

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2475-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.02.95, 14.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/95200390, 95/95201951**

(33) Země priority: **EP, EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**

(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/00716**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/25493**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	15/11
C 07 K	14/47
C 07 K	19/00
C 07 K	16/18
C 12 Q	1/68
A 61 K	38/17
A 01 K	67/027

(71) Přihlášovatel:

K. U. LEUVEN RESEARCH &
DEVELOPMENT, Leuven, BE;
BULLERDIEK Jörn, Bremen, DE;

(72) Původce:

Bullerdiek Jörn, Bremen, DE;
Van de Ven Willem Jan Marie, Leuven, BE;
Schoenmakers Henricus Franciscus Petrus
Maria, Geldrop, NL;
Mols Rafael, Hallaar, BE;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Mnohočetné nádorové odchylné růstové
geny**

(57) Anotace:

Mnohočetný nádorový odchylný růstový gen
/MAG/, mající nukleotidovou sekvenci libo-
volného řetězce členu genů vysoce mobilní
skupiny proteinů nebo genů LIM proteinů
včetně jeho modifikovaných verzí. Gen a jeho
deriváty lze použít při různých diagnostických
a terapeutických aplikacích.

CZ 2475-97 A3

Mnohočetné nádorové odchylné růstové geny

Oblast techniky

Vynález se týká identifikace genové rodiny proteinů vysoce mobilní skupiny (HMG) jako rodiny genů, často souvisejících s odchylným buněčným růstem, které se nacházejí v celé řadě jak benigních, tak maligních nádorů. Vynález se zejména týká identifikace členu genové rodiny proteinů HMG jako genů oblasti zlomového bodu široce aktivního chromozomu 12, který je obsažen v celé řadě nádorů, včetně hemartomů mesenchymálních nádorů (např. plic a prsu), lipomů, pleomorfních adenomů slinných (salivárních) žláz, děložních (uterinních) leiomyomů, angiomyxomů, fibroadenomů plic, polypů děložní sliznice (endometria), aterosklerotických plaků, a dalších benigních nádorů stejně, jako různých maligních nádorů, například včetně sarkomů (např. rhabdomyosarkomu, osteosarkomu) a karcinomů (např. plic, žaludku, kůže, štítné žlázy) stejně, jako leukemií a lymfomů. Vynález se rovněž týká dalších členů genové rodiny proteinů HMG o kterých se zjistilo, že se podílejí na zlomech v chromozomu 6.

Vynález se dále týká identifikace členů rodiny LIM proteinů, jako dalšího typu genů specifické zlomové oblasti nádorového typu a častých fúzních partnerů HMG genů v těchto nádorech. Ukázalo se, že LPP gen této rodiny je specifický pro lipomy. Vynález se týká zejména použití členů genové rodiny HMG a LIM proteinů a jejich derivátů při diagnostice a terapii.

Dosavadní stav techniky

Mnohočetné nezávislé cytogenetické studie se zabývají oblastí q13-q15 chromozomu 12 v celé řadě druhů pevných benigních a maligních nádorů. Pokud jde o pevné benigní nádory, lze uplatnění oblasti 12q13-q15 často pozorovat u benigních nádorů tukových tkání [Sreekantaiah, C., Leong, S.L.P., Karakousis, C.P., McGee, D.L., Rappaport, W.D., Villar, H.V., Neal, D., Fleming, S., Wankel, A., Wankel, A., Herrington, P.N., Carmona, R. a Sandberg, A.A. (1991). Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer Res.* **51**: 422-433.], uterinních leiomyomů [Nilbert, M. a Heim, S. (1990). Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chrom. Cancer* **2**: 3-13.; Pandis, N., Heim, S., Willen, H., Bardi, G., Loderus, U.M., Mandahl, N. a Mitelman, F. (1991). Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* **55**: 11-18.] a u pleomorfních adenomů slinných žláz [Sandros, J., Stenman, G. a Mark, J. (1990). Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* **44**: 153-167.; Bullerdiek, J., Wobst, G., Meyer-Bolte, K., Chilla, R., Haubrich, J., Thode, B. a Bartnitzke, S., (1993). Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet. Cytogenet.* **65**: 27-31.]. Uplatnění stejné oblasti bylo rovněž zjištěno v případě endometriálních polypů [Walter, T.A., Xuan Fan, S., Medchill, M.T., Berger, C.S., Decker, H.J.H. a Sandberg, A.A. (1989). Inv (12) (p11.2q13) in an endometrial polyp. *Cancer Genet. Cytogenet.* **41**: 99-103.; Vanni, R., Dal Cin, P., Marras, S., Moerman, P., Andrtia, A., Valdes, E., Deprest, J. a Van den Berghe, H., (1993). Endometrial polyp: Another benign tumor characterized by

12q13-q15 changes. Cancer Genet. Cytogenet. **68**: 32-33.], hemangiopericytomu [Mandahl, N., Orndal, C., Heim, S., Willen, H., Rydholm, A., Bauer, H.C.F. a Mitelman, F. (1993). Aberrations of chromosome segment 12q13-15 characterize a subgroup of hemangiopericytomas. Cancer **71**: 3009-3013.] a chondromatózních nádorů [Mandahl, N., Heim, S., Arheden, K., Rydholm, A., Willen, H. a Mitelman, F., (1989). Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. Cancer **65**: 242-248.; Bridge, J.A., Persons, D.L., Neff, J.R. a Bhatia, P. (1992). Clonal karyotypic aberrations in enchondroma. Cancer Detect. Prev. **16**: 215-219.; Hirabayashi, Y., Yoshida, M.A., Ikeuchi, T., Ishida, T., Kojima, T. Higaki, S., Machinami, R. a Tonomura, A. (1992). Chromosome rearrangements at 12q12 in two cases of chondrosarcomas. Cancer Genet. Cytogenet. **60**: 35-40.; Mandahl, N., Willen, H., Rydholm, A. a Mitelman, F. (1993). Rearrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. Genes Chrom. Cancer **6**: 121-123.]. V nedávné době bylo uplatnění chromozomové oblasti 12q13-q15 zaznamenáno rovněž v pulmonálním chondroidním hamartomu [Dal Cin, P., Kools, P., De Jonge, I., Moerman, Ph., Van de Ven W., Van den Berghe H. (1993a). Rearrangement of 12q14-15 in Pulmonary Chondroid Hamartoma. Genes Chrom. Cancer, **8**: 131-133.; Schoenberg Fejzo, M., Yoon, S.J., Montgomery, K.T., Rein, M.S., Weremowicz, S., Krauter, K.S., Dorman, T.E., Fletcher, J.A., Mao, J., Moir, D.T., Kucherlapati, R.S. a Morton, C.C. (1995). Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma and lipoma. Physical mapping of the 12q14-15 breakpoint region in uterine leiomyomata. Genomics **26**: 265-275.]. Konečně v několika případech byly zveřejněny zprávy, týkající se

pevných nádorů s uplatněním chromozomové oblasti 12q13-q15, např. nádorů prsu [Birdsal, S.H., MacLenan, K.A. a Gusterson, B.A. (1992). t(6;12) (q23;q13) a t(10;16) (q22;p11) in a phyllodes tumor of the breast. Cancer Genet. Cytogenet. **60**: 74-77.; Rohen, C., Bonk, U., Staats, B., Bartnizke, S. a Bullerdiek, J. (1993). Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet. Cytogenet., **69**: 69-71.], difúzních astrocytomů [Jenkins, R.B., Kimmell, D.W., Moertel, C.A., Schulz, C.A., Menezes, R.M., Scheihauer, B., Kelly, P.J. a Dewald, G.W. (1989). Recurrent cytogenetic abnormalities in 80 gliomas. Cytogenet. Cell Genet. **51**: 1019.] a buněčného nádoru kosti [Noguera, R., Llimbart-Bosch, A., Lopez-Gines, C., Carda, C. a Fernandez, Cl. (1989). Giant-cell tumor of bone, stage II, displaying translocation t(12;19) (q13;q13). Virchows Archiv A Pathol. Anat. **415**: 377-382.]. Maligní nádorové typy s opakujícími se odchylkami v oblasti 12q13-Q15 zahrnují myxoidní liposarkom [Turc-Carel, C., Limon, J., Dal Cin, P., Rao, U., Karakousis, C. a Sandberg, A.A. (1986). Cytogenetic studies of adipose tissue tumours. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16) (q13;p11) in myxoid liposarcomas. Cancer Genet. Cytogenet. **23**: 291-299.], sarkom čiré buňky měkké tkáně [Rodriguez, E., Sreekantaiah, C., Reuter, V.E., Motzer, R.J. a Chaganti, R.S.K. (1992). t(12;22) (q13;q13) and trisomy 8 are nonrandom aberrations in clear-cell sarcoma. Cancer Genet. Cytogenet. **64**: 107-110.; Reeves, B.R., Fletcher, C.D.M. a Gusterson, B.A. (1992). Translocation t(12;q13) (q13;q13) is a nonrandom rearrangement in clear cell sarcoma. Cancer Genet. Cytogenet. **64**: 101-103.; Fletcher, J.A. (1992). Translocation (12;12) (q13-14;q12) is a nonrandom abeeation

in soft-tissue clear-cell sarcoma. Genes. Chrom. Cancer 5: 184.] a podskupinu rabdomyosarkomu [Roberts, P., Browne, C.F., Lewis, I.J., Bailey, C.C., Spice, R.D., Williams, J. a Batcup, G. (1992). 12q13 Occurrence, Cancer Genet. Cytogenet. 60: 135-140.].

Ačkoliv tyto studie ukazují, že stejná cytogenetická oblast chromozomu 12 je často místem, kde dochází v těchto pevných nádorech k chromozomovým odchylkám a podobným translokacím, není ještě stále známá přesná povaha zlomových bodů chromozomu 12 různých nádorů a rovněž doposud nebylo stanoveno, které geny jsou přímo ovlivněny translokací.

V předcházejících studiích, zabývajících se fyzikálním mapováním [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiel, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.] byl zlomový bod chromozomu 12q v lipomu, pleomorfním adenomu slinných žláz a děložním leiomyomu zmapován mezi místem D12S8 a genem CHOP a ukázalo se, že D12S8 je umístěno daleko od CHOP. V nedávné době se pomocí analýzy FISH rovněž zjistilo, že zlomové body chromozomu 12q v hemartomu prsu, angiomyxomu a multiplexních pulmonálních chondroidních hemartomech jsou mapovány v tomto DNA intervalu. Jako strukturní přístup pro definování DNA oblasti, vymezující tyto zlomové body, volí současní vynálezci při pokusech molekulárně klonovat geny, ovlivněné chromozomovými 12q12-q15 odchylkami v různých nádorech, směrové procházení chromozomem.

