencies of copy number changes were identified, including gains of chromosomes/chromosome arms 20q, 8q, and 13. Losses of chromosomes/chromosome arms 18q, 17p, 18p, 8p, and 14q were frequently found, whereas minor losses were detected at 1p, 4q, 5q, and 15q. A recent study established a genetic signature which could be used in clustering CRCs according to Duke's stages [28]. Moreover, six differentially expressed genes was found in CIN and MSI phenotypes cell line analysis [29].

The purpose of the present study was to investigate genomic imbalance differences between microsatellite stable (MSS) and microsatellite unstable (MSI) CRCs, using metaphase CGH (mCGH), array-CGH (aCGH) and expression arrays to

assess gene expression profiles. Moreover, two cell lines, HCT116 (MSI archetype) and SW480 (CIN archetype), whose molecular karyotype have been described in our laboratory [30,31] were also analyzed by both CGH methods. Our aim was to generate a comprehensive picture of the genomic alterations that occur differentially in both forms of colorectal tumors, and to identify chromosomal regions that may contain candidate genes important for the development of cancer cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Tumor samples and cell lines*

A total of thirty-one fresh-frozen colorectal tumors (16 MSS and 15 MSI) from Dukes' stages A-D were used for this study. Twenty-eight of these samples were used in the mCGH analysis, of which nine were further analysed by aCGH and four by expression arrays. One sample was used for aCGH only, and two for expression analysis only. Samples were kindly provided by Dr Miguel A. Peinado from Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals and Dr. S. Schwartz Jr. from Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. Clinical characteristics are listed in Table 1. MSI status was analyzed as previously described [32]. None of the patients with MSI tumors showed HNPCC-related family history according to Amsterdam criteria [33]. Additionally, two CRC cell lines were used in the present study: HCT116 and SW480 (ATCC; Manassas, VA). Both were cultured using DMEM medium supplemented with fetal bovine serum 10% and glutamine 1%. Genomic DNA was extracted by the phenol-chloroform method. Before extraction, evaluation by the pathologist determined that the proportion of tumor cells was higher than 60%. Reference DNA for CGH hybridizations was extracted from peripheral blood lymphocytes of healthy individuals.



Total RNA from six primary tumors (three MSS and three MSI) and from adjacent tissue with a normal histology, was isolated using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen; Hilden, Germany). Two samples included in the gene expression profiling were not analyzed by CGH. Prior to microarray hybridization, the integrity of total RNA was confirmed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Palo Alto, CA).

#### *Metaphase CGH (mCGH)*

Metaphase CGH [34] was performed as previously described [35]. Slides were analyzed using the Isis Imaging System, Metasystems software (Altusheim, Germany). Ratio values greater than 1.25 and less than 0.75 were considered as chromosomal gains and losses, respectively. Values were log<sub>2</sub> transformed for plotting purposes. Sex chromosomes were not taken into account in the analysis.

#### *CGH on cDNA microarrays (aCGH)*

Array-based CGH experiments were conducted as previously described on commercial cDNA microarrays (Human 1.0; Agilent Technologies; Palo Alto, CA) containing clones of approximately 13,000 genes [36-38]. 982 of the clones had replicates on the array. Briefly, 20 µg of reference and sample DNA were digested with Alu1 and Rsa1 restriction enzymes (Life Technologies, Inc.; Rockville, MD). Digested samples were purified using the basic phenol-chloroform method. Labeling was performed as previously described [23]. Briefly, six µg of digested tumor and reference DNA were labeled with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP (Amersham Biosciences Corp.; Piscataway, NJ), respectively, by RadPrime DNA labeling system (Gibco BRL; Gaithersburg, MD). Hybridization and post-hybridization washes were carried out as previously described [37]. Slides were scanned using an Agilent laser confocal scanner (G2565AA). Microarray images were analyzed with the Feature Extraction software

(version 6.1.1, Agilent Technologies) using the locally weighted linear-regression curve fit option. Only those probes with a known position in the genome (10,080 probes) according to genomic alignment information available at the University of California at Santa Cruz (UCSC) Genome Browser Database (<http://genome.ucsc.edu/>, April 2003 freeze) were selected. Any filters were applied to the aCGH data sets. However, given the high density of spots per chromosome on the aCGH, visual interpretation of known genomic lesions in plots of raw data was obscured by even a small percentage of outlier probes. Therefore, we computed LOWESS smoothing lines in the data with an “f” span equal to 0.2 [39]. These parameters were determined by comparisons between mCGH and aCGH results obtained in the laboratory. To identify statistically significant transitions in copy number, we defined the variation of copy number as  $\log_2 \pm 2$  standard deviations of the middle 50% quantile of data. Also, we used a developed statistical segmentation algorithm termed circular binary segmentation (CBS), which parses the probe ratio data into segments of similar mean after taking variance into account. The algorithm works by analyzing one chromosome at a time and, within that chromosome, recursively identifying the best possible segmentation. Each proposed split is accepted or rejected based on the probability that the difference in mean could have arisen by chance. This probability is determined using a randomization method [40].

#### *Gene expression microarrays*

For gene expression profiling, GeneChip Human Genome U133 plus 2 oligonucleotide microarray (Affymetrix; Santa Clara, CA) was used, which contained 47,000 probe sets. Target cDNA preparations from total RNA, hybridization on the microarray, washing and staining with the antibody amplification procedure, and scanning were all carried out according to the manufacturer’s instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). Arrays were scanned using an Affymetrix GeneChip Scanner 3000

and analyzed with Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0). Detection values (present, marginal or absent) were determined by default parameters, and signal values were scaled by global methods to a target value of 100. Minimal quality control parameters for inclusion in the study included present calls greater than 30% and a GAPDH 3'/5' ratio < 3. To process and normalize U133plus2 Affymetrix chips, RMA (Robust Multichip Averaging) algorithm were used [41]. Differentially expressed genes between MSS and MSI were detected computing the B statistic [42]. All of these computations were performed using the Bioconductor package [43].

## RESULTS

### *Metaphase CGH*

Metaphase CGH (mCGH) analysis was performed for 28 colorectal tumors (15 MSS and 13 MSI) and two cell lines (HCT116 and SW480). The chromosomal imbalances are represented in Figure 1. The mean of chromosomal imbalances for MSS tumors ( $13 \pm 8.46$ ) was higher than the mean for MSI tumors ( $9 \pm 4.58$ ). Nevertheless, these differences were not statistically significant ( $0.05 < P < 0.1$ , Mann-Whitney *U* test). Only one primary tumor belonging to the MSI group did not show any chromosomal imbalance. Interestingly, three tumors included in the MSS group displayed less than 25% ( $\leq 4$ ) chromosomal imbalances according to the mean, and they were not scored in the mean. The imbalances of separate chromosomal arms are represented in Figure 2. The most frequent chromosome gains in MSS tumors were 20q (69%) ( $IC_{95}=93.7-43.7$ ), 19 (63%) ( $IC_{95}=81.2-40.6$ ), 16p (56%) ( $IC_{95}=81.2-31.2$ ), 9q (50%), 16q (50%) ( $IC_{95}=75-25$ ), 8q (44%), 17q (44%) (both  $IC_{95}=81.2-18.7$ ), 12q (38%), 20p (38%) (both  $IC_{95}=65.6-15.6$ ), 1 (31%), 7q (31%), 13q (31%), and 17p (31%) (all  $IC_{95}=53.1-6.25$ ). The most frequent chromosome losses were 18q (63%), 4q (63%) (both  $IC_{95}=81.2-$

40.6), 15q (44%) ( $IC_{95}=81.2-18.7$ ), 4p (38%), 5q (38%), 8p (38%) (all  $IC_{95}=65.6-15.6$ ), 14q (31%), and Xq (31%) (both  $IC_{95}=53.1-6.25$ ). Specific aneuploidies in MSS tumors were -4, -18q, and +20q (all  $P<0.05$ ,  $\chi^2$  test), whereas the most frequent chromosome gains in MSI tumors were 12q (57%), 17q (57%), 9q (57%) (all  $IC_{95}=93.3-16.6$ ), 1p (50%), 16q (50%), 19 (50%), 22q (50%) (all  $IC_{95}=86.6-13.3$ ), 8q (36%), 16p (36%), and 20q (36%) (all  $IC_{95}=60-10$ ). Chromosome losses in MSI tumors were very infrequent. Only chromosomes 5q, 2q, and 4q (all 29%) (all  $IC_{95}=53.3-6.6$ ) were lost. Minimal common altered regions were defined as overlapped regions for gains or losses detected in at least four primary tumors. In general, we found 10 minimal regions in MSI and 17 regions in MSS tumors. Gains at 1p35pter, 8q24, 9q34, 11q13, 12q24.3, 16q24.3, 17q21, and 17q25, and losses at 5q21 were common findings in both types of tumors. MSS tumors showed statistically significant, specific losses at 1p22 and 4q26 (all  $P<0.05$ ,  $\chi^2$  test), whereas 6q22q24, 8p23, 14q11q24, and 15q21 showed a tendency to be lost (all  $0.05<P<0.1$ ,  $\chi^2$  test). Minimal chromosome gains in MSS tumors appeared at 13q11q14, 13q34 (both  $0.05<P<0.1$ ,  $\chi^2$  test). Minimal chromosome changes specifically found in MSI tumors were the gain at 22q13.3. This difference was statistically significant ( $P<0.05$ ,  $\chi^2$  test).

#### *Array CGH*

Array CGH was performed on ten samples (4 MSS and 6 MSI), nine of which were analyzed by mCGH. The reliability of the analysis was evaluated by comparing the results obtained the two cell lines, HCT116 and SW480. A total of 83% of losses and 71% of gains detected by mCGH were also detected by aCGH. In addition, multiple alterations not detected using mCGH were identified by microarray-based method (Table 2) (Figure 3A-D). In the SW480 cell line, genes residing within chromosomal regions apparently gained by mCGH, and showing a copy number ratio greater than 1.5-

fold were located at 5q35.3 (*STK10*), 7q33-q35 (*RhoGEF5*), 8q24.2 (*C-MYC*), 11q13.3 (*CCND1* and *VEGFB*), 12p12.1 (*SIAT8A*), and 12q14 (*RAP1B*). HCT116 showed 8q24.2 (*C-MYC*), 11q13.3 (*CCND1*), and 16q24.3 (*CDK10*) as gains. Although the HTC-116 cell line is derived from a familial cancer, it is widely used in modeling sporadic MSI cancers (MSI archetype).

The results of the tumor sample mCGH profiles corresponded well with the array results (Table 3). In general, the coincidence of array and metaphase CGH was approximately 60% (Figure 3E-F). Two out of four MSS samples did not display any genetic alteration detected by aCGH. In only one MSS sample *CMYC* amplification was detected. The loss of chromosome 17p was found in one MSS sample. Target genes to be lost were *XIAP associated factor-1*, *PRPSAP2*, *TP53*, *CD68*, and *ALOXE3*. In MSI samples, aCGH an amplification peak at 1q31.3 was found, involving *PLA2GA4*, *TAF1A*, *ACTN2*, and *CR2* genes. A loss at 2p16p21 was detected in sample # 274T with the corresponding genes *CYP11B1*, *SLC8A1*, and *GPR75*. Deletions at 15q21q22 involved *TRPM7*, *RAB11A*, and *MAP2K5*. A gained region at 17q25 involved *PC2*, *MAFG*, *USP14*, *COLEC12*, and *VYES1*. Metaphase CGH was not performed on sample #123T because lack of material, but aCGH showed a gain of chromosome 20, involving *PDYN*, *GAL3ST1*, *PROCR*, *SRC*, and *PPP1R16B*. Four cases, including one MSS and three MSI, showed the loss of 5q13.3q21, a chromosomal region found also by mCGH in 35% of samples. *CCNH*, *FER*, and *RASA1* genes were the most frequently involved in this region according to our aCGH results.

#### *Differentially expressed genes*

The gene expression experiments were performed on six samples (3 MSS and 3 MSI) of which four were used in mCGH analysis. More than one hundred genes appeared to be differentially expressed when comparing three MSS to three MSI

tumors. Clustering analysis allowed us to describe a total of 28 genes that were specifically over or under-expressed in MSS or MSI samples (Figure 4). The gene ontology database (AmiGO, <http://www.godatabase.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) was used to postulate tentative gene functions. The genomic locations of the over- and underexpressed genes were sought to obtain possible correlation with CGH data, thus to find possible target genes of the amplified and lost regions detected by CGH.

## DISCUSSION

The genomic instability of colorectal cancers is widely accepted. It is unlikely that the DNA copy number alterations observed in colorectal tumors occur non-randomly, but rather they involve particular regions of the genome. In the present study, genome-wide chromosomal imbalances and gene expression profiles in MSS tumors were compared with those in MSI tumors by using mCGH, aCGH and expression microarrays. The present study shows chromosomal differences, putative imbalanced genes and possible target gene identification by expression profiling in two phenotypes of colorectal tumors and cell lines categorized according to their microsatellite stability. The aCGH results were comparable to mCGH, as exemplified with the two cell lines. However, aCGH showed new chromosomal imbalances, especially losses. In addition, most of the regions undetected by aCGH (1p36, 9q34, 11q13, 12q24, 16p, 19 and 22) belonged to chromosomal areas that have been reported as problematic in mCGH, due to the GC-content [44]. In general it is suggested that MSI colorectal tumors show a stable karyotype [1]. Recent aCGH studies performed on MSI tumors showed gains at 20q, 8p, and 8q24.3, and losses at 18q21.1q21.2 [27]. Our aCGH data suggested particular copy number alterations affecting other chromosomes in MSI tumors (Table 3). Most of the MSS colorectal tumors are suggested to show chromosomal instability

mainly characterized by the prevalence of aneuploidy and structural alterations [2,3,45]. Our data showed three MSS tumors with a very low number of chromosomal imbalances, similar to the MSI-CIN- group of colorectal tumors studied by Jones et al. [26]. Nevertheless, we did not detect the loss of chromosome 20p, the only change that the authors found to be significantly over-represented in MSI-CIN- cancers compared with MSI-CIN+ tumors.

In agreement with previous data of mCGH [17,46,47,49], we detected gains of 20q and 8q, and loss of 18q as the most frequent alterations in MSS cancers. Gains of 17q, 20p, 7q and 13q, and losses of 4, 15q, 5q, 8p, and 14q, in order of decreasing frequency, were also detected. Minimal chromosomal imbalances found to be significantly specific to MSS tumors were losses at 1p22 and 4q26. The former has been postulated as a prominent deletion in CRC [51]. The deletion of chromosome 4 has already been shown to be involved in the adenoma to invasive carcinoma progression. [51] and the involvement of 4q26 has also been proven [52]. The regions 6q22q24, 8p23, 14q11q24, and 15q21 showed a tendency to be lost in MSS tumors, while 13q11q14 and 13q34 tended to be gained. The presence of a putative tumor suppressor gene in the distal part of chromosome 8p has been proposed [50,53], and the region 15q21, although infrequently affected in CRC, is suggested to harbor a tumor suppressor gene [54]. Interestingly, several down-regulated genes at 15q21 have been reported, including *THBS1* and *ITA3* [28], and this region has been linked to adenoma-carcinoma progression [50].

The results of the present study show that gains of 17q, 22q, 8q, and 20q, and the losses of 5q, 2q, and 4q occur frequently in MSI CRCs. Previous findings report gains of 4q and 8q, and losses of 9q, 1p, and 11q [48], or genomic stability [49] as the most common features in MSI tumors. However, in the present study only one of the 15 MSI

tumors was genetically stable. A preferential gain of 22q13 was also observed. A previous mCGH report found MSI CRCs chromosomally stable, whereas the non-MSI tumors showed 7, 13 and 20q gained and 17, 18 and 9p lost [49]. In addition, 8p21pter, 15q11q21, 17p12p13 and 18q12q21 losses and 8q23qter, 14q14q31 and 20q13 gains were strongly associated to adenoma-carcinoma progression [50].

Several minimal regions occurring both in MSS and MSI tumors were found, e.g. gains at 8q24, 16q24.3, 17q21, 17q25, and 20q13.2q13.3, and loss of 5q21. The latter region is known to contain the tumor suppressor gene *APC*, which mutations and allelic imbalances are considered the earliest and most prevalent genetic changes in CRC, coinciding with the chromosomal instability pathway [1,55]. In the present study 29% (8/28) of the samples showed loss of 5q21 on mCGH, and 40% (4/10) by aCGH (Figure 1, Table 3). However, as it is well known that allelic imbalance affect more than one single gene, several candidate genes to be involved in the loss of 5q14q21 were identified by aCGH, e.g., *CCNH*, *FER*, and *RASA1*. *FER* is a member of the SRC tyrosine kinase gene family, and it has been associated with the loss of 5q21 in e.g., myeloid leukemia [56] and lung cancer [57]. Moreover, it has been suggested that *Fer* may be a potential target for modulators of malignant cell growth [58]. We detected gains of 8q24 in both MSS and MSI tumors, however, the resolution of mCGH did not allow to delineate the target of amplification, which has been reported to vary according to MSI status [25,27]. Recent findings have also demonstrated alterations in chromosome 8 in MSS and MSI tumors [25]. The gain in chromosome 20q is thought to be an early event occurring in the transition from adenoma-carcinoma progression [17,50] and it has been associated with poor survival in several studies [20,47]. The gain of 20q13.2q13.3 has already been associated with colorectal carcinogenesis and metastatic progression in CRC [50,59-61]. A frequent gain of 16q24.3 was also



frequently gained in our samples, including the HCT116 cell line (Figure 3B). Array-CGH data showed several putative target genes, including *CDK10* and *DPEP1*, which was also found to be over-expressed in MSS samples with a 16q24.3 gain. *DPEP1* has already been suggested as a tumor-specific molecular marker for disseminated colon tumor cells [62]. Gene expression analysis revealed differences between MSS and MSI tumors. *MAGE* and *CTNNB1* were detected over-expressed in MSI tumors. *CTNNB1* (encoding for the activating somatic  $\beta$ -catenin) mutations are common in HNPCC tumors [63]. In recent studies, *MAGE* has been described as a biomarker to detect micrometastasis [64] and it has been significantly associated with the vessel emboli in CRC [65]. However, none of the samples here analyzed, which showed over-expression of *MAGE*, presented metastasis. Further studies will be required to demonstrate the role of those genes that appear to be differentially expressed between MSS and MSI tumors according to our results.

As a conclusion, CRC is a heterogeneous disease with many molecular phenotypes. In the present study we studied both microsatellite stable and unstable phenotypes by their copy number changes. The both phenotypes were shown to have both stable and unstable chromosomal structure, suggesting for multiple mechanisms to be involved in CRC carcinogenesis. Overexpression of *CDK10* and *DPEP1* was found in samples with amplification at the corresponding genomic region (16q24.3), and therefore may be considered as putative target genes. However, more samples are needed for validation studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank laboratory technicians Àngels Niubó and Tiina Wirtanen for their excellent work. JC is a fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona, and belongs to the

research program EPICUR-Red. GA has a contract of re-incorporation of doctors from the Generalitat de Catalunya. This work has been supported by EPICUR-Red (FIS G03/174) from the Spanish Government, and the Generalitat de Catalunya (CIRIT 2001SGR-00201).

## REFERENCES

1. Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-9.
2. Ribas, M., Masramon, L., Aiza, G., Capellà, G., Miró, R. and Peinado, M.A. (2003) The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J*, 17, 289-91.
3. Camps, J., Ponsa, I., Ribas, M., Prat, E., Egozcue, J., Peinado, M.A. and Miró, R. (2005) Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J*.
4. Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M. (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558-61.
5. Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. and et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260, 812-6.
6. Tang, R., Changchien, C.R., Wu, M.C., Fan, C.W., Liu, K.W., Chen, J.S., Chien, H.T. and Hsieh, L.L. (2004) Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability--an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 25, 841-6.

7. Goel, A., Arnold, C.N., Niedzwiecki, D., Chang, D.K., Ricciardiello, L., Carethers, J.M., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnolli, M.M. and Boland, C.R. (2003) Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*, 63, 1608-14.
8. Abdel-Rahman, W.M., Katsura, K., Rens, W., Gorman, P.A., Sheer, D., Bicknell, D., Bodmer, W.F., Arends, M.J., Wyllie, A.H. and Edwards, P.A. (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2538-43.
9. Camps, J., Morales, C., Prat, E., Ribas, M., Capellà, G., Egozcue, J., Peinado, M.A. and Miró, R. (2004) Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer*, 110, 869-74.
10. Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. (1993) The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75, 1027-38.
11. Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A. and et al. (1994) Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368, 258-61.
12. Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
13. Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392, 300-3.

14. Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Mehes, K., Nash, R., Robin, N., Shannon, N., Tolmie, J., Swansbury, J., Irrthum, A., Douglas, J. and Rahman, N. (2004) Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet*, 36, 1159-61.
15. Bardi, G., Sukhikh, T., Pandis, N., Fenger, C., Kronborg, O. and Heim, S. (1995) Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 12, 97-109.
16. Muleris, M., Dutrillaux, A.M., Olschwang, S., Salmon, R.J. and Dutrillaux, B. (1995) Predominance of normal karyotype in colorectal tumors from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 14, 223-6.
17. Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schrock, E., Heselmeyer, K., du Manoir, S. and Auer, G. (1996) Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 15, 234-45.
18. Meijer, G.A., Hermsen, M.A., Baak, J.P., van Diest, P.J., Meuwissen, S.G., Belien, J.A., Hoovers, J.M., Joenje, H., Snijders, P.J. and Walboomers, J.M. (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol*, 51, 901-9.
19. Al-Mulla, F., Keith, W.N., Pickford, I.R., Going, J.J. and Birnie, G.D. (1999) Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer*, 24, 306-14.
20. Aragane, H., Sakakura, C., Nakanishi, M., Yasuoka, R., Fujita, Y., Taniguchi, H., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Abe, T., Inazawa, J. and Yamagishi, H.

- (2001) Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer*, 94, 623-9.
21. Knuutila, S., Autio, K. and Aalto, Y. (2000) Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol*, 157, 689.
  22. Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W. and Albertson, D.G. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20, 207-11.
  23. Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D. and Brown, P.O. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23, 41-6.
  24. Albertson, D.G. and Pinkel, D. (2003) Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 2, R145-52.
  25. Nakao, K., Mehta, K.R., Fridlyand, J., Moore, D.H., Jain, A.N., Lafuente, A., Wiencke, J.W., Terdiman, J.P. and Waldman, F.M. (2004) High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis*, 25, 1345-57.
  26. Jones, A.M., Douglas, E.J., Halford, S.E., Fiegler, H., Gorman, P.A., Roylance, R.R., Carter, N.P. and Tomlinson, I.P. (2005) Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene*, 24, 118-29.
  27. Douglas, E.J., Fiegler, H., Rowan, A., Halford, S., Bicknell, D.C., Bodmer, W., Tomlinson, I.P. and Carter, N.P. (2004) Array comparative genomic

- hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4817-25.
28. Birkenkamp-Demtroder, K., Christensen, L.L., Olesen, S.H., Frederiksen, C.M., Laiho, P., Aaltonen, L.A., Laurberg, S., Sorensen, F.B., Hagemann, R. and TF, O.R. (2002) Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res*, 62, 4352-63.
  29. Dunican, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A. and Croke, D.T. (2002) Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene*, 21, 3253-7.
  30. Masramon, L., Ribas, M., Cifuentes, P., Arribas, R., García, F., Egozcue, J., Peinado, M.A. and Miró, R. (2000) Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridization, and whole chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet*, 121, 17-21.
  31. Camps, J., Mrasek, K., Prat, E., Weise, A., Starke, H., Egozcue, J., Miró, R. and Liehr, T. (2004) Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol Rep*, 11, 1215-8.
  32. González-García, I., Moreno, V., Navarro, M., Martí-Ragué, J., Marcuello, E., Benasco, C., Campos, O., Capellà, G. and Peinado, M.A. (2000) Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 92, 544-9.
  33. Vasen, H.F.A., Watson, P., Mecklin, J.-P. and Lynch, H.T. (1999) New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116, 1453-1456.

34. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F. and Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258, 818-21.
35. Prat, E., Bernues, M., Caballín, M.R., Egozcue, J., Gelabert, A. and Miró, R. (2001) Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urology*, 57, 986-92.
36. Hyman, E., Kauraniemi, P., Hautaniemi, S., Wolf, M., Mousses, S., Rozenblum, E., Ringner, M., Sauter, G., Monni, O., Elkahloun, A., Kallioniemi, O.P. and Kallioniemi, A. (2002) Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res*, 62, 6240-5.
37. Monni, O., Barlund, M., Mousses, S., Kononen, J., Sauter, G., Heiskanen, M., Paavola, P., Avela, K., Chen, Y., Bittner, M.L. and Kallioniemi, A. (2001) Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5711-6.
38. Atiye, J., Wolf, M., Kaur, S., Monni, O., Bohling, T., Kivioja, A., Tas, E., Serra, M., Tarkkanen, M. and Knuutila, S. (2005) Gene amplifications in osteosarcoma-CGH microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer*, 42, 158-63.
39. Cleveland, W.S. (1979) Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Amer Statist Assoc*, 74, 829-836.
40. Olshen, A.B. and Venkatraman, E.S. (2002) Change-point analysis of array-based comparative genomic hybridization data. *American Statistical Association Proceedings of the Joint Statistical Meetings*, 2530-2535.

41. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 249-64.
42. Lonnstedt, I. and Speed, T.P. (2002) Replicated microarray data. *Statistica Sinica*, 12, 31-46.
43. Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. and Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5, R80.
44. el-Rifai, W., Larramendy, M.L., Bjorkqvist, A.M., Hemmer, S. and Knuutila, S. (1997) Optimization of comparative genomic hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides. *Lab Invest*, 77, 699-700.
45. Roschke, A.V., Stover, K., Tonon, G., Schaffer, A.A. and Kirsch, I.R. (2002) Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia*, 4, 19-31.
46. Korn, W.M., Yasutake, T., Kuo, W.L., Warren, R.S., Collins, C., Tomita, M., Gray, J. and Waldman, F.M. (1999) Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 25, 82-90.
47. Angelis, P.M.D., Stokke, T., Beigi, M., Mjåland, O. and Clausen, O.P.F. (2001) Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by



- comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*, 16, 38-45.
48. Li, L.S., Kim, N.G., Kim, S.H., Park, C., Kim, H., Kang, H.J., Koh, K.H., Kim, S.N., Kim, W.H. and Kim, N.K. (2003) Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol*, 163, 1429-36.
  49. Schlegel, J., Stumm, G., Scherthan, H., Bocker, T., Zirngibl, H., Ruschoff, J. and Hofstadter, F. (1995) Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replicating error. *Cancer Res*, 55, 6002-6005.
  50. Hermsen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciutto, A., Roemen, G., Arends, J.W., Williams, R., Giaretti, W., De Goeij, A. and Meijer, G. (2002) Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology*, 123, 1109-19.
  51. Knosel, T., Schluns, K., Stein, U., Schwabe, H., Schlag, P.M., Dietel, M. and Petersen, I. (2004) Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia*, 6, 23-8.
  52. Arribas, R., Risques, R.A., González-García, I., Masramon, L., Aiza, G., Ribas, M., Capellà, G. and Peinado, M.A. (1999) Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest*, 79, 111-22.
  53. Flanagan, J.M., Healey, S., Young, J., Whitehall, V., Trott, D.A., Newbold, R.F. and Chenevix-Trench, G. (2004) Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Genes Chromosomes Cancer*, 40, 247-60.
  54. Park, W.S., Park, J.Y., Oh, R.R., Yoo, N.J., Lee, S.H., Shin, M.S., Lee, H.K., Han, S., Yoon, S.K., Kim, S.Y., Choi, C., Kim, P.J., Oh, S.T. and Lee, J.Y.

- (2000) A distinct tumor suppressor gene locus on chromosome 15q21.1 in sporadic form of colorectal cancer. *Cancer Res*, 60, 70-3.
55. Shih, I.M., Zhou, W., Goodman, S.N., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 61, 818-22.
56. Morris, C., Heisterkamp, N., Hao, Q.L., Testa, J.R. and Groffen, J. (1990) The human tyrosine kinase gene (FER) maps to chromosome 5 and is deleted in myeloid leukemias with a del(5q). *Cytogenet Cell Genet*, 53, 196-200.
57. Ueno, K., Kumagai, T., Kijima, T., Kishimoto, T. and Hosoe, S. (1998) Cloning and tissue expression of cDNAs from chromosome 5q21-22 which is frequently deleted in advanced lung cancer. *Hum Genet*, 102, 63-8.
58. Orlovsky, K., Theodor, L., Malovani, H., Chowers, Y. and Nir, U. (2002) Gamma interferon down-regulates Fer and induces its association with inactive Stat3 in colon carcinoma cells. *Oncogene*, 21, 4997-5001.
59. Hidaka, S., Yasutake, T., Takeshita, H., Kondo, M., Tsuji, T., Nanashima, A., Sawai, T., Yamaguchi, H., Nakagoe, T., Ayabe, H. and Tagawa, Y. (2000) Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. *Clin Cancer Res*, 6, 2712-7.
60. Laiho, P., Hienonen, T., Karhu, A., Lipton, L., Aalto, Y., Thomas, H.J., Birkenkamp-Demtroder, K., Hodgson, S., Salovaara, R., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Knuutila, S., Halford, S., Orntoft, T.F., Tomlinson, I., Launonen, V., Houlston, R. and Aaltonen, L.A. (2003) Genome-wide allelotyping of 104 Finnish colorectal cancers reveals an excess of allelic imbalance in chromosome 20q in familial cases. *Oncogene*, 22, 2206-14.

61. Rooney, P.H., Boonsong, A., McFadyen, M.C., McLeod, H.L., Cassidy, J., Curran, S. and Murray, G.I. (2004) The candidate oncogene ZNF217 is frequently amplified in colon cancer. *J Pathol*, 204, 282-8.
62. McIver, C.M., Lloyd, J.M., Hewett, P.J. and Hardingham, J.E. (2004) Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 209, 67-74.
63. Miyaki, M., Iijima, T., Kimura, J., Yasuno, M., Mori, T., Hayashi, Y., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T. and Kuroki, T. (1999) Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*, 59, 4506-9.
64. Kufer, P., Zippelius, A., Lutterbuse, R., Mecklenburg, I., Enzmann, T., Montag, A., Weckermann, D., Passlick, B., Prang, N., Reichardt, P., Dugas, M., Kollermann, M.W., Pantel, K. and Riethmuller, G. (2002) Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res*, 62, 251-61.
65. Li, M., Yuan, Y.H., Han, Y., Liu, Y.X., Yan, L., Wang, Y. and Gu, J. (2005) Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res*, 11, 1809-14.

Table 1. Tumor collective.

Tumor specimens		31
Sex	Male	16
	Female	15
Age	<50 years	5
	50-70 years	18
	>70 years	8
Dukes stage <sup>1</sup>	A	1
	B	14
	C	10
	D	5
MSI	-	16
	+	15

<sup>1</sup>Dukes' stage was not determined in one case.

Table 2. Genomic alterations detected in human CRC cell lines by mCGH and aCGH.

Cell Line	HCT116				SW480			
	Gains and amplifications		Losses		Gains and amplifications		Losses	
	mCGH	aCGH	mCGH	aCGH	mCGH	aCGH	mCGH	aCGH
1	1pterp33	-	-	1p31p13.2			1p31.3qter	1p33p13.1
	1q22	1q22	-	1q31.1q31.2			-	1q31.1q41
							-	1q43
2			-	2q24.3q32.2	2pterq33	-	2q37	2q37.1
3	-	3p21.1	3p12	-	3p21p14.1	-	3p26	3pterp24.3
					3q13.3qter	3q25.32	-	3q11.2q13.13
					-	3q29		
4			4q12q21.1	4q13.1			4	4
			4q35	4q35.1				
5	-	5q35.1			5pterp15.2	-	5p13.3q14	5p14.1q14.1
					5q23.3qter	5q35.3		

6	-	6p23					6p12qter	6
	-	6p21.31						
7	-	7q22.1			7	7		
	-	7q35			<b>7pterq22</b>	-		
8	8q21.1qter	8q24.2qter			<b>8q24</b>	<b>8q24.2</b>	8pterp22	8pterp21.3
							8q11q23	8q13.3q23.1
9	9q34	-	-	9q21.2	9p21qter	9p13.3	9pterp21	9pterp21.1
					-	9q34.2		
10	10q24qter	10q24.2q26.3					10	10 (10p12.1)
11	11q13.3	11q13.1q13.3			11	11q12.3q13.3	-	11q14.3
12			-	12p13.2	12pterq14	12pterq13.2	12q15qter	-
			-	12q22				
13			13q22	-	13	13q12.2		
14					14q23qter	14q24.3qter	14q12	14q12q22.3
15	15q22.3	-	-	15q13.3q21.3			15	15q21.3

16	16p13.2p11	-					
	16q22qter	16q24.3					
17	17q	17q21.3qter		17	17	-	17q22
18				18p	-	18q	18q
19	19	19q13.32q13.33		19q	19q13.12qter		
20	20q	-		<b>20</b>	<b>20p11.3qter</b>		
21	21q22.3	-		21q	-		
22	22q	22q12.3				-	22q11.1q11.2

Amplifications are indicated in bold-face.

Table 3. Clinical data and copy number changes of ten samples analyzed by metaphase and array-based CGH.

Patients			DNA copy number changes by mCGH		DNA copy number changes by aCGH	
case	MSI status	DUKE'S stage	Gains	Losses	Gains	Losses
50T	-	D	1q31, 7p12, 17q25, 19, 20	3p12, 5q21q23.3	1q31, 7p21.3p21.2, 19p13.2p13.3, 19q13.42, 20	1p31, 2q13q14, 2q33.2, 3p12, 4q12q13, 5q15q23.1, 10q21.1, 15q14, 15q26.2
53T	-	C	8q, 12q21.3qter, 20q	1q21, 6q, 7q11, 8p, 17p, 18, 20p	8q, 12q12.2q21.2, 12q23.2qter, 16p13.3, 20q	6p12.1q23, 7cenq11.23, 8p, 17p11.2p13.1, 18p11.3q11.2, 18q21.1, 18q21.3qter, 20p
62T	-	C	11q13.3q13.4, 12q23qter	15q11q12	12	-
135T	-	B	-	9p21	-	-
87T	+	D	8q24.3, 16q24.3, 17q25, 20q13.3	15q15q22	4q25q28, 6q16.3q21, 8q12q13, 16q23.3q24.1, 17q25.3, 18p11.2, 19q13.4,	15q21q22.2



123T	+	C	N.D.	N.D.	20q13.33 13q12, 20	1p22p36, 1q, 4, 5q14q21, 9p23, 9q32q33, 10q12q21
167T	+	C	3q29, 13q12.2qter, 14q21q24.1, 20	2p23pter, 2q37, 9p12p13	3q28q29, 13q11q34, 14q21.3q32.1, 20	1q41, 2q12qter, 2p23pter, 4, 15q21.3
259T	+	B	1q42qter, 2q36, 3p21, 11q13, 12q24.3, 17, 19, 22q13	16p12.1q22	3p21.1p21.2, 12q24.21q24.31	16p12.2q12
274T	+	B	1q, 16q24, 17q25, 18q22qter, 22q13.3	2p16p21	1q (peak at 1q31.3), 3q25.3q26.1, 18q22qter	2p22.1p16, 2q32.2, 5q21
280T	+	B	1q32qter, 4p16, 8p22p23, 8q24.3, 12q23qter, 17, 19q, 20	2q23q33, 6q, 13q21q31, 14q13q21.1, 18q	1q42, 12q24.33	2p14, 3p14.2, 5q15q21.3, 6q22, 13q22.2q31.3, 14q13q21, 18q

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Idiogram showing the summary of copy number changes detected by mCGH in 28 colorectal carcinomas according to their microsatellite status, and two colorectal cancer cell lines, HCT116 and SW480. MSI and MSS profiles are indicated in dark green and dark blue, respectively. HCT116 and SW480 profiles are indicated in yellow and light blue, respectively.

**Fig. 2.** Overall frequencies of chromosomal gains and losses detected by mCGH according to the chromosome arm in microsatellite stable (A) and microsatellite unstable (B) tumors. Dotted bars indicate gains and black bars indicate losses.

**Fig. 3.** Integration of mCGH (orange circles) and aCGH (blue line and red bar) profiles in the same plot. Blue line was obtained by computing LOWESS smoothing lines in the data with an “f” span equal to 0.2. Red bar was obtained according to a developed statistical segmentation algorithm termed circular binary segmentation (CBS). (A-B) Gain of 10q24q26.3 and amplification of chromosomal region 16q24.3 detected in the HCT116 human CRC cell line. (C-D) Gains of 7pterq22 and 14q24.3qter, respectively, in the SW480 human CRC cell line. (E-F) Coincidence of mCGH and aCGH profiles along the chromosome 8 and 20 in the primary tumors #53T and #167T, respectively.

**Fig. 4.** Gene expression clustering analysis. “Rows” are individual genes and “Columns” are colorectal samples according to their microsatellite status.

