

Genomische analyse van mens en muis met array 'comparative genomic hybridization'

Auteur A.M. Snijders

Trefwoorden array 'comparative genomic hybridization', plaveiselcelcarcinoom

Samenvatting

Op 3 december 2004 promoveerde drs. A.M. Snijders aan de Universiteit Utrecht op het promotieonderzoek 'Human and mouse genome analysing using array comparative genomic

hybridization'. Hij deed dit onder begeleiding van de promotoren prof. dr. P.J. van Diest en prof. dr. D.G. Albertson. Hieronder staan de belangrijkste bevindingen van het proefschrift weergegeven.

(*Ned Tijdschr Oncol* 2005;2:162-4)

Inleiding

Numerieke chromosomale afwijkingen van een bepaalde sequentie in het genoom liggen vaak ten grondslag aan verschillende vormen van kanker, ontwikkelings- en groeiachterstanden. Deze chromosomale afwijkingen veroorzaken een verandering in expressie van één of meerdere genen. Het detecteren van de chromosomale afwijkingen kan dus inzicht geven in complexe ziektes en syndromen. Dit inzicht is klinisch relevant aangezien deze kennis gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van medicatie en voor prognostische of diagnostische doeleinden.

Met de techniek array 'comparative genomic hybridization' (array-CGH) kunnen chromosomale veranderingen in aantallen kopieën van een bepaalde sequentie in het genoom nauwkeuriger gedetecteerd worden dan met conventionele CGH. Meestal worden een testgenoom (bijvoorbeeld genomisch DNA van een tumor of van een patiënt met een bepaalde aandoening) en een referentiegenoom (meestal een normaal genoom) gelabeld met twee verschillende fluorochromen, vervolgens samengevoegd en gehybridiseerd op een array van genomische klonen (zie *Figuur 1A*).¹⁻³ Ongelabeld Cot-1-DNA wordt toegevoegd om hybridisatie van repetitief DNA tot een minimum te beperken.

Na de hybridisatie is de ratio tussen de intensiteit van test- en referentiesample een maat voor het relatieve verschil in aantallen kopieën tussen deze twee genomen. Door het gebruik van een normaal referentiegenoom