Jako počáteční bod pro procházení chromozomem se použilo místo D12S8. Během těchto studií se ukázalo, že chromozomové zlomové body, které jsou přítomny v celé řadě buněčných linií děložního leiomyomu, se shlukují uvnitř 445 kb chromozomového segmentu, který byl označen jako Uterine Leiomyoma Cluster Region na chromozomu 12 (ULCR12) [Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer*. **11**: 106-118.]. Následně se zjistilo, že 1,7 Mb oblast na chromozomu 12 vymezuje zlomové body chromozomu 12 uterinních leiomyomových buněk, lipomových buněk a adenomových buněk slinných žláz s oblastmi shluků zlomových bodů různých nádorových typů překryvů [Van de Ven, W.J.M., Schoenmakers, H.F.P.M., Wanschura, S., Kazmierczak, B., Kools, P.F.J., Geurtus, J.M.W., Bartnitzke, S., Van den Berghe, H. a Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13-q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chrom. & Cancer*. **12**: 296-303.;

Genes, Chromosome & Cancer 12:296-303 (1995);

Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors;

Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe, and Jörn Bullerdiek;

Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium (W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.);

Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany (S.W., B.K., S.B., J.B.).]. Tato 1,7 Mb oblast na dlouhém rameni chromozomu 12, která zřejmě obsahuje ULCR12, byla označena jako „oblast mnohočetných odchylek“ (Multiple Aberration Region (MAR)). Při podrobném mapování oblasti se MAR nedávno označila jako 12q15.

Ukázalo se tedy, že v podstatě všechny zlomové body mapy chromozomu 12 se nachází v 1,7 Mb oblasti, označené zde jako „oblast mnohočetných odchylek“ nebo-li MAR. Výzkum dále odhalil, že v této oblasti lze identifikovat člena genové rodiny proteinů HMG, kterým je HMGI-C gen, jako postulátovaný vícenádorový odchýlný růstový gen (MAG). Totéž se vztahuje na členy LIM rodiny, u nichž se rovněž zjistilo, že mohou být zahrnuty v chromozomových odchylkách. Z těchto členů se zejména pro lipom-preferovaný partnerský gen (LPP), odvozený od chromozomu 3, značně uplatňuje v lipomech.

LIM proteiny jsou proteiny, nesoucí cysteinové-zinkem obohacené-vazebné domény, tzv. LIM domény. Jsou zahrnuty v interakcích protein-protein [viz Sanchez-Garcia, I. & Rabbitts, T. (1994) The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. Trends in Genetics 10(9), 315-320.]. Jedním ze členů proteinové rodiny je nyní objevený LPP protein, zmapovaný v chromozomu 3.

Podstata vynálezu

Jak již bylo uvedeno, vynález se týká odchylek v HMGI-C genu na chromozomu 12 a LPP genu na chromozomu 3, který se použil jako model pro určení obecnějšího rámce uplatnění členů HMG a LIM genových rodin jak v benigních,

tak v maligních nádorech. Aby se demonstrovalo to, že existuje obecnější rámec genové rodiny, který, pokud je ovlivněn chromozomovým přeuspořádáním, způsobuje nádorový růst příslušné skupiny, ukázali současní vynálezci, že se HMGI(Y) gen, který je členem HMG rodiny, uplatňuje na zlomech v chromozomu 6.

Ačkoliv jak HMG, tak LIM genová rodina jsou samy o sobě známé, teprve současný vynález předpokládá vzájemné vztahy mezi těmito rodinami a chromozomovými odchylkami indukujícími nádor, např. translokacemi, delecemi, inzercemi a inverzemi. Kromě toho se dosud neuvažovalo, že se změny úrovně fyziologické exprese členů genové rodiny pravděpodobně rovněž uplatňují v nádorové evoluci. Vynález tedy ukazuje, že v normálních, dospělých buňkách je expresivní úroveň HMGI-C genu prakticky nedetekovatelná, zatímco u odchylných růstových buněk je expresivní úroveň podstatně zvýšena.

Vycházejí z těchto zjištění, vynález poskytuje členy genových rodin nebo jejich deriváty v izolované formě, a způsob jejich použití při diagnostických a terapeutických aplikacích. Kromě toho mohou být znalosti, týkající se umístění zmíněných genů a nukleotidové sekvence těchto genů, použity při studiu jejich přeuspořádání nebo exprese a při identifikaci možného zvýšení nebo snížení jejich expresivní úrovně a jejich účinků na buněčný růst. Na základě těchto informací lze navrhnout diagnostické testy nebo terapeutické léčebné metody.

Výraz „mnohonádorový odchylný růstový (nebo-li MAG) gen“, jak je použit v této patentové přihlášce, se použije pro označení uplatnění těchto typů genů v různých typech karcinomů. Tento výraz označuje všechny HMG a LIM genové

rodiny, které se uplatňují při nefyziologickém proliferčním růstu, a zejména při růstu maligních nebo benigních nádorů, včetně aterosklerotických plaků. Nicméně rovněž se zjistilo, že i zlomy vně aktuálního genu, které se nacházejí v jeho těsném okolí, mohou způsobovat odchýlný růst. Výraz „MAG gen“ tedy zahrnuje i bezprostřední okolí tohoto genu. Odborník v daném oboru ví, že výrazem „bezprostřední okolí“ lze rozumět okolí genu, jehož zlomy nebo přeuspořádání povedou k již definovanému nefyziologickému proliferčnímu růstu.

Výraz „standardní buňka“ se používá pro označení buňky, ve které se vyskytuje odchýlný chromozom, nebo buňky, mající fyziologickou expresivní úroveň relevantního genu. „Standardní“ neboli „normální“ chromozom označuje neodchýlný chromozom.

Vynález poskytuje různá diagnostická a terapeutická využití, která se zakládají na informacích, odvoditelných z genů. Tyto informace nejen, že vymezují nukleotidovou sekvenci, nebo-li sekvenci aminokyselin genového produktu odvozeného z tohoto genu, ale rovněž zahrnují úroveň transkripce nebo translace uvedeného genu.

Vynález se tedy na jedné straně zabývá myšlenkou, že odchylky buněčného růstu mohou být přímo nebo nepřímo způsobeny fyzickými zlomy, ke kterým dochází v genu nebo jeho bezprostředním okolí. Na druhé straně se vynález zabývá myšlenkou, že odchylka buněčného růstu může být způsobena nefyziologickou expresivní úrovní zmíněného genu. Tuto nefyziologickou expresivní úroveň může způsobit zlom, nebo může být důsledkem jiného stimulu, který aktivuje nebo deaktivuje zmíněný gen. Doposud nebyl objasněn přesný mechanismus nebo původ odchýlného buněčného růstu. Nicméně

přesná znalost tohoto mechanismu není pro definování diagnostických a terapeutických metod nezbytná.

Diagnostické metody podle vynálezu se tedy zakládají na faktu, že odchylky v chromozomu způsobuje detekovatelnou změnu chromozomového vzhledu nebo biochemického chování. Translokace má například za následek to, že první část chromozomu (a následně MAG gen) je substituována další (druhou) částí (dále označované jako „první a druhá substituční část“). První část se bude rovněž objevovat v druhém chromozomu, ze kterého pochází druhá část. Potom se vytvoří následné hybridy mezi zbývajícimi částmi obou chromozomů (nebo v případech tripletové i vícenásobné translokace) a substituovanou částí, poskytnutou jejich translokačními partnery, což, vzhledem k tomu, že se nyní zjistilo, že se zlomy objevují v MAG genu, povede ke vzniku hybridních genových produktů MAG genu. Signální znaky (markery), například hybridizovatelné molekuly jako RNA, DNA nebo DNA/RNA hybridy nebo protilátky, budou schopné detekovat tyto hybridy jak na DNA úrovni, tak na RNA, nebo proteinové úrovni.

Například transkript hybridu bude ještě zahrnovat oblast poskytnutou zbývající částí genu/chromozomu, ale ztratí oblast, poskytnutou substituovanou částí, která byla translokována. V případě inverzí, delatací, a inzercí, může být zmíněný gen postižen stejným způsobem.

Translokace jsou obvykle rovněž cytogeneticky detekovatelné. Další odchylky se zjišťují obtížněji, protože na cytogenetické úrovni často nejsou viditelné. Vynález nyní poskytuje možnosti diagnostikovat všechny tyto typy chromozomových odchylek.

Při translokacích signální znaky (markery) nebo sondy na bázi MAG genu pro zbývající a substituované části chromozomu in situ detekují zbývající část na původním chromozomu, ale substituční část na druhém translokačním partnerovi.

Například v případě inverzí se budou dvě sondy hybridizovat ve standardním genu v určité vzdálenosti. Tato vzdálenost se však může v důsledku inverze měnit. Inverze in situ může být tedy vizualizována označením sady vhodných sond stejnými nebo odlišnými detekovatelnými signálními znaky (markery), například fluorescenčními značkami. Deletace a inserce lze detekovat podobným způsobem.

Výše popsané aplikace in situ podle vynálezu je výhodné provádět pomocí technik FISH (fluorescenční hybridizace in situ). Signálními znaky jsou například dva kosmidy, z nichž jeden obsahuje exony 1 až 3 MAG genu, zatímco druhý obsahuje exony 4 a 5. Oba kosmidy jsou označeny rozdílnými fluorescenčními signálními znaky, například modrým a žlutým. Normální chromozom bude vykazovat kombinaci obou označení, takže poskytne zelený signál, zatímco translokace je viditelná jako modrý signál na zbývající části jednoho chromozomu (např. 12), zatímco žlutý signál se nachází na druhém chromozomu, obsahujícím substituční část. V případě, kdy se pro obě sondy použijí stejná označení, bude intenzita signálů na normálním chromozomu 100%, zatímco signál na odchylných chromozomech bude 50%. V případě inverzí se jeden ze signálů posune z jednoho místa na normálním chromozomu do dalšího na odchylném chromozomu.

U výše popsaných aplikací je třeba pro srovnání zavést referenční vzorek. Zpravidla bývá ovlivněn pouze jeden ze dvou chromozomů. Takže bude velmi vhodné použít jako vnitřní referenci normální chromozom. Navíc je důležité, aby se jeden ze signálních znaků zvolil na zbývajících nebo-li nezměněných částech chromozomu a druhý na substituované nebo invertované části. V případě MAG genu chromozomu 12, se zlomy zpravidla, jak ukazuje předložený vynález, nacházejí ve velkém intronu mezi exony 3 a 4. Kromě toho se zlomy detekovaly mezi exony 4 a 5. Jsou tedy velmi vhodné sondy na bázi exonů 1 až 3 a 4 a 5 nebo sondy buď na bázi exonu 4 nebo exonu 5. Alternativně lze použít kombinaci sond na bázi translokačních nebo fúzních partnerů. Pro identifikaci lipomů lze například použít sondy na bázi exonů 1 až 3 HMGI-C genu na jedné straně, a na bázi LIM domén LPP genu na straně druhé.