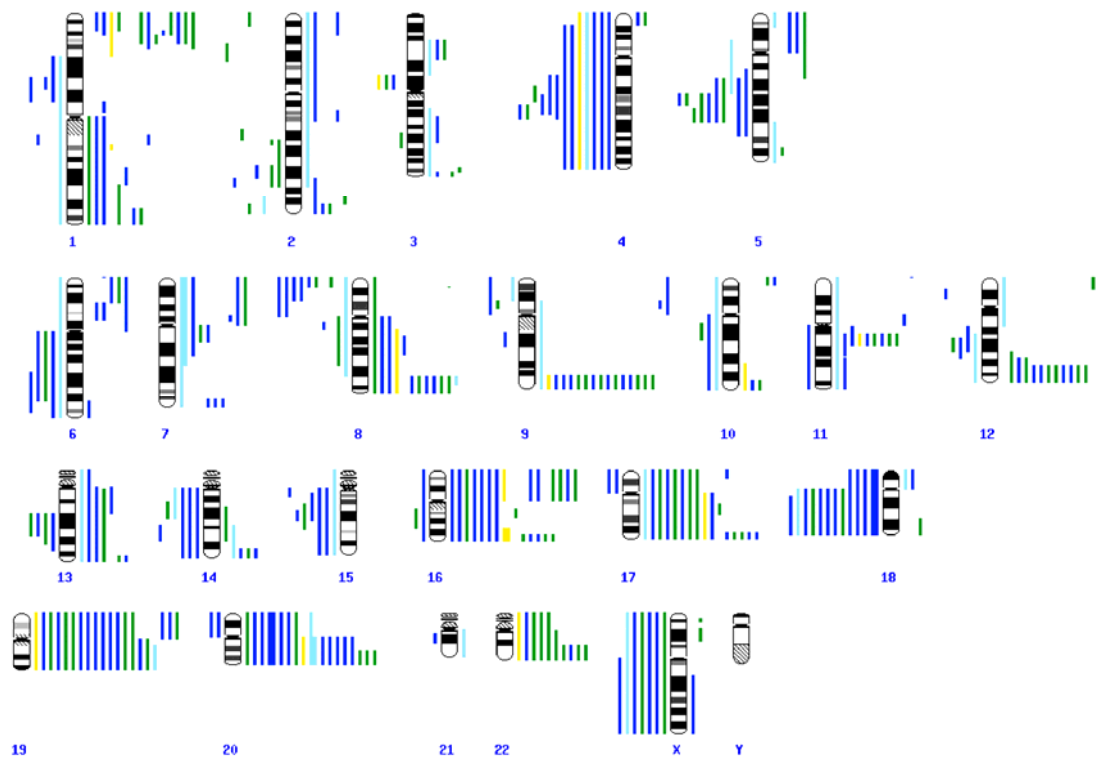
**Figure 1**

Figure 2

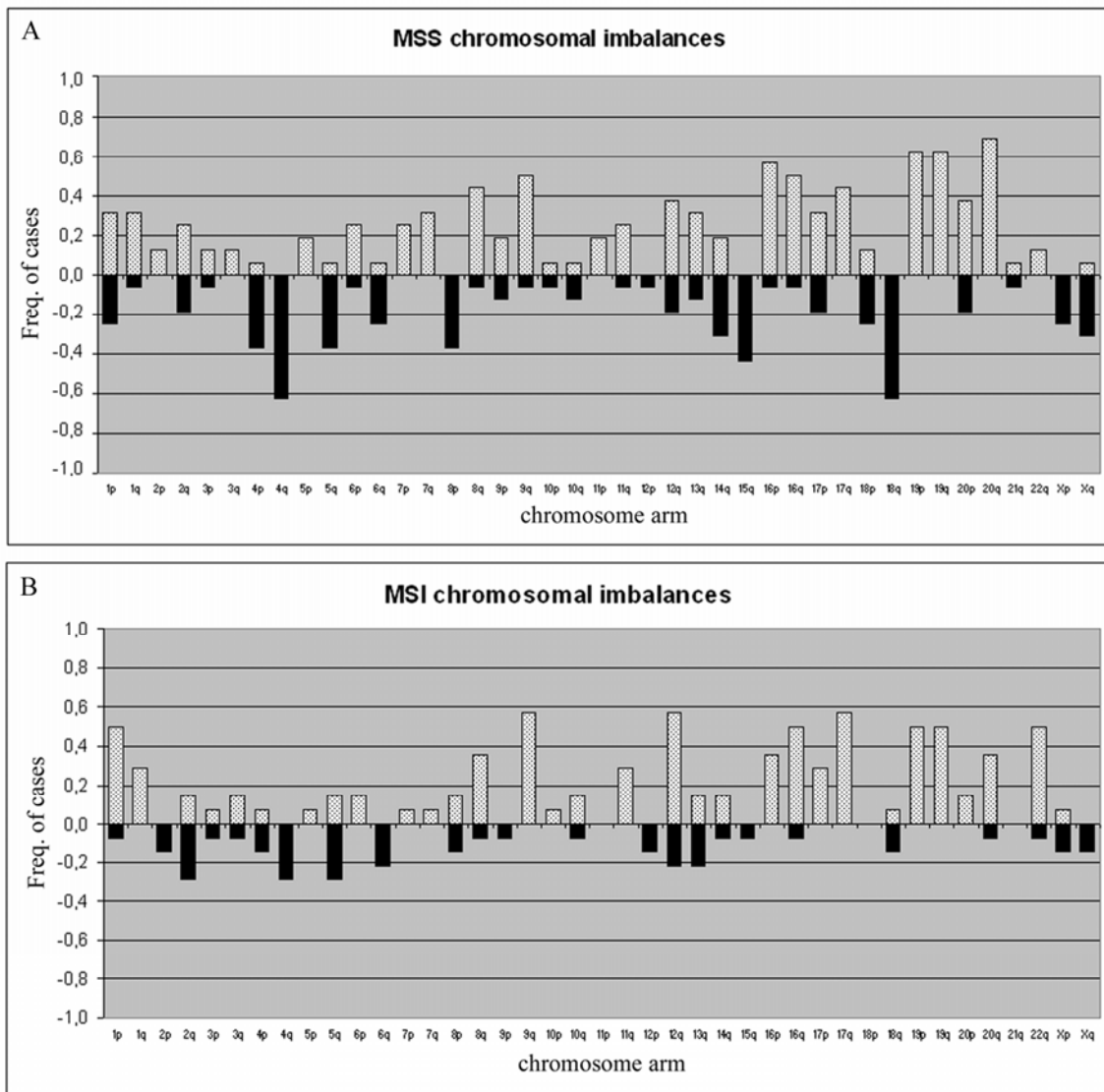


Figure 3

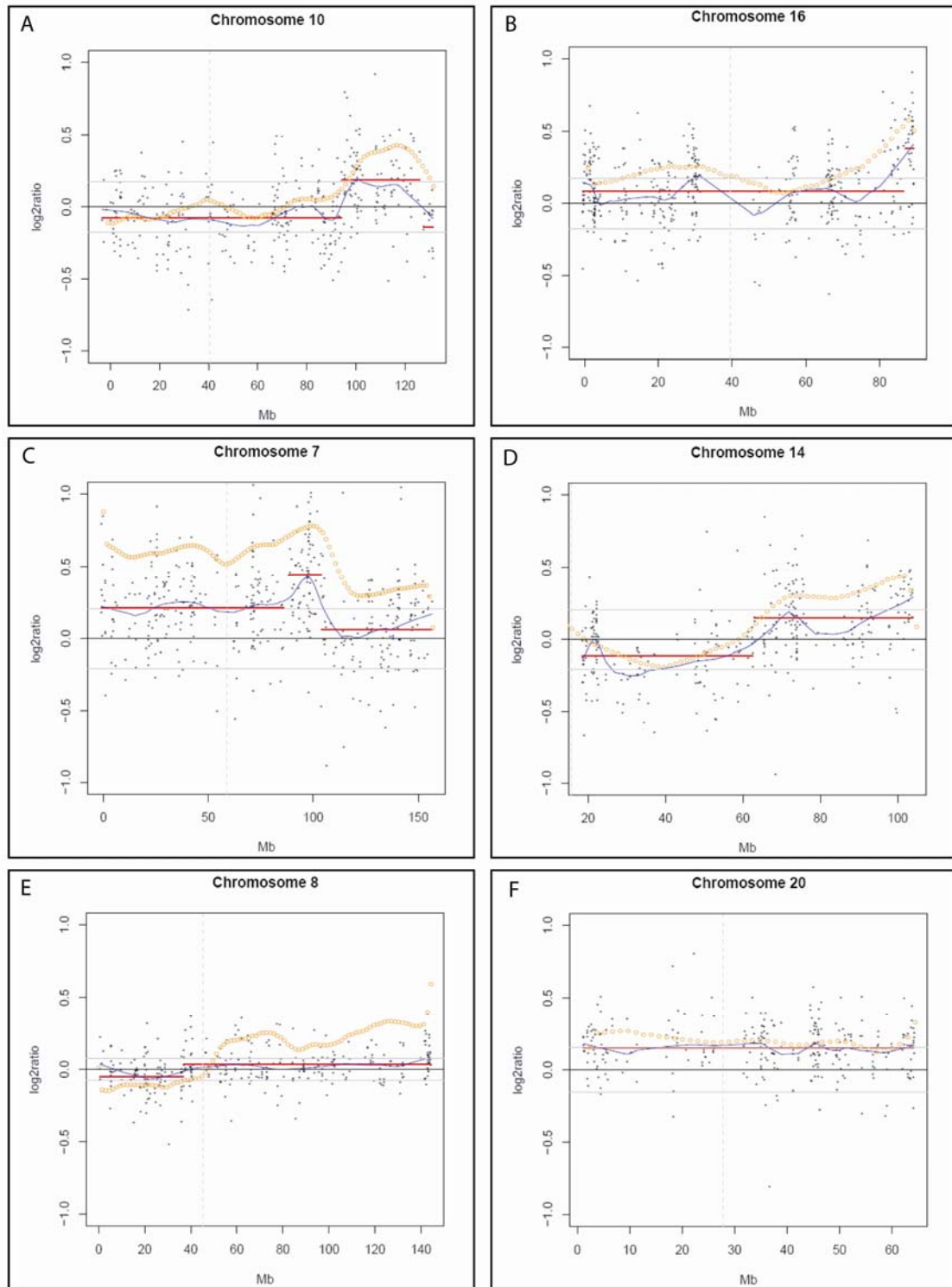
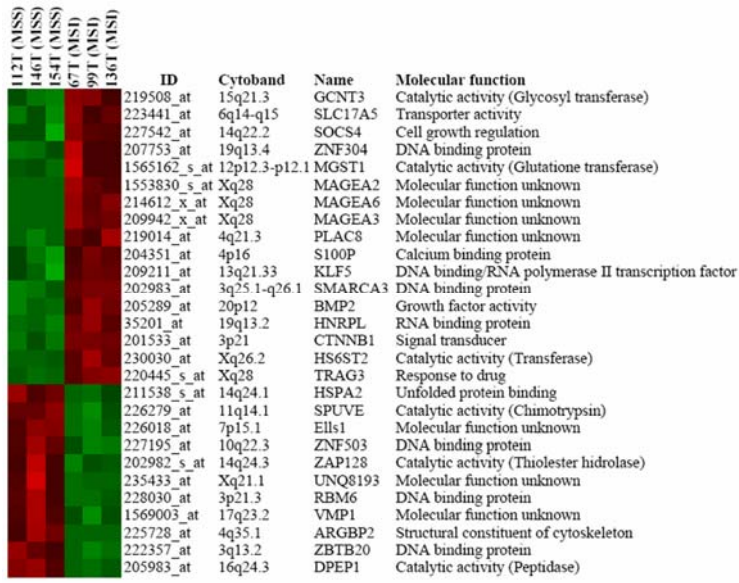


Figure 4



## ***5. DISCUSSIÓ***

<< Si un hombre nunca se contradice,  
será porque nunca dice nada.>>

(Miguel de Unamuno)

## 5.1. DISSENY EXPERIMENTAL, TECNOLOGIA EMPRADA I PROCEDIMENTS

### 5.1.1. MATERIAL DE TREBALL: LÍNIES CEL·LULARS I TUMORS PRIMARIS

El material amb què hem basat bona part del treball experimental han estat línies cel·lulars humanes de càncer de còlon. En termes generals, i de manera equivalent als tumors primaris de còlon, les línies cel·lulars s'han separat segons si presenten o no inestabilitat de microsatèl·lits (Lengauer *et al.*, 1997). La major part de les línies estudiades han estat prèviament caracteritzades per altres grups d'investigació utilitzant tècniques de citogenètica molecular molt semblants a les aquí exposades (Abdel-Rahman *et al.*, 2001). La utilització específica de les línies cel·lulars HCT-116 i SW480 en el Treball III va venir donada pel fet que ambdues línies cel·lulars han estat utilitzades com a arquetipus de la inestabilitat de microsatèl·lits (HCT-116) i de la inestabilitat cromosòmica (SW480). Aquestes dues línies cel·lulars conformen actualment la base d'una elevada quantitat d'estudis, tant bàsics com translacionals, en la investigació contra el càncer, ja sigui en l'estudi dels mecanismes oncogenòmics moleculars, estudis dels perfils d'expressió gènica, de desenvolupament de fàrmacs anticarcinogènics i un llarg etcètera. A la literatura existeixen més d'un miler d'estudis que utilitzen alguna d'aquestes línies cel·lulars com a models cel·lulars. És per això, que la comunitat científica requereix de la completa caracterització del cariotip molecular d'aquestes línies cel·lulars i del coneixement del seu comportament citogenètic. Aquesta elevada especialització ens va conduir a endinsar-nos en l'estudi dels patrons d'inestabilitat genòmica, la qual cosa pot ajudar a interpretar els resultats d'estudis posteriors.

La relació entre les línies cel·lulars i els tumors primaris és una relació "d'amor-odi". Per una banda, les cèl·lules de qualsevol tumor primari, i particularment les dels tumors de còlon, presenten una elevada dificultat alhora de ser cultivades *in vitro*, però, per altra banda, l'estudi de les línies cel·lulars és extremadament generós (tal i com s'ha comentat en el paràgraf anterior). Arribar a un equilibri és sempre difícil. Al capdavall, el que condiona el material amb què volem treballar és l'assaig que es dissenya per comprovar una hipòtesi. Una gran part dels estudis citogenètics de tumors sòlids es basa en l'ús de línies cel·lulars, sobretot per la dificultat d'obtenir cromosomes metafàsics a partir de tumors primaris. El cariotip, tant clàssic com molecular, representa una eina excel·lent per visualitzar el genoma d'una cèl·lula. Allò que és realment fascinant és relacionar la informació obtinguda en l'estudi de les línies cel·lulars amb la "vida real", o sigui, el tumor. És per això que en la part final del procés experimental d'aquesta tesi doctoral, ens vam plantejar l'estudi genòmic i transcriptòmic d'un grup de tumors sòlids de còlon amb tècniques que no requerissin



l'obtenció de cromosomes metafàsics. Aquestes tècniques comprenen la CGH convencional i en microxips, i els microxips d'expressió. Idealment, la plena caracterització d'un tumor hauria de combinar la informació que ens donen aquestes últimes tècniques juntament amb el cariotip molecular.

### 5.1.2. CITOGENÈTICA MOLECULAR

El treball experimental per l'elaboració d'aquesta tesi doctoral ha estat principalment basat en tècniques de citogenètica molecular. La tècnica més utilitzada per descriure les reorganitzacions cromosòmiques ha estat la M-FISH, la qual ha permès la quasi completa caracterització de qualsevol marcador en els cariotips estudiats. Tal i com s'apunta en el Treball I, des de la implantació de les tècniques de pintat cromosòmic pels 24 cromosomes, M-FISH (Speicher *et al.*, 1996) o SKY (Schrock *et al.*, 1996), fins l'actualitat, s'han desenvolupat una sèrie de tècniques que ajuden a completar els cariotips moleculars més complexes. És l'exemple de les tècniques cenM-FISH (Nietzel *et al.*, 2001) i mMCB (Weise *et al.*, 2003). Aquesta bateria de tres tècniques per obtenir la màxima resolució en el cariotip molecular, la vam aplicar per l'estudi de la línia cel·lular SW480, la qual presenta una elevada quantitat d'alteracions, tant numèriques com estructurals, en el seu cariotip.

La complementarietat de les tres tècniques de citogenètica molecular permet la identificació de qualsevol tipus d'alteració, sempre i quan el tamany del segment de cromosoma reorganitzat sigui superior al límit de resolució de les tècniques, que de manera general està al voltant de 5-10 Mb. A més a més, l'ús de la CGH ens ajuda a delimitar els punts de trencament de les alteracions desequilibrades.

La tècnica de FISH multicolor també ens ha permès el seguiment de marcadors citogenètics al llarg de l'evolució de les cèl·lules tumorals que inicialment formaven part del carcinoma primari, i que després van originar metastasi a fetge quan es van inocular en ratolins immunodeprimits. Les línies cel·lulars que componen aquest model de càncer de còlon s'anomenen KM12 (Morikawa *et al.*, 1988). Yeatman i col (1996) van descriure els cariotips de les línies cel·lulars KM12C, KM12L4A i KM12SM mitjançant tècniques de citogenètica clàssica i citometria de fluxe. Tot i les aproximacions per identificar les reorganitzacions cromosòmiques estructurals, es van quedar bastant lluny de la definició que ens va permetre aportar l'aplicació de les tècniques de citogenètica molecular M-FISH i CGH. A més a més, la M-FISH ens va permetre descriure l'evolució cariotípica des del fenotip de les cèl·lules adeno-carcinogèniques i molt poc metastàtiques (KM12C) fins al de les cèl·lules altament metastàtiques a fetge (KM12SM).

### 5.1.3. CÀLCUL DE LES TAXES D'INESTABILITAT CROMOSÒMICA

L'elevada precisió en la definició de les alteracions estructurals ens va servir de base per descriure les alteracions clonals i no clonals que apareixien en les cèl·lules estudiades. Aquesta diferenciació serà clau per quantificar la inestabilitat cromosòmica estructural, la qual l'obtenim a partir del quocient entre el nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals no clonals dividit pel nombre de cèl·lules que hem estudiat (Ribas *et al.*, 2003). Aquesta relació s'anomena taxa màxima d'inestabilitat cromosòmica estructural (*maxr*, de l'anglès *maximum rate*) i assumeix que les alteracions cromosòmiques no clonals han esdevingut prèviament a l'última divisió cel·lular. Segons el criteri del ISCN (1995), una alteració no clonal és aquella que apareix una sola vegada en el conjunt de metafases analitzades en una o més àrees d'anàlisi. Aquest sistema de quantificar la inestabilitat cromosòmica no té en compte la viabilitat de les cèl·lules que presenten les alteracions no clonals, així com el fet que aquestes alteracions es transmetin o no a futures generacions.

Una condició *sine qua non* per definir una taxa és que impliqui temps. Si ens ajustem a aquesta condició, la qualificació de taxa al càlcul de *maxr* seria incorrecta, ja que les alteracions cromosòmiques que comptabilitzem són en un moment puntual de la vida de la cèl·lula, sense saber com aquestes alteracions afectaran a la supervivència cel·lular. Per ser més precisos i rigorosos, potser seria més convenient parlar d'estat enlloc de taxa. De totes maneres, aquesta aproximació també ha estat utilitzada per altres autors per estudiar l'heterogeneïtat genètica intercel·lular en línies cel·lulars de còlon, ovari i de pròstata (Beheshti *et al.*, 2001; Roschke *et al.*, 2002). D'una manera semblant, Gisselsson i col (2001a) van mesurar la variabilitat intratumoral de les alteracions cromosòmiques estructurals a partir del nombre de reorganitzacions que no apareixien en el llinatge cel·lular principal dividit pel nombre de cèl·lules analitzades. En aquest cas, els autors no van tenir en compte si les alteracions apareixien d'una manera clonal o no clonal. La nostra aproximació per comptabilitzar les alteracions cromosòmiques estructurals totals, és a dir, tant les clonals com les no clonals, la vam anomenar *minr* (de l'anglès *minimum rate*) fent referència al nombre d'alteracions cromosòmiques estructurals que apareixien *de novo* dividit pel nombre de cèl·lules analitzades i el nombre de generacions (Ribas *et al.*, 2003). El càlcul de *minr* obliga a conèixer el nombre de generacions que han transcorregut des de l'establiment de la línia cel·lular, de manera que això pot significar un handicap per aquelles línies cel·lulars que han estat originades fa molt de temps. Recentment, s'ha utilitzat una estratègia molt semblant a la proposada pel nostre grup per estudiar la inestabilitat cromosòmica en carcinomes de cèl·lules escamoses orals (Reshmi *et al.*, 2004).

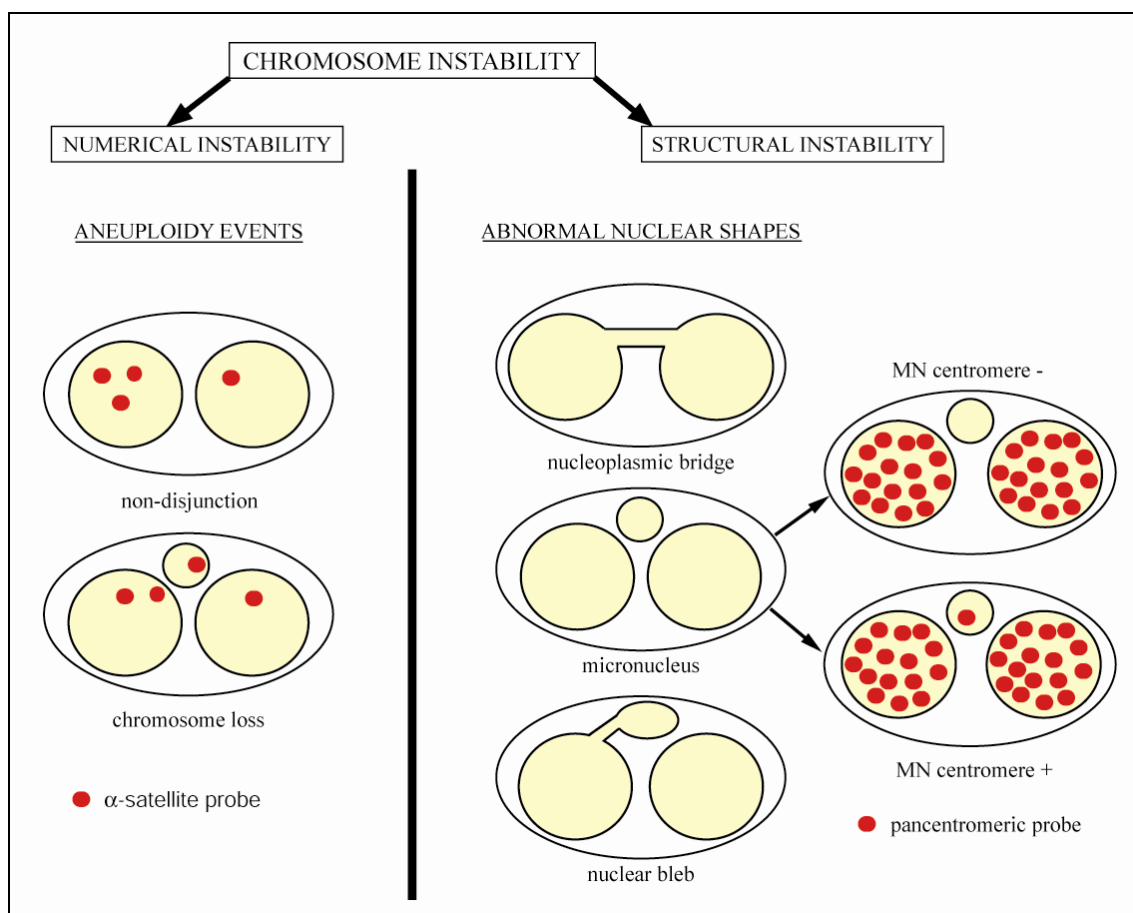
Tal i com s'ha comentat anteriorment, el concepte d'instabilitat no es refereix a un estat, sinó a una taxa que té lloc en un període de temps (Lengauer *et al.*, 1998). Per abordar aquest handicap ens calia conèixer el nombre de divisions cel·lulars transcorregudes des de la primera divisió, i per aconseguir-ho vam utilitzar clons obtinguts a partir d'una única cèl·lula per dilució límit de la línia cel·lular parental SW480, dels quals podíem saber exactament el nombre de divisions cel·lulars. La primera aproximació a la quantificació de la instabilitat numèrica seguint aquesta estratègia la va realitzar Ribas i col. (2003). En aquest treball, els autors van utilitzar tècniques de citogenètica clàssica per caracteritzar els cariotips i obtenir informació de les alteracions clonals i no clonals. Aquesta caracterització es veu esbiaixada per la dificultat en la interpretació i identificació de marcadors citogenètics complexos mitjançant la tècnica de bandes G, la qual cosa podia originar confusions alhora de comptabilitzar les alteracions. Com a conseqüència d'aquesta limitació, nosaltres ens vam proposar utilitzar la tècnica M-FISH per acurar més la caracterització de les alteracions estructurals. La discussió de la quantificació de la instabilitat cromosòmica la veurem en l'apartat 5.3.