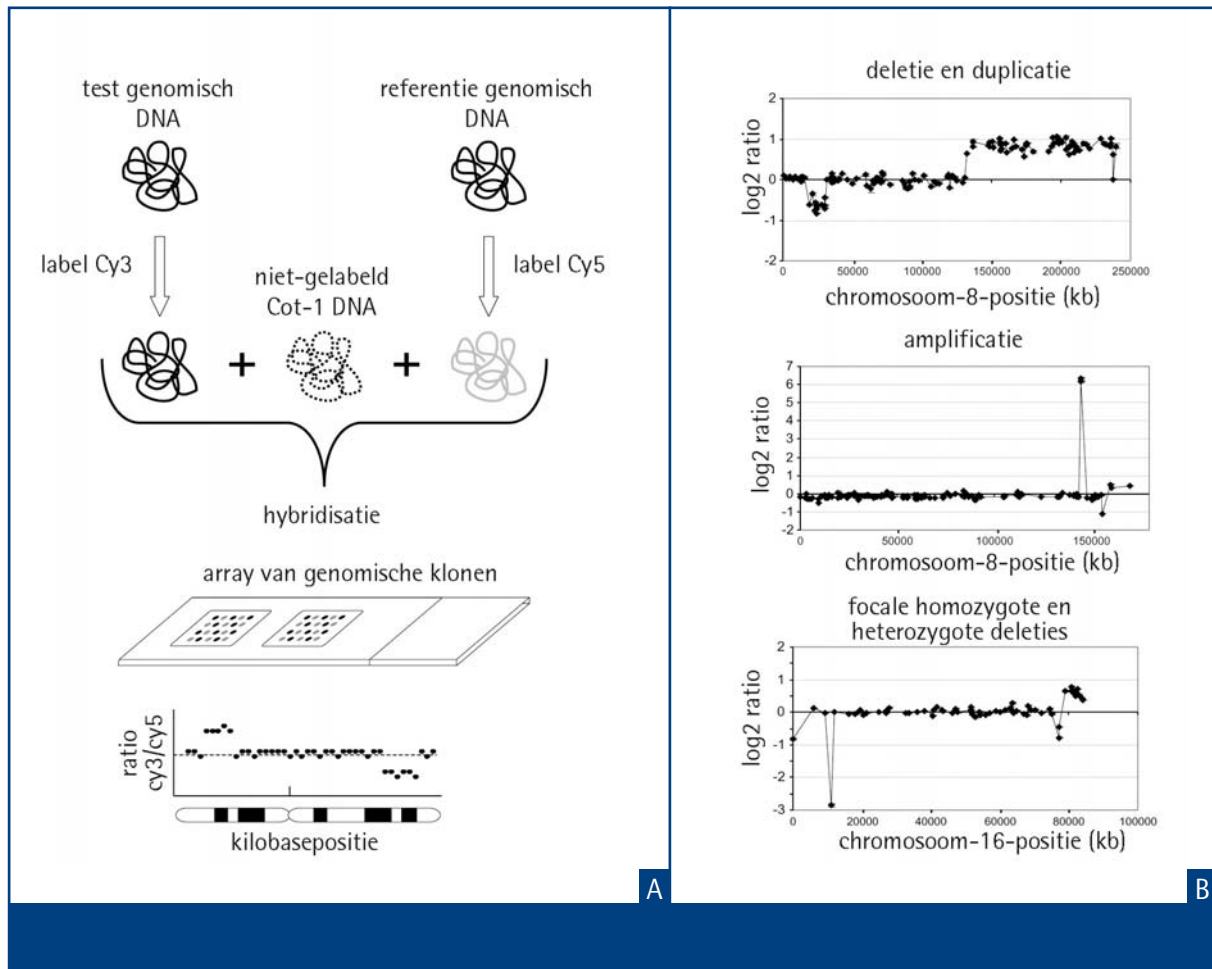
zijn veranderingen in ratio's meestal direct gerelateerd aan veranderingen in aantallen kopieën in het testsample. Dit relatieve verschil kan uiteenlopen van homozygote en heterozygote deleties tot duplicaties en amplificaties (zie *Figuur 1B*). Aangezien de exacte positie van iedere kloon op de sequentie van het humane genoom bekend is, kunnen de genen die aanwezig zijn in een chromosomale afwijking relatief eenvoudig achterhaald worden. Met behulp van een specialistische arrayprinter kunnen duizenden klonen dicht naast elkaar geprint worden. Een array met 3.000 klonen, die verspreid liggen over het genoom, leidt bijvoorbeeld tot een resolutie van ongeveer 1 megabase.

De ontwikkeling en toepassing van de eerste, genoomdekkende, megabaseresolutiearray staan beschreven in het hier besproken proefschrift.^{4,5} Deze bespreking bevat een tweetal voorbeelden, die betrekking heeft op het werk beschreven in dit proefschrift, waarbij array-CGH in de kliniek een belangrijke rol kan spelen.

Toepassingen van array-CGH

Klonale verwantschap tussen tumoren

In het promotieonderzoek is array-CGH onder andere gebruikt om de klonale verwantschap te bepalen tussen primaire en tweede primaire orale tumoren (Schmidt BL, in bewerking). Na de diagnose van een primair plaveiselcelcarcinoom in de mondholte, hebben patiënten een hoog risico (4-7% jaarlijks) voor het ontwikkelen van een tweede primaire



Figuur 1. A. Schematische weergave van de array-CGH-techniek. B. Array-CGH detecteert verschillende typen chromosomale afwijkingen. CGH='comparative genomic hybridization'.

tumor. De vijfjaarsoverleving van patiënten met een primaire tumor is 40%, terwijl de vijfjaarsoverleving na de diagnose van een tweede primaire tumor slechts 25% is. Soms ontstaan deze tweede primaire tumoren op een andere anatomische plaats in de mondholte, jaren na de diagnose van de indextumor. Een aantal theorieën kan het ontstaan van deze tweede primaire tumoren verklaren. Tweede primaire tumoren kunnen onafhankelijk van de indextumor zijn ontstaan, mogelijk uit een patch cellen die blootgesteld zijn aan bepaalde omgevingsfactoren zoals bijvoorbeeld sigarettenrook ('field cancerization').⁶ In dit geval zouden de specifieke chromosomale afwijkingen in de primaire tumor niet overeenkomen met die in de tweede primaire tumor. Tevens kunnen cellen van de indextumor loskomen, zich verspreiden in de mondholte en elders een nieuwe tumor vormen. Ook is het mogelijk dat tweede primaire tumoren ontstaan uit een klonale cellulaire patch waarbij klonale, aberrante cellen een groot oppervlak van het