Navíc se zjistilo, že se zlomy mohou vyskytovat rovněž vně genu, tj. v jeho 5' nebo 3' poloze. Volba sond bude potom samozřejmě zahrnovat alespoň jednu sondu hybridizující na DNA sekvenci umístěné v 5' nebo 3' poloze genu.

Výraz „sondy“, jak je zde použit, který by měl být interpretován v širším slova smyslu, zahrnuje neomezujícím způsobem lineární DNA nebo RNA řetězce, umělé kvasnicové chromozomy (YAC), nebo kruhové DNA formy, například plasmidy, fágy, kosmidy atd..

Tyto in situ metody lze použít na metafázové a interfázové chromozomy.

Kromě výše popsaných metod in situ lze různé diagnostické techniky provádět na biochemičtější úrovni,

například na základě změn v DNA, RNA nebo proteinu, nebo změn fyziologické expresivní úrovně genu.

Základem metod, určených pro sledování změn chromozomového biochemického chování, je fakt, že vhodnou volbou sond lze na gelu nebo membráně detekovat změny délek nebo složení genu, transkriptu nebo proteinu. Změny délky, jsou viditelné, protože normální gen, transkript(y), nebo protein(y) budou patrné na jiném místě gelu nebo membrány než odchýlný gen, transkript, resp. protein. V případě translokace se objeví větší počet skvrn, než je normální počet skvrn.

Takže vycházejí z výše popsaných principů, vynález poskytuje způsob diagnostikování buněk majících nefyziologickou proliferační kapacitu, přičemž tento způsob zahrnuje odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány, izolaci vhodné makromolekuly příbuzné s MAG genem z těchto buněk, a analyzování takto získané makromolekuly, které se provede srovnáním této makromolekuly s referenční molekulou pocházející z buněk, které nevykazují nefyziologickou proliferační kapacitu, výhodně izolovanou ze stejného jedince. Makromolekulou, týkající se MAG genu, může být tedy DNA, RNA nebo protein. MAG gen může být buď členem HMG rodiny nebo LIM rodiny.

Specifické provedení tohoto typu diagnostické metody podle vynálezu zahrnuje odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány; extrahování jejich celé RNA; připravení prvního řetězce cDNA mRNA druhů v celkovém RNA extraktu nebo poly-A-izolované frakce (frakcí), přičemž cDNA obsahuje vhodný konec; provádění PCR za použití MAG genového specifického primeru a koncového-specifického primeru za účelem amplifikace MAG genových specifikovaných

cDNA; separování PCR produktů na gelu za účelem získání vzoru pásů; vyhodnocení přítomnosti odchylných pásů porovnáním se standardními pásy, výhodně pocházejícími ze stejného individua.

Alternativní amplifikaci lze provádět pomocí NASBA techniky (amplifikace na bázi sekvence nukleové kyseliny) [Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. Nature **350**, 91-92.] nebo jejích variant.

U dalšího provedení způsob zahrnuje odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány; izolování celého proteinu z těchto buněk; separování celkového proteinu na gelu za účelem získání v podstatě individuálních pásů, případně přemístění pásů na Westernovu membránu; hybridizaci takto získaných pásů s protilátkami namířenými proti části proteinu kódované zbývajících částí MAG genu a proti části proteinu kódované substituční částí MAG genu; vizualizaci reakcí antigen-protilátka; a stanovení přítomnosti odchylných pásů srovnáním s pásy, získanými ze standardních proteinů, výhodně pocházejících ze stejného individua.

U dalšího provedení způsob zahrnuje odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány; izolování celkové DNA z těchto buněk; vyluhování DNA jedním nebo několika restrikčními enzymy, tzv. „vzácně štěpícími enzymy“ (zpravidla „6 nebo více vzácně štěpících enzymů“); separování takto připraveného výluhu na gelu za účelem získání separačního vzoru, případně přenesení separačního vzoru na Southernovu membránu; hybridizaci separačního vzoru v gelu nebo na membráně sadou sond za hybridizačních podmínek; vizualizaci hybridizací a stanovení přítomnosti

odchylných pásů srovnáním se standardními pásy, výhodně pocházejícími ze stejného individua.

Změny expresivní úrovně genu lze detekovat měřením úrovní mRNA nebo proteinových úrovní pomocí vhodné sondy.

Diagnosticke metody, založené na abnormálních expresních úrovních genu, mohou zahrnovat odebrání vzorku buněk, které mají být diagnostikovány; izolování mRNA z těchto buněk; a stanovení přítomnosti a/nebo (relativního) množství mRNA, získané transkripcí z MAG genu srovnáním s kontrolním vzorkem. Ke stanovení přítomnosti nebo (relativního) množství mRNA lze použít amplifikaci alespoň části mRNA MAG genu, pomocí RT-PCR nebo podobných amplifikačních technik. U alternativního provedení lze expresní úroveň stanovit určením přítomnosti nebo množství genového produktu (například proteinu), například pomocí monoklonálních protilátek.

Diagnosticke metody podle vynálezu lze použít pro diagnostikování chorob, přičemž buňky, mající nefyziologickou proliferační kapacitu, se zvolí ze skupiny, zahrnující benigní nádory, včetně hemartomů mesenchymálních nádorů (např. plic a prsu), lipomů, pleomórních adenomů slinných (salivárních) žláz, děložních (uterinních) leiomyomů, angiomyxomů, fibro-adenomů plic, polypů děložní sliznice (endometria), aterosklerotických plaků, a dalších benigních nádorů stejně, jako různých maligních nádorů, například včetně sarkomů (např. rabdomyosarkomu, osteosarkomu) a karcinomů (např. prsu, plic, kůže, štítné žlázy) stejně, jako leukemiů a lymfomů. Vynález se neomezuje pouze na diagnózu a léčbu tzv. benigních a maligních pevných nádorů, ale jeho principy lze rovněž

aplikovat na hematologické zhoubné nádory, například leukémie a lymfomy.

Nedávno vydané publikace naznačily, že aterosklerotické plaky rovněž zahrnují abnormální proliferaci [Casalone, R. a kol. (1991) Cytogenetic analysis reveals clonal proliferation of smooth muscle cells in atherosclerotic plaques. Hum. Gen. **87**, 139-143.], zejména buněk hladkého svalstva, a že aterosklerotické plaky tvoří benigní nádory [Vanni, R. a kol. (1990) Atherosclerotic plaque as a benign tumor. Cancer Genet. Cytogenet. **47**, 273-274.]. Tento typ poruchy může být rovněž chápán jako možná indikace při použití MAG genové rodiny, zejména při diagnostických a terapeutických aplikacích.

Jak již bylo naznačeno výše, zjistilo se, že v určitých maligních nádorech je zvýšena expresní úroveň HMG genů [Giancotti, V., a kol. Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with ras and v-mos oncogenes and co-transfection with c-myc and polyoma middle T. genes. EMBO J. **6**, 1981-1987 (1987).]. Dosud nebyl zjištěn důvod tohoto pozorovaného jevu. Vynález se tedy dále zaměřuje na provádění identifikace MAG genů v rámci terapie. Vynález například poskytuje protismyslné molekuly nebo-li expresivní inhibitory MAG genu, použitelné ~~při léčbě chorob, zahrnujících buňky, které mají~~ nefyziologickou proliferací kapacitu modulací exprese genu. Nefyziologická vysoká exprese může být tedy normalizována protismyslnou RNA, která se buď zavede do buňky, nebo exprimuje touto buňkou, a naváže se na mRNA nebo protilátky nasměrované proti genovému produktu, což může mít zase za následek normalizaci buněčného růstu. Příklady ukáží, že exprese protismyslné RNA v leukemických

buňkách způsobí zpětnou diferenciaci buněk do normálního stavu.

Vynález tedy poskytuje deriváty MAG genů a/nebo jeho bezprostředního okolí, použitelné při diagnóze a přípravě terapeutických kompozic, přičemž tyto deriváty se zvolí ze skupiny, zahrnující smyslnou a protismyslnou cDNA nebo její fragmenty, transkripty genů, nebo jejich fragmenty, protismyslnou RNA, molekulu, indukující trojitou šroubovici, nebo další typy „transkripčních svorek“, fragmentů genů nebo jeho komplementárního řetězce, proteiny kódované genem nebo jejich fragmenty proteinové nukleové kyseliny (PNA), protilátky směřující proti genu cDNA transkriptu proteinu nebo jejich fragmentů, a stejně tak fragmenty protilátky. Kromě použití přímých derivátů genů a jejich okolí (lemovacích sekvencí) při diagnóze a terapii, lze pro terapeutické aplikace podle vynálezu použít rovněž další molekuly jako expresní inhibitory nebo expresní zesilovače. Příkladem tohoto typu molekul jsou ribozymy, které ničí RNA molekuly.

Kromě výše popsaných terapeutických a diagnostických metod, lze principy vynálezu rovněž použít při produkci transgenního zvířecího modelu pro testování léčiv, určených pro léčení maligních nebo benigních nádorů a aterosklerotických plaků, souvisejících s MAG genem. Jeden z příkladů popisuje produkci takového zvířecího modelu.

Je zřejmé, že principy vynálezu jsou zde ilustrovány pouze na HMGI-C genovém mapování chromozomu 12 a HMGI(Y) genovém mapování na chromozomu 6, a LPP genu na chromozomu 3. Na základě informací, poskytnutých touto přihláškou, je odborník schopen izolovat a sekvencovat odpovídající geny genové rodiny a aplikovat principy tohoto

vynálezu použitím genu a jeho sekvence, aniž by překročil rámec obecného konceptu tohoto vynálezu.

Vynález se stane zřejmějším po prostudování následujících konkrétních příkladů, které však mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1

Tento obrázek znázorňuje širokorozsahovou fyzikální mapu 6 Mb oblasti na dlouhém rameni lidského chromozómu 12, odvozenou z YAC kontigu obsahujícího 75 vzájemně se překrývajících CEPH YAC klonů a pokrývajících zlomové body chromozómu 12q, které jsou přítomny v celé řadě různých benigních pevných nádorů. Širokorozsahovou fyzikální mapu kompozitní genomové DNA překrytou YAC inzerty reprezentuje černá souvislá čára a relativní polohy různých restričních míst vzácně štěpících enzymů. DNA oblasti, ve kterých by mohla být nalezena další štěpící místa příslušného restričního enzymu, jsou označeny šipkami. Místa polymorfní restriční endonukleázy jsou označena hvězdičkami. Izolované a definované DNA signální znaky jsou zobrazeny zeleně. Získané DNA signální (markery) znaky jsou znázorněny v rámečkích a jsou označeny pomocí akronymu (viz rovněž tabulka I a II). Relativní polohy těchto DNA signálních znaků (markerů) v širokorozsahové fyzikální mapě jsou naznačeny a ty, které odpovídají příslušným YAC koncům jsou spojeny s těmito polohami pomocí přerušované čáry.