#### **5.1.4. ASSAIG DE CÈL·LULES BINUCLEADES**

La instabilitat cromosòmica (CIN) va ser descrita per Lengauer i col. (1997) en línies cel·lulars de càncer de còlon com la variació en el nombre de cromosomes, o sigui el resultat de guanys i pèrdues cromosòmiques, o aneuploidia. Aquest grup va mesurar aquesta instabilitat cromosòmica com la variació en la ploïdia mitjançant la tècnica de FISH en nuclis interfàsics marcant el DNA  $\alpha$ -satèl·lit de determinats cromosomes. Per avaluar la CIN, van analitzar les variacions cromosòmiques *in situ* en colònies cel·lulars d'aproximadament 100 cèl·lules originades a partir d'unes poques cèl·lules crescudes durant 67 generacions. De manera semblant, nosaltres vam originar clons de la línia cel·lular SW480 mitjançant la tècnica de dilució mínima, la qual cosa comporta el creixement d'un clon a partir d'una única cèl·lula.

L'assaig de cèl·lules binucleades mitjançant la inhibició de la citocinesi amb citocalasina B és un assaig clàssicament utilitzat per estudiar els efectes de mutàgens. Nosaltres hem estat els pioners en adaptar aquest anàlisi per l'estudi de la instabilitat cromosòmica en cèl·lules tumorals (Figura 16). L'estratègia d'obtenir un cultiu de cèl·lules binucleades ens va permetre l'estudi de l'origen de les aneuploidies. O sigui, si els guanys i/o pèrdues que visualitzàvem mitjançant la tècnica de FISH en nuclis interfàsics s'originaven per un procés de no-disjunció o degut a una pèrdua anafàsica (aquests resultats es comentaran més endavant). Al mateix temps que l'obtenció de

les cèl·lules binucleades ens va permetre quantificar la inestabilitat cromosòmica numèrica, també ens va permetre observar les estructures anòmales del nucli, la qual cosa vol dir que vàrem poder quantificar el nombre de micronuclis, ponts nucleoplasmàtics i les protuberàncies nuclears. Aquestes estructures, tal i com es discutirà més endavant, són malformacions nuclears que apareixen com a conseqüència d'alteracions cromosòmiques estructurals. L'aplicació de la tècnica de FISH amb una sonda pan-centromèrica ens va permetre detallar les alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals de tot el genoma. La utilització de la tècnica cenM-FISH en aquest anàlisi hauria permès l'estudi dels cromosomes més implicats en pèrdues cromosòmiques i processos de no-disjunció.



**Figura 16.** Resum dels fenòmens que poden ser analitzats mitjançant l'aplicació de FISH sobre cèl·lules binucleades.

### 5.1.5. HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA SOBRE MICROXIPS

La tècnica d'hibridació genòmica comparada convencional la vam utilitzar per caracteritzar els guanys i pèrdues genòmiques de totes i cadascuna de les línies cel·lulars estudiades. A més a més, aquesta tècnica va ser utilitzada per estudiar 28

tumors primaris compresos en diferents estadiatges segons la classificació de Dukes modificada per Astler-Coller. El límit de resolució de la CGH convencional és aproximadament de 10 Mb, la qual cosa no ens permet detallar guanys i pèrdues compresos en menys d'una banda citogenètica. Per aquest motiu, el desenvolupament de la CGH sobre un microxip o micromatriu ha suposat un avenç tecnològic cap a la visualització dels desequilibris gènics de tot el genoma en un únic experiment.

La CGH sobre microxips es va desenvolupar simultàniament per dues plataformes diferents, el microxip construït amb BACs (de l'anglès, *bacterial artificial chromosomes*) (Pinkel *et al.*, 1998) o bé amb seqüències de cDNAs (Pollack *et al.*, 1999). Entre elles es diferencien perquè els BACs poden cobrir tot el genoma, mentre que els cDNAs només cobreixen les zones del genoma que presenten seqüències codificants. A favor dels microxips de cDNAs podem dir que la resolució acostuma a ser més precisa ja que les seqüències que formen els *spots* són de menys de 100 Kb, tot i això, la interpretació de les dades requereix programes bioinformàtics molt especialitzats. Actualment també s'utilitzen plataformes per realitzar la CGH on els *spots* contenen seqüències d'oligonucleòtids. En el nostre estudi vam utilitzar microxips comercials de cDNA (Human 1.0; Agilent Technologies) que contenien aproximadament 13.000 gens (Atiye *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2002; Monni *et al.*, 2001). Una de les grans avantatges de la utilització del microxip de cDNA és que una mateixa plataforma pot ser utilitzada per realitzar la CGH i l'anàlisi d'expressió gènica (Mahlamaki *et al.*, 2004). Tot i aquesta aplicabilitat, en el nostre estudi vam utilitzar els microxips de la casa comercial Affymetrix (GeneChip Human Genome U133 plus 2 oligonucleotide microarray) per valorar els nivells d'expressió gènica d'un grup de tumors primaris de còlon. Actualment, aquesta plataforma és una de les més utilitzades per aquest tipus d'anàlisi, i presenta una fiabilitat molt elevada. A pesar de no utilitzar la mateixa plataforma per a realitzar l'anàlisi genòmic i transcriptòmic ni utilitzar les mateixes mostres, vam trobar regions de coincidència entre el desequilibri genòmic i l'alteració en l'expressió gènica (Camps *et al.*, In revision).

La vulnerabilitat dels resultats de CGH sobre microxips obliga a la seva validació mitjançant altres metodologies. La tècnica de validació més emprada per comprovar els desequilibris genòmics és la FISH, ja sigui aplicada sobre un tall de parafina del tumor estudiat o bé en un microxip de teixits, on poden constar-hi un elevat nombre de mostres, a part de l'analitzada mitjançant la CGH sobre microxips (Kallioniemi *et al.*, 2001; Mousses *et al.*, 2001). En el nostre estudi vam realitzar la CGH convencional per aproximar-nos a la validació dels resultats de la CGH sobre microxips. La combinació de les dues tècniques ens va permetre solapar els perfils genòmics en una mateixa gràfica, la qual cosa ens va ajudar a interpretar els guanys i pèrdues.

La utilització de diferents plataformes de microxips provoca variabilitat en els resultats (Jarvinen *et al.*, 2004). Aquestes diferències venen originades per: (i) errors en la localització dels clons en la matriu, (ii) variacions en l'assignació i anotació gènica, (iii) diferències en les propietats d'hibridació inherents segons si hibridem sobre BACs, cDNAs o oligonucleòtids, i (iv) diferències en la tecnologia de l'escanejat, filtratge i normalització de les dades.

## 5.2. EL MODEL DE CÒLON: UN CÒLON, MOLTS CÀNCERS

### 5.2.1. RELACIÓ ENTRE ELS TUMORS CIN I ELS TUMORS MSI

Tal i com s'ha descrit en la introducció (veure apartat 1.4.7), el càncer de còlon es divideix en dos grans grups, els que presenten inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i els que no (no MSI o CIN). Aquesta divisió implica l'associació dels tumors amb MSI a un cariotip diploide i poques reorganitzacions cromosòmiques, localització del tumor en el còlon esquerre i, en general, bon pronòstic. Per altra banda els tumors sense MSI, altrament anomenats CIN, presenten majoritàriament inestabilitat cromosòmica, cariotips poliploides i múltiples pèrdues d'heterozigositat, localització al còlon dret i recte, i pitjor pronòstic. De les següents variables que diferencien els dos tipus de tumors, ens centrarem en les que fan referència a alteracions cromosòmiques i ploïdia.

L'estudi de models cel·lulars que presentin la combinació dels dos patrons d'inestabilitat genòmica ens pot ajudar a entendre les bases genètiques d'aquests fenotips. Això és el que vam aconseguir mitjançant l'estudi del model de línies cel·lulars KM12. Aquest model està format per un conjunt de línies cel·lulars derivades d'un tumor primari les quals presentaven diferent potencial metastàtic quan s'inoculaven en ratolins immunodeprimits (Morikawa *et al.*, 1988). La línia cel·lular que presentava menys capacitat metastàtica la van anomenar KM12C, mentre que les altament metastàtiques eren la KM12L4A i la KM12SM. La línia cel·lular KM12C constitueix una model per aquells tumors de còlon que presenten inestabilitat de microsatèl·lits amb un cariotip diploide (tal i com s'esperaria del model de tumors amb MSI), però alhora presenta inestabilitat cromosòmica estructural, calculada com el número d'alteracions no clonals dividit entre el número de cèl·lules analitzades (*maxr*). La presència d'aquesta inestabilitat cromosòmica està sostinguda pel fet que les línies cel·lulars de càncer de còlon que es defineixen com a model del grup de tumors CIN (ex: SW480) presentaven uns valors de *maxr* inferiors al de la KM12C. Tal i com mostraven els primers estudis (Yeatman *et al.*, 1996), les línies cel·lulars que presentaven un alt potencial metastàtic (KM12L4A i KM12SM) tenien un cariotip quasi-

tetraploide. Per tant, aquestes cèl·lules, a part de mantenir la inestabilitat de microsatèl·lits, s'ajusten al model d'inestabilitat cromosòmica definit per Lengauer i col. (1998) i, a més a més, presenten unes taxes d'inestabilitat cromosòmica estructural (*maxr*) molt elevada. Dit d'una altra manera, aquestes cèl·lules constitueixen un model únic ja que presenten els fenotips MSI i CIN (MSI+CIN+), incloent la inestabilitat numèrica i estructural, demostrant que els patrons d'inestabilitat genòmica CIN i MSI no són excloents i poden coexistir en una mateixa cèl·lula (Camps *et al.*, 2004a).

Estudis anteriors en línies cel·lulars de càncer de còlon i recte ja van suggerir que, a part dels models establerts de CIN i MSI, hi havia unes línies cel·lulars que no s'ajustaven a cap d'aquests dos models i es diferenciaven pel patró característic d'alteracions cromosòmiques (Abdel-Rahman *et al.*, 2001). Els autors destaquen un parell de línies cel·lulars que, tot i presentar inestabilitat de microsatèl·lits, una d'elles amb un cariotip quasi-diploide (HCA7) i l'altra quasi-triploide (LS411), presenten un nombre d'alteracions cromosòmiques tan elevat com les línies cel·lulars característiques del grup CIN. Tot i que en aquest treball no es parla explícitament de CIN, la quantitat d'alteracions cromosòmiques d'aquestes línies cel·lulars fa pensar que presenten una inestabilitat cromosòmica estructural elevada. Recentment, s'ha estudiat la presència d'aquests patrons d'inestabilitat en línies cel·lulars de càncer de mama i ovari (Gorringe *et al.*, 2005). Segons aquests autors i de la mateixa manera que trobem en les línies cel·lulars de còlon, la MSI i la CIN numèrica no s'exclouen mútuament, però sí que trobem que la CIN estructural té lloc independentment de la inestabilitat de microsatèl·lits o de la inestabilitat cromosòmica numèrica.

Pel que fa als tumors primaris, els dos patrons d'inestabilitat genòmica majoritaris són, en principi, independents i excloents. Els tumors CIN+MSI- representen quasi el 85% dels càncers de còlon esporàdics. Els desequilibris cromosòmics més freqüents són el guany dels cromosomes 20q i 8q, i pèrdua de 18q (Ried *et al.*, 1996). Altres alteracions que també poden presentar aquests tumors són els guanys dels cromosomes 17q, 20p, 7q i 13q, i les pèrdues de 4, 15q, 5q, 8p i 14q. Aquest grup de tumors englobaria els tumors classificats dintre el grup de *Monosomic Type* i alguns *Trisomic Type* segons el model establert per Dutrillaux (Dutrillaux, 1995), i els tumors classificats amb un alt índex d'aneuploidia segons Risques i col. (2003a). En el nostre treball (Camps *et al.*, In revision), trobem alteracions de regions mínimes específiques d'aquest grup tal i com la pèrdua de 1p22, 4q26, 6q22q24, 8p23, 14q11q24 i 15q21, i el guany en 13q.

L'altre grup de tumors que presenta un model d'inestabilitat genòmica ben definit és el CIN-MSI+. Clarament corresponen als tumors *Normal Type*, però també hi inclouríem

alguns *Trisomic Type* (Dutrillaux, 1995). Els tumors d'aquest grup són majoritàriament diploides. Tot i així, els nostres resultats mitjançant la CGH convencional i la CGH sobre microxips mostren que pocs tumors amb MSI no presenten cap desequilibri genòmic. Algunes de les alteracions que presenten els tumors CIN-MSI+ coincideixen amb les que freqüentment es troben en els tumors CIN+MSI-. Així, els resultats de l'estudi mostraven que els guanys en 8q24, 16q24.3, 17q21, 17q25 i 20q13.2-q13.3, i la pèrdua de 5q21 eren regions cromosòmiques freqüentment alterades, tant en els tumors CIN+ com en els MSI+. A més a més, els nostres resultats ens van mostrar que el guany de la regió cromosòmica 22q13 apareixia específicament representat en el grup de tumors CIN-MSI+.

Tot i que la majoria de càncers de còlon i recte pertanyen a un d'aquests dos models d'instabilitat, recentment, alguns autors ja han suggerit l'existència de tumors primaris que presenten instabilitat de microsatèl·lits juntament amb instabilitat cromosòmica, la qual cosa corroboraria els resultats obtinguts en el model *in vitro* de les cèl·lules KM12.

En el nostre estudi de tumors primaris mitjançant CGH (Camps *et al.*, In revision), hi havia tres tumors amb MSI que presentaven un nombre d'alteracions cromosòmiques tan elevat com en els tumors CIN. Això obre les portes a un nou grup de tumors, els CIN+MSI+. Mitjançant un estudi de CGH sobre microxips (Nakao *et al.*, 2004), aquests autors també van trobar que un 5% de tumors MSI presentaven desequilibris genòmics. L'existència d'aquest grup de tumors ja va ser postulada anteriorment per altres autors (Goel *et al.*, 2003; Halford *et al.*, 2002). Concretament, Goel i col. trobaren que un 3,4% dels tumors que analitzaven eren CIN+MSI+, definint el tumor CIN com aquell que presentava pèrdues al·lèliques en almenys un dels vuit marcadors polimòrfics localitzats en regions cromosòmiques que freqüentment apareixien perdudes en els tumors esporàdics sense instabilitat de microsatèl·lits. Aquest mateix grup va observar que la freqüència de LOH en tumors amb una baixa MSI era superior a la que es presentava en tumors amb nivell elevat de MSI, suggerint que els tumors amb un baix nivell de MSI presentaven un perfil molecular particular però molt semblant als tumors sense instabilitat de microsatèl·lits.

Per altra banda, segons Goel i col. (2003), un 37,8% dels tumors de la seva sèrie eren CIN-MSI-. Pels autors, el comportament d'aquests tumors es podria explicar per modificacions epigenètiques de gens reguladors del creixement cel·lular. De totes maneres, per avaluar la instabilitat cromosòmica només van tenir en compte la pèrdua de sis braços cromosòmics, que si bé són molt representatius del càncer de còlon, no extrapol·len el comportament de tot el genoma. A més a més, també



s'haurien hagut de tenir en compte els guanys cromosòmics, amplificacions gèniques i les reorganitzacions cromosòmiques estructurals per definir l'estat de CIN, les quals poden passar desapercibudes en l'anàlisi de LOH.

L'estat CIN-MSI- ja el van descriure altres autors utilitzant la CGH convencional i la citometria de fluxe (Georgiades *et al.*, 1999), però el nombre de tumors CIN-MSI- era molt baix (3 de 22 tumors). Recentment, els tumors CIN-MSI- també s'han estudiat mitjançant CGH sobre microxips de BACs (Jones *et al.*, 2005). Aquests autors van estudiar un grup de 23 tumors quasi-diploides i sense inestabilitat de microsatèl·lits, però no van trobar alteracions, ni a nivell cromosòmic ni a nivell gènic, que fossin característiques d'aquests tumors i que els diferenciessin dels tumors CIN. Així, aquest grup de tumors es perfila com un calaix de sastre que inclou tumors quasi-diploides sense inestabilitat de microsatèl·lits, però que presenten alteracions cromosòmiques semblants als tumors CIN, encara que amb una freqüència més baixa. En el treball IV (Camps *et al.*, In revision) vam identificar tres tumors sense inestabilitat de microsatèl·lits i amb molt pocs desequilibris genòmics detectats amb CGH convencional. Aquests tumors es podrien incloure dintre el grup CIN-MSI-. En el nostre treball, el percentatge de tumors CIN-MSI- (3 de 28 tumors) s'assemblaria molt a l'obtingut per Georgiades i col. (1999).

En conclusió, a partir dels resultats obtinguts en el nostre treball, observem que la classificació en dos grans grups dels tumors de còlon en funció del seu patró d'inestabilitat genòmica es fa insuficient per entendre la variabilitat global que presenten aquests tumors.

### **5.2.2. EVOLUCIÓ CROMOSÒMICA DES DEL CARCINOMA A LA METÀSTASI**

Tornant de nou al model de les línies cel·lulars KM12, les cèl·lules altament metastàtiques deriven de la línia parental i alhora menys metastàtica, la qual cosa indica que les tres línies cel·lulars, tot i presentar capacitats fenotípiques diferents, estan genèticament relacionades. La relació entre aquestes línies cel·lulars ens va permetre realitzar un seguiment evolutiu dels canvis citogenètics entre el tumor primari i les cèl·lules metastàtiques derivades. La caracterització dels marcadors citogenètics ens va permetre interpretar el procés evolutiu que havien realitzat les cèl·lules (Camps *et al.*, 2004a). Vam observar que les tres formes de les línies cel·lulars presentaven tres reorganitzacions estructurals comunes, que corresponien a les translocacions desequilibrades der(5)t(5;18;Y), der(6)t(6;12) i der(22)t(20;22). Aquestes alteracions les podríem definir com alteracions primerenques o fundadores. En les línies cel·lulars

altament metastàtiques, aquestes alteracions apareixien duplicades, la qual cosa ens va permetre deduir que la tetraploïdia s'originava després d'un procés d'endoreduplicació. A part d'aquestes alteracions, les cèl·lules KM12C van adquirir altres alteracions i van formar subpoblacions, donant una idea de l'heterogeneïtat poblacional. Tot i aquesta heterogeneïtat, el procés d'endoreduplicació que va donar lloc a les cèl·lules altament metastàtiques va tenir lloc abans que es formessin les subpoblacions cel·lulars. Els primers passatges de la línia cel·lular KM12SM presentaven les alteracions fundadores i algunes més, però no és fins en els passatges més tardans quan s'evidencia encara més la inestabilitat cromosòmica estructural. Això fa pensar que l'elevada potencialitat metastàtica de les línies KM12SM i KM12L4A estaria molt associada al fenomen de poliploïdització. Aquest model d'evolució estaria englobat en el grup designat com a *Monosomic Type* per Dutrillaux i col. (1995). Tot i treballar amb línies cel·lulars, les alteracions que vam observar amb la CGH i M-FISH de la línia KM12SM coincideixen amb els resultats que presenten els tumors de còlon primaris amb metàstasi a fetge realitzats per altres autors (Al-Mulla *et al.*, 1999; Nakao *et al.*, 2001; Parada *et al.*, 1999).

### **5.3. LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA: RELACIÓ ENTRE LES ALTERACIONS NUMÈRIQUES I ESTRUCTURALS**

La inestabilitat cromosòmica s'ha definit clàssicament com un augment de la presència d'alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals. Donat que en essència la inestabilitat és dinàmica i no estàtica, Lengauer i col. (1998) van definir la inestabilitat cromosòmica (CIN) com l'acceleració de la taxa de guanys i pèrdues cromosòmiques, donant com a resultat els cariotips aneuploides de les cèl·lules tumorals. Aquesta definició està clarament esbiaixada perquè només té en compte les alteracions cromosòmiques numèriques, deixant al marge les alteracions estructurals (delecions intersticials, inversions i translocacions), que no pot mesurar amb l'assaig de FISH. Nosaltres, així com altres autors, proposem que el terme inestabilitat cromosòmica inclogui la generació tant d'inestabilitat numèrica com d'inestabilitat estructural.