orale epitheel in beslag nemen.^{7,8} In de laatste twee gevallen zouden de specifieke chromosomale afwijkingen in de primaire tumor wel overeenkomen met die in de tweede primaire tumor.

Array-CGH-analyse werd uitgevoerd op tumoren van drie patiënten bij wie meerdere tumoren in de mondholte ontstonden over een periode van soms meer dan tien jaar. Ondanks de aanwezigheid van tumorspecifieke chromosomale afwijkingen was het duidelijk dat de tweede primaire tumoren eenzelfde oorsprong hadden. Dit is gebaseerd op de aanwezigheid van bepaalde chromosomale afwijkingen die aanwezig zijn in alle, of een subset van tumoren bij iedere patiënt. Dit betekent dus dat tweede primaire tumoren zijn ontstaan uit een klonale patch cellen of door migratie van primaire tumorcellen door de mondholte die zich elders in de mondholte settelen en een nieuwe tumor vormen.

Patiënten met een klonale patch hebben een hoog risico op de ontwikkeling van een derde of vierde

tumor. Het is daarom klinisch gezien van belang dat deze patiënten geïdentificeerd kunnen worden. Om de mogelijke aanwezigheid en/of extensie van een klonale patch te bepalen, kunnen orale epitheelcellen, bijvoorbeeld met een borsteltje van verschillende locaties in de mondholte afgeschraapt worden. DNA kan direct uit deze preparaten geïsoleerd worden voor array-CGH-analyse om vervolgens vergeleken te worden met de CGH-profielen van de primaire en de tweede primaire tumor.

Array-CGH-analyse, in combinatie met andere cytogenetische analyses, kan in dit geval dus leiden tot een meer gerichte behandeling van een bepaalde groep patiënten met een verhoogd risico op de ontwikkeling van een tweede primaire tumor.

Chromosomale aandoeningen

Een andere waardevolle toepassing van array-CGH behelst het detecteren van deleties of duplicaties die vaak geassocieerd zijn met congenitale afwijkingen en mentale retardatie.

De arrays beschreven in dit proefschrift zijn onder meer gebruikt voor de detectie van een deletie op chromosoom 22 bij patiënten met velo-cardio-faciaal syndroom (VCFS, ook wel DiGeorge-syndroom genoemd).⁹

Conclusie

Het array-CGH-platform dat beschreven is in dit proefschrift heeft de potentie voor klinische toepassingen in medische genetica en diagnostiek. Dit wordt mede bepaald door de betrouwbaarheid en de nauwkeurigheid waarmee chromosomale afwijkingen gedetecteerd kunnen worden. Al met al kan dit in de nabije toekomst leiden tot een verbetering van de behandeling van kanker.

Referenties

1. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399-407.
2. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation

using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207-11.

3. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;23:41-6.

4. Snijders AM. Human and mouse genome analysis using array comparative genomic hybridization [dissertation]. Utrecht: Universiteit Utrecht; 2004.

5. Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001;29:263-4.

6. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. 'Field cancerization' in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicenter origin. *Cancer* 1953;6:963.

7. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Van Der Wal JE, Snow GB, et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002;161:1051-60.

8. Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, Emilion G, Langdon J. Profiling clonality and progression in multiple pre-malignant and malignant oral lesions identifies a subgroup of cases with a distinct presentation of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1860-6.

9. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003;12:R145-52.

Ontvangen 4 april 2005, geaccepteerd 15 juni 2005.

Correspondentieadres

Dr. A.M. Snijders, postdoctoral fellow

University of California San Francisco
Cancer Research Institute
P.O. Box 0808
San Francisco, CA 94143-0808
Verenigde Staten
Tel.: 00 1 (415) 502 72 28
E-mail: snijders@cc.ucsf.edu

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.