Některé DNA signální znaky byly přiřazeny k DNA intervalu a ten byl označen pomocí šipek. Pro DNA signální znaky v bílých rámečcích byly vyvinuty STS a primerové sady, které jsou uvedeny v tabulce II. Pro DNA signální znaky ve žlutých rámečcích nebyly vyvinuty žádné primerové sady. V mapě jsou rovněž naznačeny DNA intervaly zahrnující RAP1B, EST01096 nebo IFNG. Na místě, kde je to aplikovatelné, jsou použita D číselná označení. Pod širokorozsahovou fyzikální mapou jsou velikosti a relativní polohy vzájemně se překrývajících klonů, spadajících do konvenční širokorozsahové fyzikální mapy, vyjádřeny pomocí nepřerušovaných modrých čar. DNA oblasti YAC inzertů, které neodpovídají konvenční širokorozsahové restriční mapě jsou reprezentovány přerušovanými modrými čarami. Rovněž je zde uveden seznam CEPH adres mikrotitrových ploten pro YAC klony. Dále je dána organizace YAC kontigu na chromozómu 12. Relativní polohy ULCR12 a MAR jsou označeny červenými plnými čarami, označenými pomocí odpovídajících akronymů. Přístupová čísla STS, neuvedená v tabulce I: CH9 (#U27142); RM1 (#U29049); RM110 (#U29022); RM111 (#U29023); RM130 (#U27139); RM131 (#U29001); RM132 (#U27138); RM133 (#U27137). Restriční místa: B: BssHII; K: KspI (=SacII); M: MluI; N: NotI; P: PvuI; Sf: SfiI.

Obrázek 2

Tento obrázek znázorňuje kontig vzájemně se překrývajících kosmidů, širokorozpětovou restrikcí a STS mapu, pokrývající přibližně 445 kb segment MAR. Kontigové prvky jsou číselně označeny a definovány v níže uvedeném seznamu. LL12NC01-odvozené kosmidové klony jsou pojmenovány po adresách svých mikrotitrových ploten. Seznam

přístupových čísel do genobanky (#) různých STS je rovněž uveden níže. STS jsou uvedeny ve zkrácené formě, například RM33 namísto STS 12-RM33. 40 kb mezera mezi STS „K“ a „O“ v kosmidovém kontigu byla překryta λ klony (klony 38 a 40) a PCR produkty (klony 37 a 39). Na obrázku je rovněž uvedena orientace kontigu na dlouhém rameni chromozomu 12 stejně, jako pořadí 37 STS (označených v rámečcích nebo označených pomocí zakroužkovaných velkých písmen). Šikmé čáry a šipky okolo některých STS symbolů v horní části obrázku vyznačují oblast, ve které byly určeny příslušné STS. Je třeba uvést, že kosmidový kontig je označen měřítkem; černé čtverečky označují STS kosmidových konců, zatímco přítomnost STS odpovídajících vnitřními kosmidovými sekvencemi je znázorněna pomocí teček. Širokorozsahová restriční mapa: Bs: BssHII; K: KspI (=SacII); M: MluI; N: NotI; P: PvuI; Sf: SfiI. Ve spodní části obrázku jsou znázorněny detailní restriční mapy, jejichž oblasti obsahují exony (žluté rámečky) HMGI-C genu. Nekódující sekvence jsou prezentovány pomocí prázdných rámečků a kódující sekvence pomocí černých rámečků. NA obrázku jsou rovněž naznačeny zjištěné velikosti (kb) intronů. Relativní polohy translační iniciačního (ATG) a translačního koncového (TAG) kodonu v HMGI-C genu stejně, jako předpokládaný poly-adenylační signál jsou označeny pomocí šipek. Podrobná restriční mapa: B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII. MAR: oblast mnohočetných (multiplexních) abnormalit; DBD: doména vážící DNA.

20.04.99

1=140A3	11=142G8	21=124D8	31=59A1	41=128A2	51=65E6
2=202A1	12=154A10	22=128A7	32=101D8	42=142H1	52=196E1
3=78F11	13=163D1	23=129F9	33=175C7	43=204A10	53=215A8
4=80C9	14=42H7	24=181C1	34=185H2	44=145E1	54=147G8
5=109B12	15=113A5	25=238E1	35=189C2	45=245E8	55=211A9
6=148C12	16=191H5	26=69B1	36=154B12	46=154F9	56=22D8
7=14H6	17=248E4	27=260C7	37=pRM150	47=62D8	57=116B7
8=51F8	18=33H7	28=156A4	38=pRM144	48=104A4	58=144D12
9=57C3	19=50D7	29=27E12	39=PKXL	49=184A9	
10=86A10	20=68B12	30=46G3	40=PRM147	50=56C2	

A = STS 12-EM12	(#U27145)	I = STS 12-CH12	(#U27153)
Q = STS 12-RM120	(#U27161)	B = STS 12-EM30	(#U27146)
J = STS 12-EM10	(#U27154)	R = STS 12-RM118	(#U27162)
C = STS 12-EM14	(#U27147)	K = STS 12-EM37	(#U27155)
S = STS 12-RM119	(#U27163)	D = STS 12-EM31	(#U27148)
L = STS 12-RM146	(#U27156)	T = STS 12-EM2	(#U27164)
E = STS 12-CH11	(#U27149)	M = STS 12-RM145	(#U27157)
U = STS 12-EM4	(#U27165)	F = STS 12-EM18	(#U27150)
N = STS 12-RM151	(#U27158)	V = STS 12-EM3	(#U27166)
G = STS 12-EM11	(#U27151)	O = STS 12-EM16	(#U27159)
W = STS 12-EM15	(#U27167)	H = STS 12-CH10	(#U27152)
P = STS 12-EM1	(#U27160)	X = STS 12-EM17	(#U27168)

STS 12-CH5	(#U27136)	STS 12-CH9	(#U27142)
STS 12-RM33	(#U27131)	STS 12-RM53	(#U27134)
STS 12-RM76	(#U27132)	STS 12-RM86	(#U27133)
STS 12-RM98	(#U27147)	STS 12-RM99	(#U27130)
STS 12-RM103	(#U27189)	STS 12-RM130	(#U27139)
STS 12-RM132	(#U27138)	STS 12-RM133	(#U27137)
STS 12-RM151	(#U27158)		

Obrázek 3

Tento obrázek schematicky znázorňuje FISH mapující data, získaná z nádorových buněčných linií s odchylkami chromozomu 12q13-q15, zahrnujících 8 lipomových buněčných linií, 10 děložních leiomyomových buněčných linií a 8 pleomorfních adenomních buněčných linií slinných žláz v závěrečných experimentech, následujících po raných studiích FISH. Použité sondy zahrnovaly fágové klony pRM144 (odpovídající STS: RM86 a RM130) a pRM147 (RM151) a kosmidové klony 7D3 nebo 152F2 (RM103), 154F9 (CH9), 27E12 (EM11), 211A9 (RM33), 245E8 (RM53), 185H2 (RM76), 202A1 (RM98), 142H1 (RM99), 154B12 (RM132) a 124D8 (RM133). Určilo se, že DNA interval mezi RM33 a RM98 představuje přibližně 445 kb. Tečky označují konečné (potvrzující) FISH experimenty, které se prováděly na metafázových chromozomech příslušné buněčné linie, používající jako molekulovou sondu klon, obsahující STS uvedené v rámečcích v horní části obrázku. Plné čáry označují DNA intervaly, které byly vymezeny zlomovými body příslušné buněčné linie, která má být mapována. Prázdné trojúhelníky označují delece, pozorované během FISH analýzy. Prázdné kruhy označují výsledky FISH experimentů na metafázových chromozomech Li-501/SV40 buněk s hybridizačními signály na cytogeneticky normálním chromozomu 3. Pozice zlomových bodů chromozomu 12 nádorových buněčných linií, zmapovaných vně MAR, jsou naznačeny pomocí šipek. Molekulárně klonované zlomové body LM-30.1/SV40 a LM-608/SV40 jsou označeny hvězdičkami. Zlomové body v různých děložních leiomyomových buněčných liniích, rozdělující kosmid 27E12 (EM11) je značen pomocí „across“.

Obrázek 4

Obrázek 4 znázorňuje 3'-RACE produkt, obsahující spojení mezi částí HMGI-C genu a částí LPP genu. Obrázek dále znázorňuje použité primery a jejich spojení. Syntéza cDNA byla primerována vnitřně a nikoliv na skutečném poly(A) konci.

Obrázek 5

Tento obrázek znázorňuje parciální cDNA sekvence LPP genu.

Obrázek 6

Tento obrázek znázorňuje aminokyselinovou sekvenci LPP genu. LIM domény jsou uvedeny v rámečcích. Zlomový bod je označen šipkou.

Obrázek 7

~~Obrázek 7 znázorňuje nukleotidovou sekvenci HMGI-C~~
(U28749). Transkripční startovací místo je označeno způsobem, který navrhl Manfioletti a kol. [Manfioletti, G. a kol., cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. Nucl. Acids Res. **19**, 6793-6797 (1991).] bylo zvoleno jako startovací místo. Tato sekvence obsahuje úplnou kódovací sekvenci.

Obrázek 8

Obrázek 8 znázorňuje gel PCR produktů, získaných způsobem popsaným v příkladu 5.

Příklady provedení vynálezuPříklad 11. Úvod

Tento příklad popisuje izolaci a analýzu 75 vzájemně se překrývajících YAC klonů a založení YAC kontigu (souboru vzájemně se překrývajících klonů), který zahrnuje přibližně 6 Mb délky genomové DNA okolo místa D12S8 a který rovněž zahrnuje MAR. Orientace YAC kontigu na dlouhém rameni chromozomu 12 se určila pomocí dvoubarevné analýzy FISH. Na základě mapování obsahu STS a restrikční enzymové analýzy se vytvořila fyzikální mapa této 6 Mb DNA oblasti. Tento kontig představoval použitelný zdroj pro cDNA záchyt namířený na identifikační gen umístěný v 12q15, včetně genu přímo ovlivněného různými odchylkami chromozomu 12.