#### **5.3.1. INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL**

La taxa d'inestabilitat cromosòmica va ser exahustivament mesurada en la línia cel·lular SW480 (Camps *et al.*, 2005). Es van estudiar els clons originats a partir d'una sola cèl·lula, per tal de conèixer el nombre de generacions transcorregudes i per simular les condicions de pressió selectiva a què està sotmesa una cèl·lula en un determinat microambient cel·lular. Les taxes d'inestabilitat cromosòmica estructural es

van obtenir a partir de l'expressió *maxr* (definida en l'apartat 5.1.3). Els resultats suggereixen que quan una cèl·lula està sotmesa a condicions d'estrés cel·lular (per exemple durant la generació d'una subpoblació tumoral), activa un mecanisme de generació de reorganitzacions estructurals continu i propi que provoca l'aparició d'alteracions cromosòmiques no clonals, la majoria de les quals no es fixen en el cariotip. Aquest motor que genera inestabilitat cromosòmica estructural també s'ha proposat pel càncer de pròstata (Beheshti *et al.*, 2001), d'ovari (Gorringe *et al.*, 2005; Roschke *et al.*, 2002), de mama (Gorringe *et al.*, 2005) i el carcinoma oral de cèl·lules escamoses (Reshmi *et al.*, 2004). En l'estudi de subclons de línies cel·lulars de càncer de mama, Gorringe i col. (2005) van observar que el nombre d'alteracions estructurals no variava, independentment de si es tractava d'una línia cel·lular típicament amb inestabilitat de microsatèl·lits o sense inestabilitat de microsatèl·lits, fos diploide o aneuploide. Dit d'una altra manera, la taxa d'alteracions numèriques i estructurals pot variar independentment del grau i tipus d'inestabilitat genòmica. Aquests autors suggereixen que les alteracions estructurals estan més fortament afectades per la selecció que les alteracions numèriques. Aquestes dades difereixen de les obtingudes per Ribas i col (2003), els quals van trobar que els clons de les línies cel·lulars de càncer de còlon MSI+ (HCT-116 i LoVo) no presentaven la mateixa taxa de generació d'alteracions estructurals que els subclons de la línia típicament CIN (SW480). Aquestes diferències suggereixen un mecanisme de desestabilització genòmica desigual pels tumors de mama i de còlon. Dutrillaux (1995) ja va suggerir que les alteracions cromosòmiques estructurals eren molt importants en el càncer de mama, i que les cèl·lules dels tumors de mama presentaven unes taxes de reorganitzacions cromosòmiques molt superiors al càncer de còlon.

Tot i aquestes discrepàncies, tots les resultats coincideixen en el fet que hi ha una sèrie d'alteracions cromosòmiques que esdevenen clonals en els subclons generats respecte el cariotip de la línia parental. El nivell d'aquesta estabilització depèn de dos factors, de la taxa màxima d'inestabilitat cromosòmica estructural i de l'avantatge selectiu que comporta en el cultiu cel·lular. En el nostre cas, degut a l'observació que en la línia parental la taxa de formació de reorganitzacions cromosòmiques era inferior respecte a les observades en els subclons, suggerim que la generació dels subclons funcionaria com un mecanisme accelerador de la desestabilització cariotípica. Hi ha dues interpretacions possibles quan observem l'elevada heterogeneïtat cromosòmica estructural dels subclons respecte la seva línia parental: que la inestabilitat cromosòmica estructural és superior en els subclons, o bé que essent la mateixa que en la línia parental, l'efecte que produeix (heterogeneïtat) està emmascarat per la competitivitat cel·lular. En qualsevol dels casos, el que demostren els resultats és que

la generació d'episodis de clonalitat, ja sigui *in vitro* o *in vivo*, afavoreix l'increment de l'heterogeneïtat genètica.

Aquestes diferències entre la població parental i els subclons suggereixen que la generació dels clons desregula algun dels mecanismes cel·lulars que controlen les vies de formació de reorganitzacions estructurals, o sigui, els mecanismes de reparació dels trencaments de doble cadena o les disfuncions telomèriques. I si li donem la volta a aquesta teoria, arribem a una de les hipòtesis de partida, desregulacions genètiques o epigenètiques en els sistemes de control de la formació i reparació de reorganitzacions estructurals poden provocar una taxa d'instabilitat cromosòmica estructural que facilitarà la formació de noves poblacions tumorals, alguna de les quals estarà capacitada per progressar d'adenoma-carcinoma-metàstasi.

### **5.3.2. LES ESTRUCTURES ANÒMALES DEL NUCLI COM A INDICI DE LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL**

S'ha demostrat una relació entre els patrons cariotípics inestables i les estructures anòmales del nucli (Gisselsson *et al.*, 2001a). Les principals estructures anòmales són els micronuclis, els ponts nucleoplasmàtics i les protuberàncies nuclears. Per tant, aquestes estructures indicarien la presència d'instabilitat cromosòmica estructural (Fenech, 2002). Metodològicament, la millor tècnica per visualitzar aquestes estructures és bloquejar la citocinesi, induint la formació de cèl·lules binucleades, assaig que es coneix amb el nom de *cytokinesis-block micronucleus assay* (CBMN). Aquest assaig també s'ha proposat per distingir els efectes genotòxics en termes de freqüència/taxa de ponts nucleoplasmàtics i micronuclis (Thomas *et al.*, 2003).

Els **micronuclis** (MN) deriven de material de DNA que no s'ha segregat en cap dels nuclis de les cèl·lules filles durant l'anafase. Aquest material pot pertànyer a un cromosoma sencer, la qual cosa originaria una aneuploïdia en una de les cèl·lules filles, o pot pertànyer a un tros de cromosoma que s'hagi trencat com a conseqüència d'un trencament de doble cadena mal reparat. La tècnica de FISH amb sondes centromèriques va ser aplicada sobre les cèl·lules binucleades per identificar quants micronuclis presentaven senyal, cosa indicativa de què en el micronucli hi havia un cromosoma sencer, i quants no presentaven senyal, la qual cosa ens indicava que el material d'aquell micronucli corresponia a fragments que, com a molt, només implicaven un braç cromosòmic. Els nostres resultats mostraven bastanta heterogeneïtat entre els subclons, i no ens van permetre treure una conclusió final referent a la relació entre les micronuclis i la instabilitat cromosòmica estructural. En

aquest cas concret, l'extrapol·lació d'una freqüència genòmica de les alteracions estructurals a partir de l'observació de micronuclis sense senyals centromèriques es veia limitada per deficiències tecnològiques.

Els **ponts nucleoplasmàtics** (NPB) o ponts anafàsics s'originen degut a la formació de cromosomes dicèntrics, a la fusió de cromàtides germanes i a cromosomes en anell. Els centròmers tendeixen a estirar el cromosoma cap als pols oposats i provoquen que els dos nuclis de les cèl·lules filles es mantinguin temporalment units. La millor manera de visualitzar els ponts nucleoplasmàtics és mitjançant l'assaig de CBMN ja que la inhibició de la citocinesi impedeix la pèrdua de l'estructura del pont (Thomas *et al.*, 2003). Les freqüències elevades de ponts nucleoplasmàtics tant en la línia parental com en els subclons de la línia SW480 ens farien suposar que també hauríem de trobar una alta freqüència de cromosomes dicèntrics en l'anàlisi dels cariotips. Tot i el detallat estudi dels cariotips moleculars d'aquesta línia i els seus subclons, no vam identificar la presència de cromosomes dicèntrics emergents que pogués justificar l'elevada freqüència de ponts nucleoplasmàtics quan ho comparàvem amb la línia cel·lular HCT-116. Tot i així, l'estudi de la línia cel·lular mitjançant cenM-FISH ens va permetre identificar la presència de tres cromosomes dicèntrics críptics. Aquests cromosomes es mantenien estables en totes les metafases analitzades, la qual cosa significaria que un dels centròmers es mantindria funcional, mentre que l'altre estaria inactivat. Es coneix que la inactivació dels centròmers es pot donar per la proximitat entre ells (Therman *et al.*, 1986), característica que presentaven en comú els tres cromosomes marcadors (Camps *et al.*, 2004b). Tot i això, no podem afirmar definitivament la inactivació dels centròmers ja que no vam comprovar si presentaven les proteïnes centromèriques funcionals o no. Els nostres resultats ens van ajudar a decantar-nos a favor de la inactivació d'un centròmer dels cromosomes dicèntrics identificats. En aquest sentit vam escollir el DNA  $\alpha$ -satèl·lit del cromosoma 15, el qual està implicat en la formació del cromosoma dicèntric dic(15;18), per fer els anàlisis de CBMN. Els resultats indicaven que la freqüència de senyals pel centròmer del cromosoma 15 que trobàvem implicats en la formació d'estructures anòmales del nucli no era superior a la dels altres cromosomes analitzats, la qual cosa indicava que aquest cromosoma dicèntric no era ni més ni menys inestable que qualsevol altre marcador.

Per tant, el fet de no identificar cromosomes dicèntrics en les metafases, ens suggereix que la formació de ponts nucleoplasmàtics es fonamenta en algun altre mecanisme dels esmentats en la introducció (apartat 1.2.2.3). Donat que la línia cel·lular SW480 presenta escurçament telomèric (dades no publicades), podem suggerir que disfuncions telomèriques estarien implicades en la generació dels ponts

(Stewenius *et al.*, 2005). Ara bé, no podem descartar que errors en els sistemes de reparació dels trencaments de doble cadena o la recombinació homòloga de seqüències que continguin duplicacions segmentàries intercromosòmiques també puguin estar implicades en la generació d'instabilitat. Cal tenir en compte que, ni les disfuncions telomèriques ni la inducció de ponts nucleoplasmàtics per agents exògens tals com la radiacions ionitzants, tenen capacitat de generar, en cèl·lules normals, una taxa d'instabilitat cromosòmica tant elevada com la que s'observa en cèl·lules neoplàsiques.

La relació entre els ponts anafàsics i els micronuclis és molt íntima. Sovint, la reorganització cromosòmica que implica la formació del pont nucleoplasmàtic ha originat prèviament un fragment acèntric, i aquest originarà el micronucli. Una altra teoria és que els micronuclis poden ser el resultat del trencament en múltiples punts del pont anafàsic, llavors quedaria material genètic fragmentat que generaria el micronucli (Hoffelder *et al.*, 2004). El fet que el pont nucleoplasmàtic es trenqui per diferents punts implica que no només estarien intervenint les forces de tensió generades per l'apartament dels pols del fus mitòtic (Gisselsson *et al.*, 2001b). Mitjançant micromanipulació s'ha demostrat que un cromosoma metafàsic pot estirar-se fins a 10 vegades el seu tamany (Houchmandzadeh *et al.*, 1997) i encara no es trencaria. Faria falta estirar-lo fins a 100 vegades la seva llargada natural per crear una discontinuïtat absoluta en el filament de DNA. Per tant, la fragmentació dels ponts nucleoplasmàtics en les cèl·lules tumorals s'explicaria per un mecanisme diferent al de l'estirament. Possiblement, la degradació enzimàtica del DNA extracel·lular seria un d'ells (Gisselsson & Hoglund, 2005).

Els ponts nucleoplasmàtics han estat estudiats des de molts punts de vista, però recentment, tots els autors estan d'acord en afirmar que aquestes estructures són una clara evidència d'instabilitat cromosòmica estructural, ja que són estructures que impliquen una generació contínua (taxa) de reorganitzacions cromosòmiques.

Les **protuberàncies nuclears** (NB) són la tercera estructura anòmala que es pot identificar mitjançant l'anàlisi de les cèl·lules binucleades. Representen les estructures menys estudiades encara que ja fa temps es van proposar com un mecanisme d'expulsió d'amplificacions gèniques (Toledo *et al.*, 1992) i, més recentment, per eliminar fragments de DNA (Gisselsson *et al.*, 2001b). Nosaltres proposem que aquestes protuberàncies nuclears també poden incloure cromosomes sencers. Vam detectar senyals centromèriques en el seu interior i, tot i que directament no ha de perquè implicar que el cromosoma sencer es perdi, permet hipotetitzar que aquestes protuberàncies poden contenir, no solament fragments de DNA trencats, sinó també

braços cromosòmics, o inclús cromosomes sencers. Així, les protuberàncies nuclears podrien actuar potencialment com un micronucli.

En general, quan vam comparar els valors de les estructures anòmales del nucli entre la línia parental SW480 i els seus subclons, vam observar que els subclons que presentaven més estructures anòmales del nucli eren els subclons que alhora presentaven una taxa màxima (*maxr*) d'instabilitat estructural més elevada, la qual cosa corroborava la nostra hipòtesi de partida, la qual relacionava directament la presència d'estructures anòmales del nucli amb la instabilitat cromosòmica estructural.

### 5.3.3. INESTABILITAT CROMOSÒMICA NUMÈRICA

Lengauer i col. quan van definir la instabilitat cromosòmica en cèl·lules de càncer colorectal es van basar en estudis de la variació en el nombre de senyals de FISH centromèriques per diferents cromosomes entre les cèl·lules que formaven un subclon (Lengauer *et al.*, 1997). Aquest anàlisi s'ha utilitzat en altres estudis per determinar la instabilitat cromosòmica en altres tipus de tumors (Reshmi *et al.*, 2004; Roschke *et al.*, 2002). Nosaltres ens vam proposar abordar la instabilitat cromosòmica numèrica des d'un punt de vista de la generació dinàmica d'aneuploïdies, i és per això que vam anar més enllà de la valoració de l'heterogeneïtat intercel·lular. Per tal de quantificar la taxa d'aneuploïdia vam dissenyar l'assaig de cèl·lules binucleades i vam utilitzar DNA  $\alpha$ -centromèric específic pels cromosomes 4, 7, 15 i 17. Vam escollir realitzar l'anàlisi d'aquests cromosomes perquè tots, excepte el cromosoma 4, estaven implicats representativament en reorganitzacions cromosòmiques observades en l'anàlisi dels cariotips de la línia SW480.

La finalitat de l'assaig CBMN utilitzant FISH era conèixer l'origen més comú de l'aneuploïdia (veure apartat 3.2.6) en aquesta línia cel·lular i si hi havia diferències respecte els subclons. La primera conclusió que vam extreure és que no hi havia grans diferències entre les taxes d'instabilitat cromosòmica numèrica de la línia cel·lular parental SW480 i les dels seus subclons, suggerint que hi hauria una contínua generació d'alteracions numèriques sense que es fixessin en el cariotip. Contràriament al resultat d'altres autors en l'estudi de tumors de mama (Gorringe *et al.*, 2005), nosaltres hem trobat que hi havia molta diferència en les taxes d'instabilitat numèrica entre la línia que presentava instabilitat de microsatèl·lits (HCT-116) i la línia que no en presentava (SW480). Per altra banda, el nostre treball suggereix que els cromosomes més implicats en alteracions estructurals, que en aquest cas estava representat pels cromosomes 7 i 15 (Camps *et al.*, 2004b), presentaven una major

freqüència d'aneuploïdies. Per tant, sembla que hi hauria una clara relació entre les alteracions numèriques i les alteracions estructurals, ja que per altra banda, el cromosoma 4, que estava representat en una dotació diploide en la majoria dels cariotips sense estar implicat en reorganitzacions estructurals, presentava la taxa d'aneuploïdia més baixa (veure en l'apartat 5.3.4).

Quan vam parar atenció als mecanismes de generació d'aneuploïdia, no vam observar diferències molt clares en les freqüències de pèrdua anafàsica i no-disjunció. Així, podem suggerir que les cèl·lules SW480 no tenen un mecanisme prioritari mitjançant el qual aconseguen un elevat índex d'aneuploïdia. Indubtablement, qualsevol dels dos mecanismes genera una pèrdua cromosòmica en una de les cèl·lules filles, però, a més a més, la no-disjunció provoca el guany d'un cromosoma en l'altra cèl·lula filla com a conseqüència de la segregació anòmala. Només en el cas del DNA  $\alpha$ -satèl·lit pel cromosoma 15, el qual indicava tetra- o pentasomia malgrat la presència invariable de només dos cromosomes 15 normals en els cariotips (Risques *et al.*, 2003b), presentava una preferència significativa per la no-disjunció. Per tant, de nou podem suggerir la interrelació entre l'aneuploïdia i les alteracions cromosòmiques estructurals.

En conclusió, podem afirmar que en el cas de què la no-disjunció i la pèrdua cromosòmica estiguin representades per igual, les pèrdues cromosòmiques sempre superaran als guanys. Aquesta idea està d'acord amb la hipòtesi que una cèl·lula assoleix la poliploïdia després d'un procés d'endoreduplicació i posterior pèrdua de cromosomes fins a establitzar-se al voltant d'un nombre modal triploide.

#### **5.3.4. RELACIÓ ENTRE L'ANEUPLOÏDIA I LA INESTABILITAT CROMOSÒMICA ESTRUCTURAL**

En aquest apartat de la discussió evitarem realitzar comparacions directes entre la inestabilitat numèrica i l'estructural, ja que els mètodes utilitzats per mesurar-les han estat completament diferents. A més a més, quan vam quantificar les estructures anòmales del nucli, altrament indicadores d'inestabilitat cromosòmica estructural, mitjançant l'assaig CBMN, no vam obtenir les diferències esperables entre la línia parental i els subclons de la SW480 si ens ateníem a les taxes *maxr* obtingudes a partir de l'anàlisi dels cariotips. Però tot i això, afirmem enèrgicament la relació entre les estructures anòmales del nucli i la inestabilitat estructural.



**Quadre 4. Avantatges i desavantatges de mesurar la inestabilitat cromosòmica estructural mitjançant M-FISH o amb FISH centromèrica sobre cèl·lules binucleades.**

<b>M-FISH</b>	<b>CBMN + FISH centromèrica</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Treballar amb el cariotip de la cèl·lula aporta informació de tot el genoma en un sol experiment.</li> <li>■ Permet descriure les alteracions estructurals.</li> <li>✗ Dificultat en l'obtenció de metafases.</li> <li>✗ Possible pèrdua cromosòmica artefactual.</li> <li>✗ Anàlisi d'un nombre de metafases limitat.</li> <li>✗ No podem assegurar que les reorganitzacions no clonals s'hagin originat en la interfase immediatament anterior.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Treballar amb un elevat nombre de nuclis interfàsics.</li> <li>■ Observació de les estructures anòmales del nucli.</li> <li>■ Mesura del dinamisme de la generació d'alteracions, tant numèriques com estructurals.</li> <li>✗ No podem interpretar tot el genoma alhora.</li> <li>✗ Dificultat en la identificació d'estructures complexes.</li> <li>✗ Els micronuclis poden contenir material genètic de cromosomes sencers o fragmentats.</li> </ul>

Els resultats del treball III (Camps *et al.*, 2005) suggereixen que després d'episodis de clonalitat en una línia cel·lular CIN (SW480), la inestabilitat cromosòmica estructural augmenta significativament i sembla que hi hagi una prevalença d'aquesta sobre la numèrica, o sigui, que les alteracions estructurals podrien jugar un paper protagonista en la generació de l'heterogeneïtat genètica, potencialment superant la variabilitat observada a nivell d'alteracions numèriques. Per corroborar aquesta hipòtesi caldria realitzar el mateix estudi en altres línies cel·lulars de càncer de còlon també estereotipades dintre el grup de CIN.

L'origen i la relació entre les alteracions cromosòmiques estructurals i numèriques són dos aspectes de la carcinogènesi que han estat intensament debatuts (Marx, 2002). Així doncs, per saber si la generació de translocacions, i per extensió de totes les alteracions cromosòmiques estructurals, constitueix un mecanisme acoplat als defectes de segregacions cromosòmiques, o bé representa una forma independent d'inestabilitat cromosòmica, encara queda molt camí per estudiar. El desequilibri d'una translocació recíproca comporta una aneusomia dels cromosomes implicats en la reorganització. En aquest cas, la cèl·lula pot compensar el desequilibri mitjançant la duplicació del cromosoma normal, però definitivament generarà una translocació no-recíproca que correspon a la majoria d'alteracions observades en els cariotips de cèl·lules amb inestabilitat cromosòmica. Els cicles de trencament-fusió-pont, mecanisme promotor de les alteracions estructurals, també poden provocar aneuploïdies quan una de les cromàtides dicèntriques es desuneix del fus mitòtic i es segrega conjuntament amb la seva cromàtide germana en la mateixa cèl·lula filla (Gisselsson & Hoglund, 2005). A favor de la vessant estructural, hi ha estudis que

demostren que el nombre total d'alteracions cromosòmiques estructurals és proporcional al risc de desenvolupar metàstasi (Mitelman *et al.*, 1997) i evidentment, aquest procés es podria veure afavorit per la desestabilització en l'estructura dels cromosomes.