2. Materiály a metody

2.1. Buněčné linie

Při specifikování chromozomu, používajícím somatické buněčné hybridové (CASH) experimenty se použily buněčné linie PK89-12 a LIS-3/SV40/A9-B4. PK89-12, která obsahuje chromozom 12 jako lidský chromozom v křeččím genetickém pozadí, byla již popsána [Warburton, D., Gersen, S., Yu, M.T., Jackson, C., Handelin, B. a Housman, D. (1990). Monochromosomal rodent-human from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing and inserted dominant selectable marker. *Genomics* **6**: 358-366.]. PK89-12 buňky se pěstovaly v DME-F12 médiu, doplněném 10% fetálním bovinním sérem, 200 IU/ml penicilínu a 200 µg/ml streptomycinu. Somatický buněčný hybrid LIS-3/SV40/A9-B4 se získal jako důsledek fúze buněčné linie LIS-3/SV40 myxoidního liposarkomu, která nesla t(12;16) (q13;p11.2) a myších A9 buněk, a ukázalo se, že obsahují der(16), ale neobsahují der(12) ani normální chromozom 12 [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Claussen, U., Horsthemke, B., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1993). Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16) (q13;p11.2) from a myoxid liposarcoma cell line. *Cytogenet. Cell Genet.* **62**: 159-161.]. LIS-3/SV40/A9-B4 buňky se pěstovaly v selektivním AOA médiu (AOA médium, které tvořilo DME-F12 médium, doplněné 10% fetálním bovinním sérem, 0,05 mM adeninu, 0,05 mM ouabainu a 0,01 mM azaserinu). Obě buněčné linie se často testovaly pomocí standardních cytogenetických technik.

2.2. Nukleotidová sekvenční analýza a oligonukleotidy

Nukleotidové sekvence se určily podle dideoxy řetězové terminační metody za použití T7 polymerázové sekvenční sady (Pharmacia/LKB) nebo dsDNA cyklického sekvenčního systému (GIBCO/BRL). DNA fragmenty se subklonovaly v pGEM-3Zf(+) a sekvencovaly pomocí standardních primerů SP6 nebo T7, označených pomocí FITC, nebo specifických primerů syntetizovaných na základě nově získaných sekvencí. Sekvenční výsledky byly získány pomocí ALF (Automated Laser Fluorescent) DNA sekvenčního zařízení (Pharmacia Biotech) a standardních 30cm, 6% gelů Hydrolink, Long Range (AT Biochem). Nukleotidové sekvence se analyzovaly za použití sekvenčního analytického programu Genepro (Riverside Scientific), PC/Gene (IntelliGenetics), programové balení IntelliGenetics Suite (IntelliGenetics, Inc.) a Oligo [Rychlik, W. a Rhoads, R.E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8543-8551.]. Všechny oligonukleotidy se získaly od společnosti Pharmacia Biotech.

2.3. Přípravy chromozomů a fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

FISH analýza YAC klonů se prováděla s cílem stanovit chromozomové pozice YAC klonů a identifikovat chimerické klony. FISH analýza kosmidových klonů odpovídajících STS YAC inzertním koncům měla za cíl stanovit jejich chromozomové pozice. Kosmidy se izolovaly z lidské genomové knihovny CMLW-25383 [Verbeek, J.S., Roebroek, A.J.M., Van den Ouweland, A.M.W., Bloemers, H.P.J. a Van de Ven, W.J.M.

(1985). Human c-fms proto-oncogene: comparative analysis with an abnormal allele. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 422-426.] nebo ze shromážděné specifické knihovny chromozomu 12, vytvořené v Národní knihovně Lawrence Livermore (LL12NC01, viz Montgomery, K.T., Le Blanc, J.M., Tsai, P., McNinch, J.S., Ward, D.C., De Jong, P.J., Kucherlapati, R. a Krauter, K.S. (1993). Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development STSs from cosmids mapped by FISH. *Genomics* **17**: 682-693.) pomocí standardních postupů [Sambrook, J., Fritsch, E.F. a Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.]. Rutinní FISH analýza se provedla v podstatě již popsáným způsobem [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Claussen, U., Horsthemke, B., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1993). Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myoxid liposarcoma cell line. *Cytogenet. Cell Genet.* **62**: 159-161.; Dal Cin, P., Kools, P., Scot, R., De Wever, I., Van Damme, B., Van de Ven, W. and Van den Berghe, H. (1993b). Molecular cytogenetic characterization of ring chromosomes in adipose tissue tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **68**, 85-90.]. DNA se označily pomocí biotinu-11-dUTP (Boehringer) za použití postupu, který popsal Kievits a kol. [Kievits, T., Dauwerse, J.G., Wiegant, J., Devilee, P., Breuning, M.H., Cornelisse, C.J. a Ommen, G., Pearson, P.L. (1990). Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **53**: 134-136.]. Protizatemňovací médium, tvořené DABCO (2 g/100 ml, Sigma), 0,1 M tris-HCl pH 8, 0,02% Thimerosalem a glycerolem (90%), a obsahující propidiumjodid (0,5 µg/ml, Sigma) jako protibarvivo, se

přidal 15 minut před analýzou vzorků ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axiophot za použití dvoupásmového propouštěcího filtru pro FITC/Texaská červeň (Omega Optical, Inc.). Výsledky se zaznamenaly na film Scotch (3M) 640 asa.

Při dvoubarevných experimentech FISH se LLNL12NC01-96C11 označil digoxigeninem-11-dUTP (Boehringer) a kosmidy LLNL12NC01-1F6 a -193F10 se označily pomocí biotinu-11-dUTP. Shodná množství jednotlivých sond se smísila a tato směs se použila pro hybridizaci. Po hybridizaci se podložní sklička inkubovala 20 minut pomocí Avidinu-FITC a následně promyla způsobem, který popsal Kievits a kol. [Kievits, T., Dauwerse, J.G., Wiegant, J., Devilee, P., Breuning, M.H., Cornelisse, C.J. a Ommen, G., Pearson, P.L. (1990). Rapid subchromosomal localization of cosmids by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **53**: 134-136.]. Následné série inkubací v TNB pufru (0,1 M tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5% Boehringerově blokačním činidle (Boehringer)) a promývání se prováděla v TNT pufru (0,1 M tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20); všechny inkubace se prováděly při teplotě 37°C po dobu 30 minut. V průběhu druhé inkubace se současně aplikoval kozí- α -Avidin-biotin (Vector) a myší- α -digoxigenin (Sigma). Během třetí inkubace se aplikoval Avidin-FITC a králičí- α -myší-TRITC (Sigma). Během poslední inkubace se aplikoval kozí- α -králičí-TRITC (Sigma). Po posledním propláchnutí v TNT pufru, se vzorky promyly dvakrát v 1 x PBS a následně dehydratovaly ethanolovou sérií (70%, 90%, 100%). Jako protibarvivo se použilo protizatemňovací médium obsahující 75 ng/ μ l DAPI (Serva). Vzorky se analyzovaly pomocí výše popsaného fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axiophot.

2.4 Screenování YAC knihoven

YAC klony se izolovaly z CEPH lidských genomových YAC knihoven, označených 1 a 3 [Albertsen, H.M., Abderrahim, H., Cann, H.M., Dausset, J., L Paslier, D. a Cohen, D. (1990). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4256-4260.; Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guasconi, G., Gervy, P., Le Gall, I., Soularue, P., Grinas, L., Bougueleret, L., Bellanné-Chantelot, C., Lacroix, B., Barillot, E., Gesnouin, P., Pook, S., Vaysseix, G., Frelat, G., Schmitz, A., Sambucy, J.L., Bosch, A., Estivill, X., Weissenbach, J., Vignal, A., Riethman, H., Cox, D., Patterson, D., Gardiner, K., Hattori, M., Sakaki, Y., Ichikawa, H., Ohki, M., L Paslier, D., Heilig, R., Antonarakis, S. and Kohen, D. (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* **359**: 380-387.], zpřístupněných Centre d'Etude du Polyphormisme Humain (CEPH). Screenování se provádělo již popsáním způsobem [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, s., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**: 210-222.]. Kontaminační Candida parapsylosis, na kterou bylo možné někdy narazit, se eliminovala přidáním terbinafinu (laskavě dodaným Dr. Dieterem Romerem, Sandoz Pharma LTD, Basle, Švýcarsko) do růstového média (konečná koncentrace: 25 µg/ml). Izolované YAC klony se

charakterizovaly mapováním STS obsahu, gelovou elektroforézou konturou sevřeného homogenního elektrického pole (CHEF) [Chu, G., Vollrath, D. a Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science **234**: 1582-1585.], restrikčním mapováním a hybridizační analýzou a analýzou FISH.

2.5. PCR reakce

K PCR amplifikaci se použil kontrolní přístroj Pharmacia/LKB Gene ATAQ (Pharmacia/LKB) v konečných objemech 100 μ l, obsahujících 10 mM tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% želatiny, 2 mM dNTP, 20 pmolů každého amplimeru, 2,5 jednotek produktu Amplitaq (Perkin-Elmer Cetus) a 100 ng (pro supernádrže) nebo 20 ng (pro nádrže) DNA. Po počáteční pětiminutové denaturaci při 94°C, se provedlo 35 amplifikačních cyklů, z nichž každý zahrnoval jednominutovou denaturaci při 94°C, jednominutové temperování při příslušné teplotě (viz tabulka I) a jednominutovou extenzi při 72°C. PCR reakce se ukončila konečnou pětiminutovou extenzí při 72°C. Výsledky se hodnotily analýzou 10 μ l reakčního produktu na polyakrylamidových minigelech.

2.6. Analýza na bázi gelové pulzní elektroforézy a Southernova přenosu

Analýza na bázi gelové pulzní elektroforézy a Southernova přenosu se provádí přesně takovým způsobem, jaký popsali Schoenmakers a kol. [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**: 210-222.]. Agarózové vložky, obsahující vysokomolekulární YAC DNA (ekvivalent přibližně 1×10^8 kvasnicových buněk), se dvakrát třicet minut uváděly v rovnováhu v přibližně 25 ml TE pufru (pH 8,0) a následně se dvakrát podobně uváděly do rovnováhy při pokojové teplotě. Vložky se následně přemístily do 2 ml eppendorfových zkumavek se zaobleným dnem a dvakrát se 30 minut uváděly do rovnováhy v 500 μ l vhodného 1 x restrikčního pufru při vhodné restrikční teplotě. Následně se po dobu 4 hodin DNA digerovala v agarózových vložkách podle instrukcí dodavatelů (Boehringer) za použití 30 jednotek restrikční endonukleázy na digerační reakci. Po digesci se agarové vložky spolu s vhodnými signálními znaky (markery) molekulové hmotnosti zavedly do 1% agarózy/0,25 x TBE gel, překryly LMP-agarózou a 18 hodin rozměrově frakcionaly na CHEF zařízení (Biorad) při 6,0 V/cm za použití pulzního úhlu 120 stupňů a konstantních pulzních časů, pohybujících se od 10 s (separace na 300 kbp) do 20 s (separace na 500 kbp). V případě velkých restrikčních fragmentů se provedly další běhy, které napomohly separaci fragmentů o velikosti větší než 500 kbp. Elektroforéza se

prováděla při 14°C v 0,25 x TBE. Jako signální znaky molekulové hmotnosti se použily lambda kmenové žebříky (Promega) a připravené zátky, obsahující lambda DNA, nařezané restriční endonukleázou HindIII. Po provedení elektroforézy se gely zabarvily ethidiumbromidem, fotografovaly a ozařovaly UV zářením za použití sady stratalinkerových gelů (Stratagene) při 120 mJ. DNA se následně, během 4 až 16 hodin, přenesla pomocí 0,4 N NaOH jako přenosového pufru na membrány Hybond N⁺ (Amersham). Po přenesení se membrány 15 minut sušily při 80°C, zběžně neutralizovaly ve 2 x SSPE a předhybridizovaly alespoň 3 hodiny při 42°C v 50 ml roztoku, obsahujícího 50 % formamidu, 5 x SSPE, 5 x Denhardtts, 0,1% SDS a 200 µg/ml heparinu. Filtry se následně hybridizovaly 16 hodin při teplotě 42°C v 10 ml roztoku, obsahujícího 50 % formamidu, 5 x SSPE, 1 x Denhardtts, 0,1% SDS, 100 µg/ml heparinu, 0,5% dextransulfátu a 2 až 3 x 10⁶ cpm/ml označené sondy. Potom se membrány nejprve dvakrát promývaly 5 minut ve 2 x SSPE/0,1% SDS při pokojové teplotě, následně 30 minut ve 2 x SSPE/0,1% SDS při 42°C a konečně 20 minut v 0,1 x SSPE/0,1% SDS při 65°C. Filmy Kodak XAR-5 se exponovaly 3 až 16 hodin při 80°C, v závislosti na výkonu sondy. Použily se kontrastní filtry (Kyokko special 500).

2.7. Generování STS z YAC inzertních konců

STS z YAC inzertních konců se získalo pomocí postupu „vectorette - PCR“ v kombinaci s přímou DNA sekvenční analýzou, kterou v podstatě popsali Geurts J. a kol. [Geurts, J., Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R. a Van de Ven, W.J.M. (1994) v „Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNA insert termini in yeast artificial chromosomes“ Meth. Mol. Cell. Biol., 4: 257-265.]. Sady

primerů se vyvinuly a testovaly na lidské genomové DNA, podle výše popsaných postupů. STS budou z důvodu vyšší přehlednosti v celém textu této přihlášky vynálezu označovány pomocí svých zkratkových názvů (například: RM1 namísto STS 12-RM1).

3. Výsledky

3.1. Sestavování YAC kontigu okolo místa D12S8

V předcházejících studiích [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.] byl popsán 800 kb YAC kontig, vyskytující se okolo D12S8. Tento kontig sestává z následujících tří částečných vzájemných překryvů nechimerických CEPH YAC klonů: 258F11, 320F6 a 234G11. Tento kontig se použil jako výchozí bod pro procházení chromozomy, a jeho úkolem je definovat DNA oblast na dlouhém rameni chromozomu 12, který obklopuje zlomové body variety benigních pevných nádorů, které se nacházejí v blízkosti D12S8 a daleko od CHOP. Procházení chromozomy se nejprve provádělo ve dvou směrech až do okamžiku, kdy se získala velikost kontigu, která umožnila spolehlivě určit orientaci tohoto kontigu. Ve dvousměrném a následně jednosměrném kroku procházení chromozomy se použil následující obecný postup. Nejprve se zajistily a sekvencovaly konce YAC klonů rezultující v DNA signální znaky charakterizující jejich pravé a levé strany

(tabulka I). Na základě sekvenčních dat konců čtyřiceti YAC inzertů se vyvinuly primerové sady pro specifickou amplifikaci DNA zakládající STS (místa se sekvenční adresou) (tabulka II). Jejich výskyt na 12q13-qter se určil pomocí analýzy CASH a rovněž pomocí analýzy FISH po izolování odpovídajících kosmidových klonů. Je třeba uvést, že izolované YAC klony se často hodnotí také analýzou FISH, takže se provádí nejen nalezení chromozomového původu těchto inzertů, ale v mnoha případech se provádí i stanovení a definování jejich chimerické povahy. Kromě toho je třeba zdůraznit, že při hodnocení vzájemně se překrývajících YAC klonů a následném řazení se rovněž berou v úvahu data, získaná restriční endonukleázovou analýzou. S následně zvolenými a zhodnocenými sadami primerů se provedlo prohledávání YAC a kosmidových knihoven s cílem izolovat stavební bloky pro sestavení kontigů. Sestavení kontigů se provedlo za použití dat, odvozených z mapování FISH a obsahu STS stejně, jako z restriční endonukleázové analýzy. Při použití tohoto přístupu se založil YAC kontig obsahující 75 vzájemně se překrývajících YAC klonů, pokrývajících přibližně 6 Mb DNA (obr. 1). Ukázalo se, že tento kontig obklopuje zlomové body chromozomu 12 všech studovaných buněčných linií majících spojitost s nádory [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**: 210-222.]. Charakteristiky YAC, které se použily při stavbě tohoto kontigu, jsou uvedeny v tabulce I.

3.2. Založení chromozomové orientace YAC kontigu

Aby se umožnilo nesměrové procházení chromozomy směrem k centromere chromozomu 12, dvoubarevnou interfázovou analýzou FISH se určila orientace DNA oblasti, obklopené STS RM14 a RM26 (přibližná velikost: 1450 kb). Kosmidové klony, odpovídající těmto STS (tj. LL12NC01-1F6 (RM14) a LL12NC01-96C11 (RM26)), se odlišně označily tak, aby vykazovaly zelené, resp. červené signály. Jako referenční místo se označil kosmid LL12NC01-193F10 tak, aby po detekci vykazoval zelené signály. LL12NC01-193F10 byl již v oblasti vzdálené od zlomového bodu LIS-3/SV40 (tj. CHOP) a v blízkosti zlomových bodů chromozomu 12q v lipomové buněčné linii Li-14/SV40 a děložní leiomyomové buněčné linii LM-30.1/SV40 zmapován. Ukázalo se, že LL12NC01-1F6 a LL12NC01-96C11 mapují v blízkosti zlomových bodů 12q v lipomázové buněčné linii Li-14/SV40 a LM-30.1/SV40 děložní leiomyomové buněčné linii. Proto byl LL12NC01-193F10 ukončen, aby mapoval v blízkosti jak RM14, tak RM26 (nepublikované výsledky). Ze 150 hodnocených informativních interfází vykazovalo 18 % pořadí signálů červená-zelená-zelená, zatímco 72 % vykazovalo pořadí signálů zelená-červená-zelená. Na základě těchto pozorování byl vyvozen závěr, že se mapovaný RM26 nachází v blízkosti RM14 a proto se pokračovalo pouze s cílem rozšířit YAC kontig směrem od RM26 (tj. přilehlé) strany našeho kontigu. Dvoubarevným fázovým mapováním byly seřazeny pouze kosmidy obsahující RM14 a RM26; přičemž pořadí všech dalších se vydedukovalo z dat YAC kontigu. Konečně je třeba se zmínit, že chromozomová orientace kontigu, jak byla navržena na základě výsledků dvoubarevných interfázových studií FISH, se nezávisle potvrdila po rozšíření YAC kontigu přes zlomové body chromozomu 12, který je přítomen ve varietě

nádorových buněčných linií. Tato potvrzující informace se získala při extenzivních studiích FISH, při kterých se pozice YAC a kosmidových klonů určily ve vztahu k chromozomovému 12q13-q15 zlomovým bodům primárních lipomů, děložních leiomyomů, pleomorfních adenomů slinných žláz a pulmonálních chondroidních hemartomů nebo odvozených buněčných linií [Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer*. **11**: 106-118.; Kools, P.F.J., Wanschura, S., Schoenmakers, E.F.P.M., Geurts, J.W.M., Mols, R., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H., a Van de Ven, W.J.M. (1995). Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12) (p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **79**: 1-7.; Van de Ven, W.J.M., Schoenmakers, H.F.P.M., Wanschura, S., Kazmierczak, B., Kools, P.F.J., Geurtus, J.M.W., Bartnitzke, S., Van den Berghe, H. a Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13-q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chrom. & Cancer*. **12**: 296-303. (*Genes, Chromosome & Cancer* 12:296-303 (1995);

Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors;

Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan

M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe, and Jörn Bullerdiek;

Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium (W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.);

Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany (S.W., B.K., S.B., J.B.); Kazmierczak, B., Wanschura, S., Rosigkeit, J., Meyer-Bolte, K., Uschinsky, K., Haupt, R., Schoenmakers, E.F.P.M., Bartnitzke, S., Van de Ven, W.J.M. a Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of 12q14-15 rearrangements in three pulmonary chondroid hamartomas. Cancer Res., v tisku].

3.3. Konstrukce fyzikální mapy, získané pomocí vzácně štěpicích enzymů od 6 Mb YAC kontigu okolo D12S8

Southernovy přenosy celé kvasnicové plus YAC DNA, kompletně digerované pomocí vzácně štěpicích enzymů (viz Materiály a Metody) a separované na CHEF gelech, se sekvenčně hybridizovaly pomocí i) STS, použitých pro počáteční průzkum těchto YAC; ii) pYAC4 pravoramenných sekvencí; iii) pYAC4 levoramenných sekvencí; a iv) lidské ALU-opakující se sondy (BLUR-8). Konstrukce široké restriční mapy, která se získala tímto způsobem, se dokončila sondováním PCR-izolovanými STS/YAC koncovými sondami.

Restriční mapy jednotlivých YAC klonů se seřadily a založila se konvenční restriční mapa. Je důležité zde uvést, že celá konvenční mapa, získaná pomocí vzácně štěpicích enzymů, je podepřena alespoň dvěma nezávislými klony, vykazujícími úplnou vnitřní spojitost.

3.4. Fyzikální mapování CA repetice a monomorfních STS/EST

Na základě integrovaných mapujících dat, které byly získány od Second International Workshopu na lidském chromozomu 12 [Kucherlapati, R., Craig, I. a Maryen, P. (1994). Report of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. Cytogenet. Cell Genet. **67**: 246-276.] se dá očekávat, že celá řada publikovaných signálních znaků bude zmapováno uvnitř zde přítomného YAC kontigu. S cílem umožnit úplnou integraci našich mapujících dat s daty získanými někým jiným, byla celá řada signálních znaků STS obsahem zmapována na našem kontigu a ty, co našly pozitiv se následně subklonovaly (primerovou) hybridizací na YAC Southernových přenosech. Mezi signálními znaky, u nichž se zjistilo, že se nacházejí uvnitř zde přítomného kontigu byly CA repetice D12S313 (AFM207xf2) a D12S335 (AFM273vg9) [Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M. a Weissenbach, J. (1994). The 1993-94 Génethon human genetic linkage map. Nature Genetics **7**: 246-339.], D12S375 (CHLC GATA3F02) a D12S56 [Ulinowski, Z., Taylor, K., Griffin, D., Delhanty, J. a Wolfe, J. (1991). D12S56: a highly polymorphic locus on human chromosome 12q14. Ann. Hum. Genet. **55**: 279-282.]. Kromě toho, interferonový gama gen (IFNG) [Trent, J.M., Olson, S. a Lawn, R.M. (1982). Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 7809-7813.], ras-proteinový gen Rap1B [Pizon, V., Leroisey, I., Chadrin, P. a Tavitian, A. (1988). Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a ras-related protein (rap1B). Nucleic Acids Res. **16**: 7719.] a exprimovaný sekvenční konec EST01096 [Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R.,

Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C. a Venter, J.C. (1992). Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* **355**: 632-634.] se mapovaly pomocí primerových sad, které se vyvinuly na základě veřejně dostupných sekvenčních dat (viz tabulka II). Signální znaky, které byly testovány a našly negativ zahrnují D12S80 (AFM102xd6), D12S92 (AFM203va7), D12S329 (AFM249xh9) a D12S344 (AFM296xd9).