El fet que la línia cel·lular parental i els subclons presentin una taxa semblant d'instabilitat cromosòmica numèrica, o aneuploïdia, significa que la instabilitat numèrica és un fenomen inherent d'aquestes cèl·lules que es manté constant independentment de l'entorn extern. De manera semblant, la instabilitat cromosòmica estructural mesurada a partir de les estructures anòmales del nucli també es manté constant. Malgrat això, observem un augment del paràmetre *maxr* en els subclons, suggerint que les reorganitzacions no es fixarien en el cariotip. Per tant, les alteracions estructurals presenten un caràcter autocatalític més prominent que la pròpia aneuploïdia.

La relació més clara entre les alteracions estructurals i l'aneuploïdia la va establir un estudi que proposa que la desestabilització de centenars i milers de gens, inherent a l'aneuploïdia, desestabilitza l'estructura dels cromosomes catalitzant trencaments en el DNA (Fabarius *et al.*, 2003). La seva teoria s'explica pel fet que l'aneuploïdia provoca desequilibris en gens que mantenen l'estructura del DNA, els *pools* de nucleòtids i l'equilibri d'histones. En aquest estudi els autors demostren que la taxa de cromosomes reorganitzats és proporcional al grau d'aneuploïdia de diferents poblacions cel·lulars de hàmmster xinès que presenten diferents dotacions de ploïdia genòmica. Aquests resultats coincideixen amb el que van observar Abdel-Rahman i col. en línies cel·lulars de càncer de còlon, i que evidenciava que les línies cel·lulars quasi-diploides presentaven menys alteracions estructurals que les línies cel·lulars altament aneuploides. Hi ha estudis anteriors que també suggereixen una estreta relació entre l'aneuploïdia i les alteracions cromosòmiques estructurals en tumors sòlids (Ried *et al.*, 1999). Potser en aquest punt de la discussió val la pena incidir en l'estudi de les alteracions cromosòmiques estructurals no clonals que apareixen *de novo* en una única cèl·lula com a mecanisme que evidencia una taxa de reorganitzacions (Fabarius *et al.*, 2003). Que una alteració cromosòmica, ja sigui numèrica o estructural, esdevingui clonal, no ens aporta cap informació sobre la taxa de generació d'alteracions en aquella cèl·lula. La relació proporcional entre la generació contínua d'alteracions no clonals i la probabilitat de trobar-ne alguna d'aquestes fixada en el cariotip només és un indicatiu que no demostra directament l'existència d'una taxa dinàmica de generació d'alteracions (Camps *et al.*, 2005).

Estudis recents demostren que l'aneuploïdia induïda mitjançant la transferència d'un cromosoma a cèl·lules amb fenotip MSI, tot i no generar un fenotip CIN, provoca una

desregulació del transcriptoma, no solsament del cromosoma transferit, sinó també de la resta del genoma (Upender *et al.*, 2004). Tot i així, existeixen evidències que contraposen la transcendència de l'estabilitat cariotípica, i suggereixen que la inestabilitat genòmica no és necessària per la transformació de línies cel·lulars normals (Zimonjic *et al.*, 2001).

En qualsevol cas, l'heterogeneïtat intratumoral es veurà afavorida en aquelles cèl·lules que presentin una taxa elevada d'inestabilitat genòmica. Sigui quin sigui el tipus d'inestabilitat genòmica, aquesta comporta una desregulació del cycle cel·lular que afavorirà la carcinogènesi. Aquesta és la premissa que hem intentat demostrar al llarg dels treballs realitzats.

#### **5.4. EL TERME ANEUPLOÏDIA EN EL CONTEXT ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓ DEL CÀNCER**

L'aneuploïdia és el guany o la pèrdua de cromosomes individuals (Miller & Therman, 2001). Aquesta representa la definició per excel·lència del terme aneuploïdia. Recentment, s'han utilitzat altres definicions. Alguns autors entenen l'aneuploïdia com la constitució cromosòmica diferent a la diploide, degut a la pèrdua o duplicació de cromosomes sencers o fragments de cromosomes (Lewin, 1997). La definició més esbiaixada és la que fan Rajagopalan i col. (2003) quan defineixen l'aneuploïdia com els canvis en l'estructura i el nombre de cromosomes. Sovint, també s'usa el terme cèl·lula aneuploide per incloure-hi qualsevol cèl·lula poliploide, amb dotacions cromosòmiques al voltant de la tri- o tetraploïdia, característica molt comuna de les cèl·lules neoplàsiques.

La relació entre l'aneuploïdia i el càncer va ser descoberta fa molts anys, quan els investigadors observaren cèl·lules tumorals al microscopi i varen veure que presentaven un excés o un dèficit de cromosomes. Va ser Theodor Boveri qui, a començaments del segle XX, ja va suggerir que els tumors malignes provenien de cèl·lules individuals amb una constitució genètica anòmala adquirida com a resultat de defectes en el fus mitòtic. En efecte, la millor teoria que avui en dia explica l'aneuploïdia és que aquesta s'origina per defectes en la segregació cromosòmica, concretament com a conseqüència d'alteracions en el fus mitòtic.

Tal i com hem vist en la introducció i al llarg de la discussió, molts autors creuen que l'aneuploïdia té una base genètica, tot i que encara ningú s'atreveix a determinar unes causes concretes. Tot i que hi ha autors que proposen que l'aneuploïdia és un fenomen independent de mutacions genètiques i és fruit de l'atzar o bé provocat per algun agent genotòxic (Duesberg *et al.*, 1999), recentment, l'estudi de pacients amb

aneuploïdies variegades múltiples ha obert una porta a les causes genètiques de l'aparició d'aneuploïdies a nivell constitucional (Hanks *et al.*, 2004). L'establiment de línies cel·lulars provinents de cèl·lules limfoides d'aquests pacients, ha permès l'estudi citogenètic, suggerint que hi podria haver una selecció favorable a determinades aneuploïdes al llarg del cultiu cel·lular (estudi en procés amb dades no publicades). Aquesta selecció Darwiniana es fa pelesa quan s'observen les diferències entre les aneuploïdies que preferencialment es fixen en les neoplàsies hematològiques respecte les que es fixen en tumors sòlids (Plaja i col., treball en preparació)<sup>1</sup>. En aquest sentit afirmariem que hi ha determinades aneuploïdies que afavoreixen el desenvolupament de la carcinogènesi en funció de les forces selectives del teixit que l'envolta. Per exemple, el cromosoma 7, que presenta trisomies en teixit epitelial normal (Johansson *et al.*, 1993), es troba altament implicat en trisomies en tumors sòlids i, pel contrari, en neoplàsies hematològiques el trobem específicament originant monosomies. En aquest cas concret, podem suggerir un efecte selectiu de l'aneuploïdia oposat segons el teixit on es genera, ja sigui en un entorn epitelial o fibroblàstic, o bé en un entorn hematològic. La selecció específica de les aneuploïdies es veuria afavorida pels avantatges de creixement que aportaria la sobre- o infraexpressió dels gens continguts en el cromosoma alterat. Aquest treball apropa el fenotip CIN (segons l'estricta definició de Lengauer i col.), característic de la síndrome d'aneuploïdies variegades múltiples, amb les cèl·lules tumorals, sobretot pel cas dels tumors sòlids, la qual cosa aporta pes específic al mecanisme d'instabilitat cromosòmica com a inductor de la tumorigènesi.

Si bé està completament acceptat que les leucèmies presenten una taxa molt inferior d'instabilitat genòmica, les diferències entre les neoplàsies hematològiques i els tumors sòlids queden en certa evidència en l'estudi de limfomes. En aquest cas, l'estudi de diferents línies cel·lulars de limfomes de cèl·lules del mantell demostra que hi ha patrons de plasticitat cariotípica similars als observats en tumors sòlids (Camps *et al.*, Submitted).

---

1 Plaja A, Camps J, Dávalos D, Miró R, Pérez C, Schwartz S Jr. The Darwinian logic of cancer aneuploidy.

## ***6. CONCLUSIONS i PRESPECTIVES***

<<El més important és no deixar de qüestionar's'ho tot.>>

(Albert Einstein)

Els resultats obtinguts en l'estudi de la inestabilitat cromosòmica en el càncer colorectal han permès concloure el següent:

*Our results obtained in the study of chromosomal instability in colorectal cancer allowed us to conclude:*

1. La combinació de les tècniques de M-FISH i CGH és una bona eina per descriure cariotips tumorals complexes. Tot i així, actualment s'estan desenvolupant tècniques de citogenètica molecular que permeten definir alteracions cromosòmiques amb una major resolució, com per exemple la tècnica de cenM-FISH i la mMCB.

*The combination of M-FISH and CGH techniques is an excellent tool to describe complex tumor karyotypes. Currently, novel molecular cytogenetic techniques, such as cenM-FISH and mMCB, are being developed in order to improve the identification of chromosomal aberrations.*

2. La presència de cromosomes dicèntrics críptics descrits per cenM-FISH permet identificar l'origen d'alteracions cromosòmiques aparentment estables.

*The presence of cryptic dicentric chromosomes described by cenM-FISH allows to identify the origin of apparently stable chromosome reorganizations.*

3. El model d'evolució tumorigènica de les cèl·lules KM12 i els seus derivats ha permès descriure la via cariotípica d'aquestes cèl·lules per assolir una elevada capacitat metastàtica a fetge.

*The chromosomal evolution of KM12 cell lines represents a unique in vitro model to delineate the karyotypical pathway to acquire the liver metastatic capacity.*

4. El model de les cèl·lules KM12 reflexa que els patrons d'inestabilitat de microsatèl·lits i d'inestabilitat cromosòmica no són excloents, i els podem trobar coexistent al llarg del procés tumoral de les cèl·lules. Aquest patró es reproduïx en els tumors primaris de còlon i recte.

*The KM12 cells and metastatic derivatives model indicates that microsatellite instability and chromosome instability patterns are not exclusive, and they might coexist during the tumor progression. This pattern is also observed in primary colorectal tumors.*

5. Els cariotips dels tumors de còlon i recte amb inestabilitat de microsatèl·lits no són totalment estables, sinó que poden presentar desequilibris cromosòmics, alguns d'ells compartits amb els tumors amb inestabilitat cromosòmica.

*Microsatellite unstable colorectal tumors do not often show stable karyotypes, but they might display several chromosomal imbalances, some of them typical of microsatellite stable tumors.*

6. La inestabilitat cromosòmica implica una acceleració en la generació d'alteracions, tant numèriques com estructurals, en una cèl·lula tumoral.

*Chromosomal instability must be defined as the accelerated rate of numerical and structural chromosome alterations.*

7. L'assaig de cèl·lules binucleades (CBMN), clàssicament utilitzat per l'estudi de mutàgens, permet quantificar la inestabilitat cromosòmica numèrica mitjançant FISH i és un perfecte reflex de la dinàmica de les alteracions estructurals.

*Cytokinesis-block micronucleus assay, usually used to study genotoxicity, can reliably measure the rate of the numerical chromosome instability by means of FISH. In addition, it also allows to observe the dynamics of the chromosome rearrangements generation.*

8. La taxa d'inestabilitat cromosòmica numèrica és elevada i es manté constant després de la generació de subclons en una línia cel·lular de còlon típicament CIN. En aquesta mateixa línia cel·lular, els processos pels quals s'origina l'aneuploidia, o sigui la no-disjunció i la pèrdua anafàsica, estarien igualment representats.

*After clonal episodes, the high rate of numerical chromosome instability remains invariable in an archetypical CIN colon cancer cell line. Also in this cell line, the non-disjunction and chromosome loss events are equally involved in the origin of aneuploidy.*

9. En aquesta mateixa línia cel·lular, la generació d'alteracions cromosòmiques estructurals augmenta significativament després d'episodis de clonalitat i genera una elevada taxa d'inestabilitat cromosòmica estructural. *In vivo*, això es podria traduir en el paper potencial que jugarien les reorganitzacions cromosòmiques *de novo* no clonals en el procés de malignització.

*The rate of structural chromosome instability increases significantly after clonal episodes in this cell line. This fact suggests that de novo non clonal*

*chromosome aberrations might play an important role during in vivo tumorigenesis.*

10. Les estructures anòmales del nucli, o sigui els micronuclis, els ponts nucleoplasmàtics i les protuberàncies nuclears mantenen una relació proporcional amb la generació d'instabilitat cromosòmica.

*Micronuclei, nucleoplasmatic bridges and nuclear blebs are abnormal nuclear shapes which reflect the ongoing structural chromosome instability.*

En aquest punt, deixem a l'aire alguns dels interrogants que es desprenen de l'estudi de la instabilitat cromosòmica:

*At this point and after the conclusions of the present work, we would like to open essential questions for further research:*

1. Hi ha una instabilitat cromosòmica basal en les cèl·lules preneoplàsiques?  
*Is there a basal chromosomal instability in the preneoplastic cells?*
2. En el cas del càncer de còlon, és present ja la instabilitat cromosòmica en les cèl·lules de les criptes intestinals?  
*In the case of colon cancer, is the chromosomal instability already present in the intestinal crypts?*
3. L'aparent instabilitat cromosòmica en les etapes primerenques del tumor, pot fer pensar que aquesta instabilitat és més important per la iniciació que pel manteniment del càncer?  
*Does the early onset of chromosomal instability in cancers imply that this instability is more important for the initiation than the maintenance of the tumor?*
4. Quina és la velocitat de fixació de les alteracions cromosòmiques, tant numèriques com estructurals, en les cèl·lules d'un tumor CIN?  
*Which is the fixative rate of chromosomal aberrations, both numerical and structural, in a CIN tumor?*



5. Disfuncions en les proteïnes de la recombinació homòloga poden retardar la separació de les cromàtides implicades i afavorir la formació d'estructures anòmales del nucli que generarien la desestabilització cariotípica?

*Could disfunctions of homologous recombination proteins delay chromatide segregation increasing the formation of abnormal nuclear shapes?*

## **7. BIBLIOGRAFIA**

<<És un error capital teoritzar abans de tenir les dades. Sense adonar-se'n, un comença a deformar els fets per tal que s'adaptin a les teories, enlloc d'adaptar les teories als fets.>>

(Sir Arthur Conan Doyle, *Sherlok Holmes*)

---

## A

---

- Aaltonen L. A., Peltomaki P., Leach F. S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J. P., Jarvinen H., Powell S. M., Jen J., Hamilton S. R., and et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**: 812-6.
- Aaltonen L. A., Peltomaki P., Mecklin J. P., Jarvinen H., Jass J. R., Green J. S., Lynch H. T., Watson P., Tallqvist G., Juhola M., and et al. (1994). Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* **54**: 1645-8.
- Abdel-Rahman W. M., Katsura K., Rens W., Gorman P. A., Sheer D., Bicknell D., Bodmer W. F., Arends M. J., Wyllie A. H., and Edwards P. A. (2001). Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2538-43.
- Al-Mulla F., Keith W. N., Pickford I. R., Going J. J., and Birnie G. D. (1999). Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* **24**: 306-14.
- Astler V. B., and Collier F. A. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* **139**: 846-52.
- Atiye J., Wolf M., Kaur S., Monni O., Bohling T., Kivioja A., Tas E., Serra M., Tarkkanen M., and Knuutila S. (2005). Gene amplifications in osteosarcoma-CGH microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 158-63.

---

## B

---

- Baker S. J., Markowitz S., Fearon E. R., Willson J. K., and Vogelstein B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**: 912-5.
- Banik S. S. R., and Counter C. M. (2004). Characterization of Interactions between PinX1 and Human Telomerase Subunits hTERT and hTR. *J. Biol. Chem.* **279**: 51745-51748.
- Bardelli A., Cahill D. P., Lederer G., Speicher M. R., Kinzler K. W., Vogelstein B., and Lengauer C. (2001). Carcinogen-specific induction of genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5770-5.

- Barrett M. T., Sanchez C. A., Prevo L. J., Wong D. J., Galipeau P. C., Paulson T. G., Rabinovitch P. S., and Reid B. J. (1999). Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet* **22**: 106-9.
- Bassing C. H., Suh H., Ferguson D. O., Chua K. F., Manis J., Eckersdorff M., Gleason M., Bronson R., Lee C., and Alt F. W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**: 359-70.
- Beheshti B., Park P. C., Sweet J. M., Trachtenberg J., Jewett M. A., and Squire J. A. (2001). Evidence of chromosomal instability in prostate cancer determined by spectral karyotyping (SKY) and interphase fish analysis. *Neoplasia* **3**: 62-9.
- Bergoglio V., Pillaire M.-J., Lacroix-Triki M., Raynaud-Messina B., Canitrot Y., Bieth A., Gares M., Wright M., Delsol G., Loeb L. A., Cazaux C., and Hoffmann J.-S. (2002). Dereglated DNA Polymerase {beta} Induces Chromosome Instability and Tumorigenesis. *Cancer Res* **62**: 3511-3514.
- Boland C. R., Thibodeau S. N., Hamilton S. R., Sidransky D., Eshleman J. R., Burt R. W., Meltzer S. J., Rodriguez-Bigas M. A., Fodde R., Ranzani G. N., and Srivastava S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**: 5248-57.
- Bos J. L., Fearon E. R., Hamilton S. R., Verlaan-de Vries M., van Boom J. H., van der Eb A. J., and Vogelstein B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**: 293-7.
- Boyer J. C., Yamada N. A., Roques C. N., Hatch S. B., Riess K., and Farber R. A. (2002). Sequence dependent instability of mononucleotide microsatellites in cultured mismatch repair proficient and deficient mammalian cells. *Hum Mol Genet* **11**: 707-13.
- Boyle P., and Leon M. E. (2002). Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull* **64**: 1-25.
- Breivik J. (2005). The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Semin Cancer Biol* **15**: 51-60.
- Breivik J., and Gaudernack G. (1999). Carcinogenesis and natural selection: a new perspective to the genetics and epigenetics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res* **76**: 187-212.
- Bronner C. E., Baker S. M., Morrison P. T., Warren G., Smith L. G., Lescoe M. K., Kane M., Earabino C., Lipford J., Lindblom A., and et al. (1994). Mutation in the

DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **368**: 258-61.

Brown E. J., and Baltimore D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**: 615-28.



Cahill D. P., Kinzler K. W., Vogelstein B., and Lengauer C. (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **9**: M57-60.

Cahill D. P., Lengauer C., Yu J., Riggins G. J., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**: 300-3.

Calabrese P., Tavaré S., and Shibata D. (2004). Pretumor Progression: Clonal Evolution of Human Stem Cell Populations. *Am J Pathol* **164**: 1337-1346.

Camps J., Morales C., Prat E., Ribas M., Capellà G., Egozcue J., Peinado M. A., and Miró R. (2004a). Genetic evolution in colon cancer KM12 cells and metastatic derivatives. *Int J Cancer* **110**: 869-74.

Camps J., Mrasek K., Prat E., Weise A., Starke H., Egozcue J., Miró R., and Liehr T. (2004b). Molecular cytogenetic characterisation of the colorectal cancer cell line SW480. *Oncol Rep* **11**: 1215-8.

Camps J., Ponsa I., Ribas M., Prat E., Egozcue J., Peinado M. A., and Miró R. (2005). Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB J* **19**: 828-30.

Camps J., Armengol G., Del Rey J., Lozano J., Vauhkonen H., Prat E., Sumoy L., Knuutila S., and Miró R. (In revision). Genome-wide differences between microsatellite stable and microsatellite unstable colorectal tumors.

Camps J., Salaverria I., Garcia M. J., Prat E., Beà S., Pole J. C., Hernandez L., Del Rey J., Cigudosa J. C., Bernués M., Caldas C., Colomer D., Miró R., and Campo E. (Submitted). Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in archetypical mantle-cell lymphoma cell lines.

Carethers J. M., Chauhan D. P., Fink D., Nebel S., Bresalier R. S., Howell S. B., and Boland C. R. (1999). Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology* **117**: 123-31.