4. Diskuse

Tento příklad popisuje zakládání YAC kontigu a konvenční restriční mapy, získané pomocí vzácně štěpících enzymů, překrývající přibližně 6 Mb na 12q15, oblast na dlouhém rameni lidského chromozomu 12 obsahujícího MAR, ve které je zakreslena celá řada opakujících se chromozomových zkratk benigních pevných nádorů, které jsou známy pro mapování.

Rozsah překryvu mezi jednotlivými YAC bezpečně určil umístění celé délky kontigu při přibližně 6 Mb (obr. 1). Je třeba uvést, že zde uvedená rozměrová data pro některé YAC klony se mírně liší od rozměrů, určených pomocí CEPH [Kohen, D., Chumakov, I. a Weissenbach, J. (1993). A first-generation physical map of the human genome. *Nature* **366**: 698-701.]. Tento rozdíl je nejpravděpodobněji způsoben rozdílnými parametry při provádění pulzních gelových elektroforéz v různých laboratořích.

Za použití restričního mapování a analýzy STS-obsahu, byla sestavena konvenční širokorozsahová fyzikální mapa (obr. 1). Celá kompozitní mapa je podepřena alespoň dvojím

překrytím. Restrikční analýzou a analýzou obsahu STS se charakterizovala přes 30 Mb YAC DNA, což odpovídá přibližně pětinasobku průměrného kontigového překryvu. Přestože přirozeně omezené rozlišení, související s technikou pulzní gelové elektroforézy neumožňuje příliš přesná stanovení, ukazuje porovnání omezených mapujících dat, získaných z 500 kb kosmidového kontigu obsaženého ve zde prezentovaného YAC kontigu, velmi dobrou korelaci. Extrapolací z kosmidových dat se stanovila přesnost uvedené fyzikální mapy přibližně na 10 kb.

Výsledky studií fyzikálního mapování, uvedené v této přihlášce vynálezu, umožnily integraci tří genově specifických a rovněž pěti anonymních signálních znaků izolovaných někým jiným (naznačeno mezi šipkami na obrázku 1). Anonymní signální znaky zahrnují jeden monomorfní a čtyři polymorfní signální znaky. Pět již publikovaných jednotlivých kopií STS odvozených z YAC konce (RM1, RM4, RM5, RM7 a RM21) stejně, jako čtyři publikované CA repetice (D12S56, D12S313, D12S335 a D12S375) a tři publikované genově související STS/EST (RAP1B, EST01096 a IFNG) byly umístěny do stejné fyzikální mapy, což usnadnilo (spojování) mapování a identifikaci celé řady znaků/chorobných genů, které mapují danou oblast. Navíc jsme schopni umístit do stejné fyzikální mapy sedmdesát dva DNA signálních znaků odvozených od YAC konců (tabulka I) a osm DNA signálních znaků odvozených od kosmidových konců nebo interinter-ALU-odvozených DNA signálních znaků (CH9, RM1, RM110, RM111, RM130, RM131, RM132 a RM133), které se vyvinuly v průběhu procházení chromozomy. Pro hledání odvozených sekvencí těchto DNA signálních znaků za účelem zjištění přítomnosti repetice se použil automatický mailový server na PYTHIA@anl.gov. Pro čtyřicet tři z těchto

sedmdesáti dvou DNA signálních znaků (uvedených v tabulce II) se vyvinuly sady primerů a odpovídající STS se určily tak, aby byly jedinou kopií pomocí PCR a rovněž pomocí Southernova přenosu lidské genomové DNA. Dvacet devět zbývajících DNA signálních znaků (znázorněných ve žlutých rámečcích) reprezentuje sekvence odvozené od YAC konců, pro které jsme nevyvinuli primerové sady. Předpokládá se, že tyto YAC koncové sekvence se mapují na chromozomu 12 na základě restričního mapování. Konečný obrázek ukazuje celkovou hustotu signálních znaků v této oblasti, která představuje přibližně jeden signální znak na každých 70 kb.

Analýza zde přítomného kontigu odhaluje mnoho oblastí bohatých na CpG, potenciální HTF ostrůvky, o nichž se ví, že mají často souvislost s provozními geny. Tyto CpG ostrůvky jsou nejpravděpodobněji umístěny na koncích 5' ještě neidentifikovaných genů, což ukázalo, že v 90 % případů, ve kterých se tři nebo více restričních míst (při restrikci vzácně štěpicími restriktázami) v YAC DNA shoduje, existuje související gen [Larsen, F., Gundersen, G. a Prydz, H. (1992a). Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *GATA* **9**: 80-85.]. To je dáno pravděpodobně příliš nízkým odhadem počtu genů, které mají být ještě identifikovány v této oblasti, protože 60 % ~~pro tkáň specifických genů nesouvisí s CpG ostrůvky~~ [Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R. a Prydz, H. (1992b). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**: 1095-1107.] a rovněž proto, že je možné z jediného ostrůvku přepsat dva geny s odlišnou orientací [Lavia, P., MacLeod, D. a Bird, A. (1987). Coincident start sites for divergent transcripts at randomly selected CPG-rich island of mouse. *EMBO J.* **6**: 2773-2779.].

I když se ukázalo, že některé z YAC klonů, které se izolovaly z CEPH YAC knihovny 1 jsou chimerickými, vzájemně se překrývajícími YAC klony, které se jeví na základě analýzy FISH restričního mapování a analýzy STS obsahu jako nechimerické, by se mohly získat při každém průzkumu, který by byl v souladu s uvedenou komplexitou knihovny. Stupeň chimerizmu pro CEPH YAC knihovnu 1 je pro zde zkoumanou oblast 18%. Malý počet YAC z CEPH YAC knihovny 3 (pouze 7 MEGA YAC bylo zahrnuto v této studii) neumožňuje spolehlivě určit procento chimerických klonů, přítomných v této knihovně. Vypočtená průměrná velikost YAC odvozených z knihovny 1 činila 381 kb; nechimerické YAC (n=58) měly průměrnou velikost 366 kb, zatímco chimerické YAC (n=12), jak se ukázalo, měly podstatně větší průměrnou velikost; tj. 454 kb.

V podstatě lze říci, že se získal 6 Mb YAC kontig, odpovídající lidské chromozomové oblasti, která je ve varietě benigních pevných nádorů často přeuspořádána. Tento kontig spojuje přes 84 genových míst včetně STS, souvisejících s genem 3. Kromě toho restričním mapováním se zjistilo alespoň 12 CpG ostrůvků, které by měly být příznačné pro zde se vyskytující geny. Konečně, v tomto kontigu byly lokalizovány rovněž 4 CA repetice. Integrace genetických fyzikálních a transkripčních map této oblasti poskytuje základní rámec pro další studie této oblasti chromozomu 12. Počáteční studie se pravděpodobně zaměří na MAR a ULCR12, protože tyto oblasti obsahují oblasti shluků zlomových bodů alespoň tří odlišných typů pevných nádorů. Různé, zde popsané, YAC klony jsou hodnotnými zdroji pro tyto studie. Měly by usnadnit výzkum genů, nacházejících se v této oblasti, a identifikaci těch genů, které přímo

ovlivňují chromozomové 12q anomálie různých benigních pevných nádorů.

Příklad 2

1. Úvod

Ukázalo se, že 1,7 Mb oblast mnohočetných anomálií na lidském chromozomu 12q15 obsahuje současně zlomové body chromozomu 12, které se často nacházejí v různých typech benigních pevných nádorů. V tomto příkladu je popsána identifikace HMG genu uvnitř MAR, která se zdá být patogeneticky relevantní. Za použití pozičního klonování se identifikoval ve 175 kb segmentu MAR HMGI-C gen proteinu vysoce mobilní skupiny a charakterizovala se jeho genomová organizace. Pomocí analýzy FISH se v tomto genu přesně určila většina zlomových bodů sedmi různých typů benigních pevných nádorů. Southernovým přenosem a analýzou na bázi rychlé amplifikace cDNA konců 3' se demonstruje konzistentní přeuspořádání v HMGI-C a/nebo exprese střídajících se HMGI-C traskriptů. Tyto výsledky naznačují vazbu mezi členem HMG rodiny a vývojem benigního pevného nádoru.

2. Materiály a metody

2.1. Buněčná kultura a vzorky primárního nádoru

Nádorové buněčné linie, uvedené na obrázku 3, byly založeny transkripčním postupem [Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Hartl, M., & Bullerdiel, J., In vitro transformation by the SV40 „early region“ of cells from a

human benign salivary gland tumor with a 12q13-q15 rearrangement. Cytogenet. Cell Genet. **53**, 37-39 (1990).] a ten byl popsán již dříve [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiel, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics **20**: 210-222.; Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiel, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chrom. & Cancer. **11**: 106-118.] a v článku Van de Ven a kol., Genes Chromosom. Cancer **12**, 296-303 (1995) [Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors; Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe, and Jörn Bullerdiel; Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium (W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.); Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany (S.W., B.K., S.B., J.B.)]. Buňky rostly v TC199 médiu, doplněném 20% plodovým bovinním sérem a v pravidelných intervalech se testovaly standardními cytogenetickými technikami. Lidské hepatocelulární karcinomové buněčné linie Hep 3B a Hep G2 se získaly z ATCC (depozitní čísla ATCC HB 8064 a ATCC HB 8065) a kultivovaly se v DMEM/F12, doplněném 4% roztokem Ultroseru (Gibco/BRL).

Primární pevné nádory byly získány od různých univerzitních klinik.

2.2. YAC a kosmidové klony

YAC klony se izolovaly z CEPH 1 [Green, E.D. & Olson, M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**, 1213-1217 (1990).] a 3 [Montgomery, K.T. a kol., Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSS from cosmids mapped by FISH. Genomics **17**, 682-693 (1993).] YAC knihovny, za kombinačního použití průzkumu na bázi PCR [Geurts, J.M.W., Schoenmakers E.F.P.M., Mols, R. & Van de Ven, W.J.M. Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNA insert termini in yeast artificial chromosomes. Meth. Mol. Cell. Biol. **4**, 257-265 (1994).] a hybridizační analýzy kolony. Kosmidové klony se izolovaly z kosmidové knihovny, specifické pro testovaný lidský chromozom 12 (LL12NC01) [Nelson, D.L. a kol., polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 6686-6690 (1989).], získané z Lawrence Livermore National Laboratory (P. de Jong). Kosmidové klony, odvozené z LL12NC01, jsou označeny pomocí adres svých mikrotitrových ploten, tj. například 27E12.