Carroll P. E., Okuda M., Horn H. F., Biddinger P., Stambrook P. J., Gleich L. L., Li Y. Q., Tarapore P., and Fukasawa K. (1999). Centrosome hyperamplification in

- human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* **18**: 1935-44.
- Carson C. T., Schwartz R. A., Stracker T. H., Lilley C. E., Lee D. V., and Weitzman M. D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J* **22**: 6610-20.
- Celeste A., Difilippantonio S., Difilippantonio M. J., Fernandez-Capetillo O., Pilch D. R., Sedelnikova O. A., Eckhaus M., Ried T., Bonner W. M., and Nussenzweig A. (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**: 371-83.
- Chadwick R. B., Jiang G. L., Bennington G. A., Yuan B., Johnson C. K., Stevens M. W., Niemann T. H., Peltomaki P., Huang S., and de la Chapelle A. (2000). Candidate tumor suppressor RIZ is frequently involved in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2662-7.
- Chakraverty R. K., and Hickson I. D. (1999). Defending genome integrity during DNA replication: a proposed role for RecQ family helicases. *Bioessays* **21**: 286-94.
- Chan G. K., Jablonski S. A., Starr D. A., Goldberg M. L., and Yen T. J. (2000). Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol* **2**: 944-7.
- Chin L., Artandi S. E., Shen Q., Tam A., Lee S. L., Gottlieb G. J., Greider C. W., and DePinho R. A. (1999). p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97**: 527-38.
- Chung D. C. (2000). The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119**: 854-65.
- Cormier R. T., Hong K. H., Halberg R. B., Hawkins T. L., Richardson P., Mulherkar R., Dove W. F., and Lander E. S. (1997). Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* **17**: 88-91.
- Counter C. M., Avilion A. A., LeFeuvre C. E., Stewart N. G., Greider C. W., Harley C. B., and Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**: 1921-9.

---

## D

- D'Andrea A. D., and Grompe M. (1997). Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* **90**: 1725-36.

- Daniels M. J., Wang Y., Lee M., and Venkitaraman A. R. (2004). Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* **306**: 876-9.
- Davalos A. R., and Campisi J. (2003). Bloom syndrome cells undergo p53-dependent apoptosis and delayed assembly of BRCA1 and NBS1 repair complexes at stalled replication forks. *J. Cell Biol.* **162**: 1197-1209.
- de Lange T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**: 532-40.
- de Lange T., Shiue L., Myers R. M., Cox D. R., Naylor S. L., Killery A. M., and Varmus H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* **10**: 518-27.
- Devilee P., Cleton-Jansen A. M., and Cornelisse C. J. (2001). Ever since Knudson. *Trends Genet* **17**: 569-73.
- DiSario J. A., Foutch P. G., Mai H. D., Pardy K., and Manne R. K. (1991). Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol* **86**: 941-5.
- Ditchfield C., Johnson V. L., Tighe A., Ellston R., Haworth C., Johnson T., Mortlock A., Keen N., and Taylor S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**: 267-80.
- Doxsey S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 688-98.
- du Manoir S., Kallioniemi O. P., Lichter P., Piper J., Benedetti P. A., Carothers A. D., Fantes J. A., Garcia-Sagredo J. M., Gerdes T., Giollant M., and et al. (1995). Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19**: 4-9.
- Duesberg P., Fabarius A., and Hehlmann R. (2004). Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* **56**: 65-81.
- Duesberg P., and Li R. (2003). Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2**: 202-10.
- Duesberg P., Rasnick D., Li R., Winters L., Rausch C., and Hehlmann R. (1999). How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res* **19**: 4887-906.
- Dukes (1932). The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology* **35**: 323.
- Dutrillaux B. (1995). Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. *Adv Cancer Res* **67**: 59-82.

Duval A., Gayet J., Zhou X. P., Iacopetta B., Thomas G., and Hamelin R. (1999). Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* **59**: 4213-5.

## E

---

Edgar B. A., and Orr-Weaver T. L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**: 297-306.

el-Rifai W., Larramendy M. L., Bjorkqvist A. M., Hemmer S., and Knuutila S. (1997). Optimization of comparative genomic hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides. *Lab Invest* **77**: 699-700.

Elsaleh H., Powell B., Soontrapornchai P., Joseph D., Gorla F., Spry N., and Iacopetta B. (2000). p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* **58**: 52-9.

## F

---

Fabarius A., Hehlmann R., and Duesberg P. H. (2003). Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet* **143**: 59-72.

Falck J., Petrini J. H., Williams B. R., Lukas J., and Bartek J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* **30**: 290-4.

Fang Y., Tsao C. C., Goodman B. K., Furumai R., Tirado C. A., Abraham R. T., and Wang X. F. (2004). ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background. *EMBO J* **23**: 3164-74.

Fearon E. R., Cho K. R., Nigro J. M., Kern S. E., Simons J. W., Ruppert J. M., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Thomas G., Kinzler K. W., and et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247**: 49-56.

Fearon E. R., and Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67.

Feinberg A. P., and Tycko B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**: 143-53.



- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**: 81-95.
- Fenech M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today* **7**: 1128-37.
- Fenech M., Bonassi S., Turner J., Lando C., Ceppi M., Chang W. P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Bigatti M. P., Bolognesi C., Cao J., De Luca G., Di Giorgio M., Ferguson L. R., Fucic A., Lima O. G., Hadjidekova V. V., Hrelia P., Jaworska A., Joksic G., Krishnaja A. P., Lee T. K., Martelli A., McKay M. J., Migliore L., Mirkova E., Muller W. U., Odagiri Y., Orsiere T., Scarfi M. R., Silva M. J., Sofuni T., Suralles J., Trenta G., Vorobtsova I., Vral A., and Zijno A. (2003a). Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res* **534**: 45-64.
- Fenech M., Chang W. P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., and Zeiger E. (2003b). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **534**: 65-75.
- Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Celeste A., Ward I., Romanienko P. J., Morales J. C., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R. D., Motoyama N., Carpenter P. B., Bonner W. M., Chen J., and Nussenzweig A. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* **4**: 993-7.
- Fishel R., Lescoe M. K., Rao M. R., Copeland N. G., Jenkins N. A., Garber J., Kane M., and Kolodner R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**: 1027-38.
- Futreal P. A., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., Rahman N., and Stratton M. R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**: 177-83.

## G

---

- Geng Y., and Weinberg R. A. (1993). Transforming growth factor beta effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10315-9.
- Georgiades I. B., Curtis L. J., Morris R. M., Bird C. C., and Wyllie A. H. (1999). Heterogeneity studies identify a subset of sporadic colorectal cancers without evidence for chromosomal or microsatellite instability. *Oncogene* **18**: 7933-40.
- German J. (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* **72**: 393-406.
- Gisselsson D., Bjork J., Hoglund M., Mertens F., Dal Cin P., Akerman M., and Mandahl N. (2001a). Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am J Pathol* **158**: 199-206.
- Gisselsson D., and Hoglund M. (2005). Connecting mitotic instability and chromosome aberrations in cancer--can telomeres bridge the gap? *Semin Cancer Biol* **15**: 13-23.
- Gisselsson D., Jonson T., Petersen A., Strombeck B., Dal Cin P., Hoglund M., Mitelman F., Mertens F., and Mandahl N. (2001b). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12683-8.
- Gisselsson D., Pettersson L., Hoglund M., Heidenblad M., Gorunova L., Wiegant J., Mertens F., Dal Cin P., Mitelman F., and Mandahl N. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5357-62.
- Goel A., Arnold C. N., Niedzwiecki D., Chang D. K., Ricciardiello L., Carethers J. M., Dowell J. M., Wasserman L., Compton C., Mayer R. J., Bertagnolli M. M., and Boland C. R. (2003). Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* **63**: 1608-14.
- Goldberg Z., Vogt Sionov R., Berger M., Zwang Y., Perets R., Van Etten R. A., Oren M., Taya Y., and Haupt Y. (2002). Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J* **21**: 3715-27.
- Goldman R., and Shields P. G. (2003). Food mutagens. *J Nutr* **133 Suppl 3**: 965S-973S.
- Gonzalez-Garcia I., Moreno V., Navarro M., Marti-Rague J., Marcuello E., Benasco C., Campos O., Capella G., and Peinado M. A. (2000). Standardized approach for

- microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **92**: 544-9.
- Gorringe K. L., Chin S. F., Pharoah P., Staines J. M., Oliveira C., Edwards P. A., and Caldas C. (2005). Evidence that both genetic instability and selection contribute to the accumulation of chromosome alterations in cancer. *Carcinogenesis* **26**: 923-30.
- Grady W. M., Myeroff L. L., Swinler S. E., Rajput A., Thiagalingam S., Lutterbaugh J. D., Neumann A., Brattain M. G., Chang J., Kim S. J., Kinzler K. W., Vogelstein B., Willson J. K., and Markowitz S. (1999). Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* **59**: 320-4.
- Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., and Harris C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**: 4855-78.

---

## H

- Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R. L., Brooks M. W., and Weinberg R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464-8.
- Haigis K. M., Caya J. G., Reichelderfer M., and Dove W. F. (2002). Intestinal adenomas can develop with a stable karyotype and stable microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8927-31.
- Halford S., Sasieni P., Rowan A., Wasan H., Bodmer W., Talbot I., Hawkins N., Ward R., and Tomlinson I. (2002). Low-level microsatellite instability occurs in most colorectal cancers and is a nonrandomly distributed quantitative trait. *Cancer Res* **62**: 53-7.
- Hanks S., Coleman K., Reid S., Plaja A., Firth H., Fitzpatrick D., Kidd A., Mehes K., Nash R., Robin N., Shannon N., Tolmie J., Swansbury J., Irrthum A., Douglas J., and Rahman N. (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* **36**: 1159-61.
- He T. C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L. T., Morin P. J., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509-12.
- Hecht S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1194-210.

- Heim S., and Mitelman F. (1995). "Cancer Cytogenetics," Wiley-Liss, New York.
- Hellman A., Zlotorynski E., Scherer S. W., Cheung J., Vincent J. B., Smith D. I., Trakhtenbrot L., and Kerem B. (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* **1**: 89-97.
- Hermesen M., Postma C., Baak J., Weiss M., Rapallo A., Sciutto A., Roemen G., Arends J. W., Williams R., Giaretti W., De Goeij A., and Meijer G. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* **123**: 1109-19.
- Hernando E., Nahle Z., Juan G., Diaz-Rodriguez E., Alaminos M., Hemann M., Michel L., Mittal V., Gerald W., Benezra R., Lowe S. W., and Cordon-Cardo C. (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* **430**: 797-802.
- Hieter P., and Griffiths T. (1999). Polyploidy--more is more or less. *Science* **285**: 210-1.
- Hirao A., Cheung A., Duncan G., Girard P. M., Elia A. J., Wakeham A., Okada H., Sarkissian T., Wong J. A., Sakai T., De Stanchina E., Bristow R. G., Suda T., Lowe S. W., Jeggo P. A., Elledge S. J., and Mak T. W. (2002). Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* **22**: 6521-32.
- Hoeijmakers J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-74.
- Hoffelder D. R., Luo L., Burke N. A., Watkins S. C., Gollin S. M., and Saunders W. S. (2004). Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* **112**: 389-97.
- Hoglund M., Gisselsson D., Hansen G. B., Sall T., Mitelman F., and Nilbert M. (2002). Dissecting karyotypic patterns in colorectal tumors: two distinct but overlapping pathways in the adenoma-carcinoma transition. *Cancer Res* **62**: 5939-46.
- Hoosein N. M., McKnight M. K., Levine A. E., Mulder K. M., Childress K. E., Brattain D. E., and Brattain M. G. (1989). Differential sensitivity of subclasses of human colon carcinoma cell lines to the growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta 1. *Exp Cell Res* **181**: 442-53.
- Houchmandzadeh B., Marko J. F., Chatenay D., and Libchaber A. (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol* **139**: 1-12.
- Houlston R. S., and Tomlinson I. P. (2001). Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology* **121**: 282-301.
- Huang J., Papadopoulos N., McKinley A. J., Farrington S. M., Curtis L. J., Wyllie A. H., Zheng S., Willson J. K., Markowitz S. D., Morin P., Kinzler K. W., Vogelstein B.,

- and Dunlop M. G. (1996). APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9049-54.
- Huang J., Wei W., Zhang J., Liu G., Bignell G. R., Stratton M. R., Futreal P. A., Wooster R., Jones K. W., and Shapero M. H. (2004). Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* **1**: 287-99.
- Hutter R. V., and Sobin L. H. (1986). A universal staging system for cancer of the colon and rectum. Let there be light. *Arch Pathol Lab Med* **110**: 367-8.
- Hyman E., Kauraniemi P., Hautaniemi S., Wolf M., Mousses S., Rozenblum E., Ringner M., Sauter G., Monni O., Elkahlon A., Kallioniemi O. P., and Kallioniemi A. (2002). Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* **62**: 6240-5.
- 

- Ionov Y., Peinado M. A., Malkhosyan S., Shibata D., and Perucho M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**: 558-61.
- Ishkanian A. S., Malloff C. A., Watson S. K., DeLeeuw R. J., Chi B., Coe B. P., Snijders A., Albertson D. G., Pinkel D., Marra M. A., Ling V., MacAulay C., and Lam W. L. (2004). A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* **36**: 299-303.
- 

- Jarvinen A. K., Hautaniemi S., Edgren H., Auvinen P., Saarela J., Kallioniemi O. P., and Monni O. (2004). Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics* **83**: 1164-8.
- Jass J. R., Biden K. G., Cummings M. C., Simms L. A., Walsh M., Schoch E., Meltzer S. J., Wright C., Searle J., Young J., and Leggett B. A. (1999). Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* **52**: 455-60.
- Jemal A., Thomas A., Murray T., and Thun M. (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **52**: 23-47.

- Jemal A., Tiwari R. C., Murray T., Ghafoor A., Samuels A., Ward E., Feuer E. J., and Thun M. J. (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* **54**: 8-29.
- Jiang Y., Zhang Y., Lees E., and Seghezzi W. (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene* **22**: 8293-301.
- Johansson B., Heim S., Mandahl N., Mertens F., and Mitelman F. (1993). Trisomy 7 in nonneoplastic cells. *Genes Chromosomes Cancer* **6**: 199-205.
- Jones A. M., Douglas E. J., Halford S. E., Fiegler H., Gorman P. A., Roylance R. R., Carter N. P., and Tomlinson I. P. (2005). Array-CGH analysis of microsatellite-stable, near-diploid bowel cancers and comparison with other types of colorectal carcinoma. *Oncogene* **24**: 118-29.

## K

---

- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., and Pinkel D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818-21.
- Kallioniemi O. P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F. M., Gray J. W., and Pinkel D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **10**: 231-43.
- Kallioniemi O. P., Wagner U., Kononen J., and Sauter G. (2001). Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* **10**: 657-62.
- Kane M. F., Loda M., Gaida G. M., Lipman J., Mishra R., Goldman H., Jessup J. M., and Kolodner R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* **57**: 808-11.
- Kaneko Y., and Knudson A. G. (2000). Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **29**: 89-95.
- Kargman S. L., O'Neill G. P., Vickers P. J., Evans J. F., Mancini J. A., and Jothy S. (1995). Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* **55**: 2556-9.
- Karran P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 144-50.

- Kemp Z., Thirlwell C., Sieber O., Silver A., and Tomlinson I. (2004). An update on the genetics of colorectal cancer. *Hum Mol Genet* **13 Spec No 2**: R177-85.
- Khanna K. K., and Jackson S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**: 247-54.
- Khong H. T., and Restifo N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* **3**: 999-1005.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., and Shay J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-5.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**: 761, 763.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* **280**: 1036-7.
- Kishi S., and Lu K. P. (2002). A critical role for Pin2/TRF1 in ATM-dependent regulation. Inhibition of Pin2/TRF1 function complements telomere shortening, radiosensitivity, and the G(2)/M checkpoint defect of ataxia-telangiectasia cells. *J Biol Chem* **277**: 7420-9.
- Knosel T., Schluns K., Stein U., Schwabe H., Schlag P. M., Dietel M., and Petersen I. (2004). Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia* **6**: 23-8.
- Knudson A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820-3.
- Knudson A. G., Jr. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* **45**: 1437-43.
- Kobayashi J., Antoccia A., Tauchi H., Matsuura S., and Komatsu K. (2004). NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **3**: 855-61.
- Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Tanaka K., Muraoka M., Onda A., Okumura Y., Kishi N., Iwama T., Mori T., Koike M., Ushio K., Chiba M., Nomizu S., Konishi F., Utsunomiya J., and Miyaki M. (1996). Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* **111**: 307-17.
- Kurz E. U., and Lees-Miller S. P. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**: 889-900.



- Laken S. J., Petersen G. M., Gruber S. B., Oddoux C., Ostrer H., Giardiello F. M., Hamilton S. R., Hampel H., Markowitz A., Klimstra D., Jhanwar S., Winawer S., Offit K., Luce M. C., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1997). Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* **17**: 79-83.
- Larramendy M. L., El-Rifai W., and Knuutila S. (1998). Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* **31**: 174-9.
- Lengauer C., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**: 623-7.
- Lengauer C., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**: 643-9.
- Levine D. S., Sanchez C. A., Rabinovitch P. S., and Reid B. J. (1991). Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6427-31.
- Levinson G., and Gutman G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**: 203-21.
- Lewin B. (1997). "Genes VI," Oxford University Press, Oxford.
- Li F. P., Fraumeni J. F., Jr., Mulvihill J. J., Blattner W. A., Dreyfus M. G., Tucker M. A., and Miller R. W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* **48**: 5358-62.
- Lim G., Karaskova J., Beheshti B., Vukovic B., Bayani J., Selvarajah S., Watson S. K., Lam W. L., Zielenska M., and Squire J. A. (2005). An integrated mBAND and submegabase resolution tiling set (SMRT) CGH array analysis of focal amplification, microdeletions, and ladder structures consistent with breakage-fusion-bridge cycle events in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 392-403.
- Loeb K. R., and Loeb L. A. (1999). Genetic instability and the mutator phenotype. Studies in ulcerative colitis. *Am J Pathol* **154**: 1621-6.
- Loeb L. A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* **51**: 3075-9.
- Lothe R. A., Peltomaki P., Meling G. I., Aaltonen L. A., Nystrom-Lahti M., Pylkkanen L., Heimdal K., Andersen T. I., Moller P., Rognum T. O., and et al. (1993).



Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* **53**: 5849-52.



- Mahlamaki E. H., Kauraniemi P., Monni O., Wolf M., Hautaniemi S., and Kallioniemi A. (2004). High-resolution genomic and expression profiling reveals 105 putative amplification target genes in pancreatic cancer. *Neoplasia* **6**: 432-9.
- Malkhosyan S., Rampino N., Yamamoto H., and Perucho M. (1996). Frameshift mutator mutations. *Nature* **382**: 499-500.
- Malkin D., Li F. P., Strong L. C., Fraumeni J. F., Jr., Nelson C. E., Kim D. H., Kassel J., Gryka M. A., Bischoff F. Z., Tainsky M. A., and et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**: 1233-8.
- Margolis R. L., Lohez O. D., and Andreassen P. R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem* **88**: 673-83.
- Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R. S., Zborowska E., Kinzler K. W., Vogelstein B., and et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**: 1336-8.
- Markowitz S. D., and Roberts A. B. (1996). Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**: 93-102.
- Marx J. (2002). Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* **297**: 544-6.
- Maser R. S., and DePinho R. A. (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* **297**: 565-9.
- Massague J. (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* **85**: 947-50.
- Matsumura Y., and Ananthaswamy H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**: 298-308.
- Mazumder S., DuPree E. L., and Almasan A. (2004). A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 65-75.
- McClintock B. (1938). The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphase. *Mo Agric Exp Station Res Bull* **290**: 1-48.

- Michel L., Diaz-Rodriguez E., Narayan G., Hernando E., Murty V. V. V. S., and Benezra R. (2004). Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *PNAS* **101**: 4459-4464.
- Michel L. S., Liberal V., Chatterjee A., Kirchwegger R., Pasche B., Gerald W., Dobles M., Sorger P. K., Murty V. V., and Benezra R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**: 355-9.
- Miller O. J., and Therman E. (2001). "Human Chromosomes," Springer.
- Mitelman F., Johansson B., Mandahl N., and Mertens F. (1997). Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **95**: 1-8.
- Mitelman F., Johansson B., and Mertens F. (1994). Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer, Wiley-Liss Publishing, New York.
- Mitelman F., Johansson B., and Mertens F. (2004). Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* **36**: 331-4.
- Miyaki M., Iijima T., Kimura J., Yasuno M., Mori T., Hayashi Y., Koike M., Shitara N., Iwama T., and Kuroki T. (1999a). Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* **59**: 4506-9.
- Miyaki M., Iijima T., Konishi M., Sakai K., Ishii A., Yasuno M., Hishima T., Koike M., Shitara N., Iwama T., Utsunomiya J., Kuroki T., and Mori T. (1999b). Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* **18**: 3098-103.
- Modrich P. (1994). Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* **266**: 1959-60.
- Monni O., Barlund M., Mousses S., Kononen J., Sauter G., Heiskanen M., Paavola P., Avela K., Chen Y., Bittner M. L., and Kallioniemi A. (2001). Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5711-6.
- Morales C. P., Souza R. F., and Spechler S. J. (2002). Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet* **360**: 1587-9.
- Morikawa K., Walker S. M., Nakajima M., Pathak S., Jessup J. M., and Fidler I. J. (1988). Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* **48**: 6863-71.
- Mousses S., Kallioniemi A., Kauraniemi P., Elkhouloun A., and Kallioniemi O. P. (2001). Clinical and functional target validation using tissue and

cell microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**: 97-101.

Muleris M., Salmon R. J., and Dutrillaux B. (1988). Existence of two distinct processes of chromosomal evolution in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **32**: 43-50.

Musio A., Montagna C., Zambroni D., Indino E., Barbieri O., Citti L., Villa A., Ried T., and Vezioni P. (2003). Inhibition of BUB1 results in genomic instability and anchorage-independent growth of normal human fibroblasts. *Cancer Res* **63**: 2855-63.

---

## N

Nakao K., Mehta K. R., Fridlyand J., Moore D. H., Jain A. N., Lafuente A., Wiencke J. W., Terdiman J. P., and Waldman F. M. (2004). High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis* **25**: 1345-57.

Nakao K., Shibusawa M., Ishihara A., Yoshizawa H., Tsunoda A., Kusano M., Kurose A., Makita T., and Sasaki K. (2001). Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy. *Cancer* **91**: 721-6.

Nietzel A., Rocchi M., Starke H., Heller A., Fiedler W., Wlodarska I., Loncarevic I. F., Beensen V., Claussen U., and Liehr T. (2001). A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* **108**: 199-204.

Nigg E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**: 815-25.

Nowak M. A., Komarova N. L., Sengupta A., Jallepalli P. V., Shih Ie M., Vogelstein B., and Lengauer C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16226-31.

Nowell P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-8.

---

## O

O'Hagan R. C., Chang S., Maser R. S., Mohan R., Artandi S. E., Chin L., and DePinho R. A. (2002). Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell* **2**: 149-55.

# P

---

- Papadopoulos N., Nicolaides N. C., Wei Y. F., Ruben S. M., Carter K. C., Rosen C. A., Haseltine W. A., Fleischmann R. D., Fraser C. M., Adams M. D., and et al. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* **263**: 1625-9.
- Parada L. A., Maranon A., Hallen M., Tranberg K. G., Stenram U., Bardi G., and Johansson B. (1999). Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between primary and metastatic colon carcinomas. *Clin Exp Metastasis* **17**: 471-9.
- Parsons R., Myeroff L. L., Liu B., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* **55**: 5548-50.
- Pasche B., Kaklamani V., Hou N., Young T., Rademaker A., Peterlongo P., Ellis N., Offit K., Caldes T., Reiss M., and Zheng T. (2004). TGFBR1\*6A and cancer: a meta-analysis of 12 case-control studies. *J Clin Oncol* **22**: 756-8.
- Peltomaki P. (2001). DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* **488**: 77-85.
- Peltomaki P., Lothe R. A., Aaltonen L. A., Pylkkanen L., Nystrom-Lahti M., Seruca R., David L., Holm R., Ryberg D., Haugen A., and et al. (1993). Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* **53**: 5853-5.
- Petrini J. H., and Stracker T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* **13**: 458-62.
- Pihan G. A., Purohit A., Wallace J., Knecht H., Woda B., Quesenberry P., and Doxsey S. J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**: 3974-85.
- Pinkel D., Segraves R., Sudar D., Clark S., Poole I., Kowbel D., Collins C., Kuo W. L., Chen C., Zhai Y., Dairkee S. H., Ljung B. M., Gray J. W., and Albertson D. G. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* **20**: 207-11.
- Pollack J. R., Perou C. M., Alizadeh A. A., Eisen M. B., Pergamenschikov A., Williams C. F., Jeffrey S. S., Botstein D., and Brown P. O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* **23**: 41-6.

## R

- Rajagopalan H., Nowak M. A., Vogelstein B., and Lengauer C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 695-701.
- Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J. C., and Perucho M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**: 967-9.
- Ravid K., Lu J., Zimmert J. M., and Jones M. R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* **190**: 7-20.
- Remvikos Y., Muleris M., Vielh P., Salmon R. J., and Dutrillaux B. (1988). DNA content and genetic evolution of human colorectal adenocarcinoma. A study by flow cytometry and cytogenetic analysis. *Int J Cancer* **42**: 539-43.
- Reshmi S. C., Saunders W. S., Kudla D. M., Ragin C. R., and Gollin S. M. (2004). Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **41**: 38-46.
- Rex D. K., Lehman G. A., Hawes R. H., Ulbright T. M., and Smith J. J. (1991). Screening colonoscopy in asymptomatic average-risk persons with negative fecal occult blood tests. *Gastroenterology* **100**: 64-7.
- Ribas M., Masramon L., Aiza G., Capellà G., Miró R., and Peinado M. A. (2003). The structural nature of chromosomal instability in colon cancer cells. *FASEB J* **17**: 289-91.
- Ried T., Heselmeyer-Haddad K., Blegen H., Schrock E., and Auer G. (1999). Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* **25**: 195-204.
- Ried T., Knutzen R., Steinbeck R., Blegen H., Schrock E., Heselmeyer K., du Manoir S., and Auer G. (1996). Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **15**: 234-45.
- Riggins G. J., Thiagalingam S., Rozenblum E., Weinstein C. L., Kern S. E., Hamilton S. R., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1996). Mad-related genes in the human. *Nat Genet* **13**: 347-9.
- Risques R. A., Moreno V., Ribas M., Marcuello E., Capellà G., and Peinado M. A. (2003a). Genetic pathways and genome-wide determinants of clinical outcome in colorectal cancer. *Cancer Res* **63**: 7206-14.

- Risques R. A., Ribas M., and Peinado M. A. (2003b). Assessment of cumulated genetic alterations in colorectal cancer. *Histol Histopathol* **18**: 1289-1299.
- Roschke A. V., Stover K., Tonon G., Schaffer A. A., and Kirsch I. R. (2002). Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability. *Neoplasia* **4**: 19-31.
- Rudolph K. L., Millard M., Bosenberg M. W., and DePinho R. A. (2001). Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* **28**: 155-9.

---

## S

- Samowitz W. S., Powers M. D., Spirio L. N., Nollet F., van Roy F., and Slattery M. L. (1999). Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* **59**: 1442-4.
- Sandberg A. A. (1990). "The chromosomes in human cancer and leukemia," Elsevier Science Publishing, New York.
- Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., and Ried T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273**: 494-7.
- Schwartz S., Jr., Yamamoto H., Navarro M., Maestro M., Reventos J., and Perucho M. (1999). Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* **59**: 2995-3002.
- Shih I. M., Wang T. L., Traverso G., Romans K., Hamilton S. R., Ben-Sasson S., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (2001a). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2640-5.
- Shih I. M., Zhou W., Goodman S. N., Lengauer C., Kinzler K. W., and Vogelstein B. (2001b). Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **61**: 818-22.
- Shiloh Y. (1995). Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery. *Eur J Hum Genet* **3**: 116-38.
- Shin H. J., Baek K. H., Jeon A. H., Park M. T., Lee S. J., Kang C. M., Lee H. S., Yoo S. H., Chung D. H., Sung Y. C., McKeon F., and Lee C. W. (2003). Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell* **4**: 483-97.

- Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., and Ben-Ze'ev A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5522-7.
- Siegel P. M., and Massague J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 807-21.
- Souza R. F., Appel R., Yin J., Wang S., Smolinski K. N., Abraham J. M., Zou T. T., Shi Y. Q., Lei J., Cottrell J., Cymes K., Biden K., Simms L., Leggett B., Lynch P. M., Frazier M., Powell S. M., Harpaz N., Sugimura H., Young J., and Meltzer S. J. (1996). Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* **14**: 255-7.
- Speicher M. R., Gwyn Ballard S., and Ward D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**: 368-75.
- Steinbeck R. G., Heselmeyer K. M., Neugebauer W. F., Falkmer U. G., and Auer G. U. (1993). DNA ploidy in human colorectal adenocarcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* **15**: 187-94.
- Stewenius Y., Gorunova L., Jonson T., Larsson N., Hoglund M., Mandahl N., Mertens F., Mitelman F., and Gisselsson D. (2005). Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5541-6.
- Storchova Z., and Pellman D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 45-54.

## T

---

- Takagi Y., Kohmura H., Futamura M., Kida H., Tanemura H., Shimokawa K., and Saji S. (1996). Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* **111**: 1369-72.
- Takai H., Naka K., Okada Y., Watanabe M., Harada N., Saito S., Anderson C. W., Appella E., Nakanishi M., Suzuki H., Nagashima K., Sawa H., Ikeda K., and Motoyama N. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* **21**: 5195-205.
- Taylor S. S., Ha E., and McKeon F. (1998). The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochores Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. *J. Cell Biol.* **142**: 1-11.

- Therman E., Trunca C., Kuhn E. M., and Sarto G. E. (1986). Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Hum Genet* **72**: 191-5.
- Thibodeau S. N., Bren G., and Schaid D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**: 816-9.
- Thomas P., Umegaki K., and Fenech M. (2003). Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* **18**: 187-94.
- Tighe A., Johnson V. L., Albertella M., and Taylor S. S. (2001). Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep* **2**: 609-14.
- Toledo F., Le Roscouet D., Buttin G., and Debatisse M. (1992). Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J* **11**: 2665-73.
- Tomlinson I., and Bodmer W. (1999). Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med* **5**: 11-2.
- Traverso G., Bettgowda C., Kraus J., Speicher M. R., Kinzler K. W., Vogelstein B., and Lengauer C. (2003). Hyper-recombination and genetic instability in BLM-deficient epithelial cells. *Cancer Res* **63**: 8578-81.
- Tsao J. L., Tavare S., Salovaara R., Jass J. R., Aaltonen L. A., and Shibata D. (1999). Colorectal adenoma and cancer divergence. Evidence of multilineage progression. *Am J Pathol* **154**: 1815-24.



- Uhrig S., Schuffenhauer S., Fauth C., Wirtz A., Daumer-Haas C., Apacik C., Cohen M., Muller-Navia J., Cremer T., Murken J., and Speicher M. R. (1999). Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* **65**: 448-62.
- Uppender M. B., Habermann J. K., McShane L. M., Korn E. L., Barrett J. C., Difilippantonio M. J., and Ried T. (2004). Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* **64**: 6941-9.



---

## V

---

- Veigl M. L., Kasturi L., Olechnowicz J., Ma A. H., Lutterbaugh J. D., Periyasamy S., Li G. M., Drummond J., Modrich P. L., Sedwick W. D., and Markowitz S. D. (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8698-702.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., and Bos J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.

---

## W

---

- Wang H., Hu X., Ding X., Dou Z., Yang Z., Shaw A. W., Teng M., Cleveland D. W., Goldberg M. L., Niu L., and Yao X. (2004). Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling. *J Biol Chem* **279**: 54590-8.
- Weise A., Heller A., Starke H., Mrasek K., Kuechler A., Pool-Zobel B. L., Claussen U., and Liehr T. (2003). Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) - a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res* **103**: 34-9.
- Wilhelm M., Veltman J. A., Olshen A. B., Jain A. N., Moore D. H., Presti J. C., Jr., Kovacs G., and Waldman F. M. (2002). Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res* **62**: 957-60.
- Woerner S. M., Benner A., Sutter C., Schiller M., Yuan Y. P., Keller G., Bork P., Doeberitz M. K., and Gebert J. F. (2003). Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene* **22**: 2226-35.
- Wong K. K., Chang S., Weiler S. R., Ganesan S., Chaudhuri J., Zhu C., Artandi S. E., Rudolph K. L., Gottlieb G. J., Chin L., Alt F. W., and DePinho R. A. (2000). Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nat Genet* **26**: 85-8.
- Wong N. A., and Pignatelli M. (2002). Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* **160**: 389-401.

Wright W. E., Pereira-Smith O. M., and Shay J. W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* **9**: 3088-92.

## Y

---

Yeatman T. J., Cher M. L., Mao W., Wloch M., and Tedesco T. (1996). Identification of genetic alterations associated with the process of human experimental colon cancer liver metastasis in the nude mouse. *Clin Exp Metastasis* **14**: 246-52.

Yu H. (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 706-14.

Yuen S. T., Chan T. L., Ho J. W., Chan A. S., Chung L. P., Lam P. W., Tse C. W., Wyllie A. H., and Leung S. Y. (2002). Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* **21**: 7585-92.

## Z

---

Zhang X., Mar V., Zhou W., Harrington L., and Robinson M. O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* **13**: 2388-99.

Zhou H., Kuang J., Zhong L., Kuo W. L., Gray J. W., Sahin A., Brinkley B. R., and Sen S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**: 189-93.

Zhu J., Abbruzzese J. L., Izzo J., Hittelman W. N., and Li D. (2005). AURKA amplification, chromosome instability, and centrosome abnormality in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet* **159**: 10-7.

Zimonjic D., Brooks M. W., Popescu N., Weinberg R. A., and Hahn W. C. (2001). Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *Cancer Res* **61**: 8838-44.

---

## *Agraiments*

---

Personalment, em resulta molt emotiu poder dedicar unes línies d'aquesta tesi a les persones que m'han empès dia rere dia per tal de tirar endavant aquesta etapa de la meva vida.

Honestament, penso que per a dur a terme una tesi doctoral és bàsic creure en la teva línia de recerca i, d'igual importància, en les persones que t'envolten. T'ha d'apassionar la teva feina. Aquesta passió qui l'ha (o hauria) de començar a transmetre és la persona que et dirigeix la tesi doctoral. En aquest sentit, mai seran prou les paraules d'orgull que em mereix la meva directora, la Dr. Rosa Miró, per brindar-me l'oportunitat d'investigar, però sobretot per transmetre'm aquesta passió per dedicar hores i més hores a un hipotètic objectiu. T'agraeixo cada moment que hem passat plegats treballant perquè considero que sempre he après, i molt especialment t'agraeixo les estones que hem estat "simplement" parlant de ciència. I per cert, com a persona... senzillament meravellosa. Moltíssimes gràcies també pel pròleg.

Com he dit, les persones que t'envolten el dia a dia, o sigui les més pròximes, són l'altra peça fonamental per poder assolir els teus objectius a la vida. Professionalment, considero que el treball en grup és la clau per a qualsevol èxit. En aquest sentit, m'agradaria agrair molt personalment als membres del grup aquesta pinya que sempre he intentat fomentar. Una pinya que només s'aconsegueix quan pots comptar amb persones honestes i transparents. Amb l'Esther hem passat innumbrables moments junts, alguns de molt divertits, i tant personal com professionalment, m'agradaria destacar i agrair-li el seu optimisme, humilitat i la seva extrema dedicació.

De l'Imma admiro el seu enorme rigor metodològic, quasi científic, en qualsevol detall de la seva vida. M'encanta veure't feliç, t'ho mereixes molt. Al Javi m'agradaria reconèixer-li aquest gran cor que amaga una persona completament desenfadada i molt alegre. Sempre treballador, genera una gran confiança saber que es pot comptar amb tu. No deixem que mai es trenqui aquesta pinya, per més quilòmetres que ens separin.

Sense cap mena de dubte, l'Ignasi ha representat més que un company, tot un gran amic. És una persona humil i noble a la qual li agraeixo amb el cor a la mà tots els moments que hem compartit, la seva gran confiança i totes les xerrades, tant personals com professionals. Moltíssimes gràcies, tiet. Al Pere, una persona que també superaria el llistó de company de laboratori, amb el qual, tot i el poc temps que fa que el tenim entre nosaltres, transmet un *feeling* especial. Moltíssimes gràcies també a tu per tot el que saps i per tot el que ja n'he après. Estic segur que vosaltres dos sempre hi sereu.

Professionalment, m'agradaria tenir un petit reconeixement pel grup de professors que sempre han estat interessats en l'evolució i transcurs de la tesi, i per saber que podia comptar amb ells en qualsevol moment. A la Montserrat Garcia, al Jordi Benet i a la Joaquina Navarro, a la Carme Fuster, a la Cristina Templado, a l'Anna Genescà, al Josep Egozcue i a la M<sup>a</sup> Rosa Caballín, moltes gràcies a tots. També a l'Ana Utrabo, per la seva feina i paciència.

Quan jo vaig començar, juntament amb l'Aïda, la Monste, la Cristina H., la Cristina G, i l'Ignasi, van haver-hi persones que em van marcar especialment. L'Àngels, qui sempre surt a l'apartat d'agraïments dels articles per temes tècnics, hauria de saber que són molts d'altres aspectes dels quals també n'estic absolutament agraït. Tinc moltes ganes d'agrair-li especialment la seva paciència, la seva didàctica i la seva cultura. Pensava que d'en Sergio, qui ara no sé ni on deu estar, sempre en tenia alguna cosa per aprendre. A la Mercè li donaria les gràcies pels seus consells, bons o dolents, sempre li agradava donar-me'n. A la M<sup>a</sup> Àngels sempre li agrairé l'energia i l'empenta que transmetia, també el seu optimisme i els seus consells. La Rosana és una de les altres persones de qui sempre en guardaré un record. És ella qui s'emportaria el premi a la companya més optimista, i amb molta raó. La Maria va ser, i encara és, una caixa de sabiesa. Li agraeixo les sobretauls, i els seus punts de vista, de tot. És extrovertida i animada, capaç d'engrescar al més tímid del laboratori.

Dels coetanis durant aquests quasi sis anys, m'agradaria molt agrair el gran companyerisme de la Montse C. i la Núria A., amb les quals vaig començar la carrera de biologia i ja són molts els anys, moments i sopars que hem compartit. La Bea, xerraire i riallera, sempre disposada a ajudar-te. Molt interessant també ha estat compartir un temps amb la Mònica, una persona molt senzilla i treballadora, de la qual n'hi ha molt per aprendre. A la resta de companys de tercer cicle, per tot el que ens uneix, també m'agradaria recordar-me de vosaltres: el Jorge, l'Anna, la Yolanda, la

Raquel, l'Elsa, l'Albert, el Pedro, la Meri i la Gemma. I als que vénen i als que marxen, perquè sempre podrem dir que vam coincidir.

A la gent de l'IBB, i molt especialment a la Marta M, la Laura L, la Laia, la Núria, sense deixar-me la Paqui, moltes gràcies per fer un únic camí. Sempre que volgueu podeu comptar amb mi.

No puc deixar de nombrar les persones amb les quals hem col·laborat professionalment i altrament també m'han ajudat personalment. M'agradaria agrair al Miquel A. Peinado la seva dedicació en cada una de les coses que li he demanat, i també tots els moments que he pogut gaudir de la seva gran sabiesa entorn de la ciència. A l'Elías Campo, m'agradaria també agrair-li la possibilitat que m'ha donat d'intercanviar en diferents ocasions coneixements de genètica de neoplàsies hematològiques. Al Gyula Kovacs (Heidelberg, Alemanya) i al Sakari Knuutila (Helsinki, Finlàndia) m'agradaria agrair-los el seu calorós acolliment i el bon record que en tenen de la meva estada (potser tant bo com el que en tinc jo). A la Marga i a l'Alberto voldria agrair-los la seva precisa disponibilitat i ganes de fer ciència que tenen. Moltíssimes gràcies a tots vosaltres i a aquells amb qui més indirectament també hem coincidit.

Als amics, perquè sempre hi han estat. Al Jaume i al Ricard, per l'infinitat de bons moments que hem passat. I a les altres persones amb les quals he compartit moments personals durant aquests anys.

Finalment, em queda destacar el gran motor d'aquest enginyer engrenatge. La família. No hi ha prou paraules per expressar els meus sentiments. El dia a dia i les més grans petiteses m'agradaria que fossin suficient per demostrar com d'orgullós estic dels "meus". Milions de gràcies als meus pares per facilitar-me sempre el camí, per sempre estar al meu costat i confiar en mi, en les meves possibilitats i en les meves decisions. Gran part d'aquesta tesi és gràcies a vosaltres. També a tu Marta, sempre a l'ombra, però mai lluny de mi: un estel a seguir. I al teu Jordi, o dit d'una altra manera, al meu cunyat.

A tu Montse, per tot. Per la teva impecable i imprescindible existència. Per guardar-me sempre en el teu cor, fins i tot en els moments que em tenies més lluny. Ets la verdadera força que impulsa la meua vida. Ets genial, per sempre.

Jordi Camps Polo