Kosmidová DNA se extrahovala pomocí standardních technik zahrnujících čištění přes hroty Qiagen (Diagen). Připravily se agarózové gely, obsahující kvasnice s vysokou molekulovou hmotností + YAC DNA (ekvivalent k 1×10^9

buněk $\times \text{ml}^{-1}$) [Rychlik, W., & Rhoads, R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucl. Acids Res. **17**, 8543-8551 (1989).]. Gely se před tím, než byly podrobeny pulznímu restrikčnímu enzymatickému mapování nebo vytržení YAC konců, zcela dialyzovaly proti čtyřem změnám 25 ml T_{10}E_1 (pH 8,0) a následně proti dvěma změnám 0,5 ml 1 $\times$ restrikčního pufru. Vytržení YAC konců se provedlo za použití postupu „vectorette-PCR“ v kombinaci s přímým sekvencováním DNA pevné fáze, které již bylo popsáno [Rychlik, W. & Rhoads, R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucl. Acids Res. **17**, 8543-8551 (1989).]. Inter-Alu PCR produkty se izolovaly pomocí publikovaných oligonukleotidů TC65 nebo 517 [Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**, 6-13 (1984).], ke kterým se přidaly SalI konce, jejichž úkolem bylo usnadnění klonování. Po ukončení sekvenční analýzy se pomocí počítačového algoritmu OLIGO vyvinuly primerové páry [Rychlik, W., & Rhoads, R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. Nucl. Acids Res. **17**, 8543-8551 (1989).].

2.3. Značení DNA

DNA z YAC kosmidů PCR produktů a oligonukleotidů se značila pomocí celé řady technik. V případě analýzy FISH se kosmidové klony nebo inter-Alu PCR produkty YAC značily pomocí chemicky modifikovaného nukleotidu s označením

bioton-11-dUTP (Boehringer) za použití posunu jednořetězcového zlomu. V případě hybridizací filtru se sondy značily pomocí radioaktivního izotopu α - ^{32}P -dCTP za použití nahodilých hexamerů [Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**, 6-13 (1984).]. V případě PCR produktů, menších než 200 bp, se aplikoval podobný postup, ale pro základní značení reakcí se použily specifické oligonukleotidy. Oligonukleotidy se značily pomocí γ - ^{32}P -ATP.

2.4. Analýza nukleotidových sekvencí a PCR amplifikace

Nukleotidové sekvence se určily způsobem, použitým v příkladu 1. Výsledky sekvencování se analyzovaly pomocí A.L.F. DNA sekvencéru (Pharmacia Biotech.) na standardních 30cm gelech 6% Hydrolink, Long Range (AT Biochem). PCR amplifikace se prováděly v podstatě již popsáným způsobem [Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics **20**: 210-222.].

2.5. Rychlá amplifikace cDNA konců (RACE)

Rychlá amplifikace 3' cDNA-konců (3'-RACE) se prováděla za použití mírné modifikace části postupu GIBCO/BRL 3'-ET. Pro syntézu prvního řetězce cDNA se použil

adaptérový primer (AP2) AAG GAT CCG TCG ACA TC(T)₁₇. Pro iniciační a sekundární kolo PCR se jako „zpětný primer“ použil univerzální amplifikační primer (UAP2) CUA CUA CUA CUA AAG GAT CCG TCG ACA TC. V prvním PCR kole se použily následující specifické „původní primery“:

i) 5'-CTT CAG CCC AGG GAC AAC-3' (exon 1); ii) 5'-CAA GAG GCA GCA CTA GGA-3' (exon 3); nebo iii) 5'-AAC AAT GCA ACT TTT AAT TAC TG-3' (3'-UTR). V druhém PCR kole se použily následující specifické „původní primery“ („uhnížděné primery“ použité jako srovnání s primery v prvním kole): i) 5'-CAU CAU CAU CAU CGC CTC AGA GAG GAC-3' (exon 1); ii) 5'-CAU CAU CAU CAU GTT CAG AAG AAG CCT GCT-3' (exon 4); nebo iii) 5'-CAU CAU CAU CAU TTG ATC TGA TAA GCA AGA GTG GG-3' (3'-UTR). CUA/CAU-zakončení uhnížděných specifických primerů umožnilo použití směrového klonovacího systému CloneAmp (GIBCO/BLR).

3. Výsledky

3.1. Vývoj kosmidových kontigových a STS map segmentu MAR

V průběhu pozičního klonování, zaměřeného na dlouhé rameno lidského chromozomu 12, se zkonstruoval YAC kontig, pokrývající přibližně 5 Mb a obsahující 75 vzájemně se překrývajících YAC. Charakteristiku tohoto kontigu lze nalézt v příkladu 1. Tento kontig vymezuje MAR (viz rovněž obr. 2), ve které se nachází většina zlomových bodů chromozomu 12q13-q15, které se nacházejí ve varietě primárních benigních pevných nádorů (34 nádorů z osmi různých typů testovaného sofaru; tabulka 5) a nádorové buněčné linie (26 linií testovaného sofaru, odvozených z lipomů, děložních leiomyomů a pleomorfních adenomů slinných

žláz; obr. 3) se jeví jako shluk. Byly vyvinuty širokorozpětové STS fyzikální mapy a fyzikální mapy, získané pomocí vzácně štěpících enzymů, a pomocí analýzy FISH se zjistilo, že většina zlomových bodů je zmapována ve 445 kb oblasti MAR, lokalizované mezi STS RM33 a RM98 (viz obr. 2 a 3). Experimenty FISH včetně kontroly extenzivní kvality se prováděly podle již popsaných rutinních postupů [Van de Ven, W.J.M., Schoenmakers, H.F.P.M., Wanschura, S., Kazmierczak, B., Kools, P.F.J., Geurtus, J.M.W., Bartnitzke, S., Van den Berghe, H. a Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13-q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chrom. & Cancer*. **12**: 296-303. ((1995), Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors; Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe a Jörn Bullerdiek; Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium (W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.); Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany (S.W., B.K., S.B., J.B.)); Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**: 210-222.; Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and

characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer*. **11**: 106-118.; Kools, P.F.J., Wanschura, S., Schoenmakers, E.F.P.M., Geurts, J.W.M., Mols, R., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H., a Van de Ven, W.J.M. (1995). Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12) (p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **79**: 1-7.; Kievits, T., Dauwerse, J.G., Wiegant, J., Devilee, P., Breuning, M.H., Cornelisse, C.J. a Ommen, G., Pearson, P.L. (1990). Rapid subchromosomal localization of cosmid by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **53**: 134-136.]. Pro upřesnění distribuce zlomových bodů uvnitř tohoto 445 kb MAR segmentu se vyvinul kosmidový kontig, obsahující 54 vzájemně se překrývajících kosmidových klonů a založila se hustá STS mapa (obr. 2). Tento kosmidový kontig byl dvakrát kontrolován porovnáním s fyzikální mapou, získanou pomocí vzácně štěpících enzymů a mapováním obsahu STS.

3.2. Shlukování zlomových bodů chromozomu 12q ve 175 kb DNA segmentu MAR

Zlomové body chromozomu 12q, zjištěné v různých nádorových buněčných liniích se uvnitř kosmidového kontigu přesně určily pomocí metody FISH (obr. 3). Součástí experimentů FISH, zaměřených na kvalitativní kontrolu [Van de Ven, W.J.M., Schoenmakers, H.F.P.M., Wanschura, S., Kazmierczak, B., Kools, P.F.J., Geurtus, J.M.W., Bartnitzke, S., Van den Berghe, H. a Bullerdiek, J. (1995). Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13-q15 implicated in

various solid tumors. *Genes Chrom. & Cancer.* **12**: 296-303.

((1995), Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors; Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernd Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe a Jörn Bullerdiek; Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium (W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.); Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany (S.W., B.K., S.B., J.B.)); Schoenmakers, H.F.P.M., Kools, P.F.J., Mols, R., Kazmierczak, B., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Dal Cin, P., De Jong, P.J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994a). Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* **20**: 210-222.; Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer.* **11**: 106-118.; Kools, P.F.J., Wanschura, S., Schoenmakers, E.F.P.M., Geurts, J.W.M., Mols, R., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H., a Van de Ven, W.J.M. (1995). Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12) (p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **79**: 1-7.], je testování metafázových růstů zvolených kosmidů, odvozených z normálních lymfocytů. Výsledky analýzy FISH naznačují, že většina (alespoň 18 z 26 případů) zlomových bodů chromozomu

12 v těchto zjištěných nádorových buněčných liniích se nachází ve formě shluků ve 175 kb DNA intervalu mezi RM99 a RM133, což naznačuje, že tento interval tvoří hlavní oblast shluků zlomových bodů. Výsledky analýzy FISH, získané pomocí Li-501/SV40 naznačují, že část MAR se translokovala do zřejmě normálního chromozomu 3; odchylku chromozomu lze potvrdit pomocí aplikovaných cytogenetik. Konečně je zajímavé zmínit fakt, že zlomové body děložních leiomyomových buněčných linií LM-5.1/SV40, LM-65/SV40 a LM-608/SV40 jsou, jak se zjistilo, zmapovány ve stejném kosmidovém zlomu, tj. kosmidu 27E12.

Rovněž se provedly experimenty FISH na osmi různých typech primárních benigních pevných nádorů s chromozomovými 12q13-q15 abnormalitami (tabulka 4). Jako molekulová sonda se použila směs kosmidových klonů 27E12 a 142H1. Souhrnem lze říci, že výsledky FISH studií primárních nádorů se shodovaly s výsledky, získanými pro nádorové buněčné linie. Z pozorování, která ukázala, že zlomové body každého ze sedmi různých typů testovaných nádorů se nacházejí uvnitř stejného 175 kb DNA intervalu MAR, lze usuzovat, že tento interval je rozhodujícím pro vývoj těchto nádorů a může tedy představovat pravděpodobné MAG místo nebo jeho důležitou část(i).

3.3. Identifikace kandidátových genů zmapovaných uvnitř MAR

Při pokusu identifikovat kandidátové geny, zmapované v 175 kb oblasti MAR mezi STS RM99 a RM133, se použilo zachránění 3'-koncového exonu a vytvoření vzorků genomové sekvence (GSS) [Smith, M.W., Holmsen, A.L., Wei, Y.H., Peterson, M. & Evans, G.A. Genomic sequence sampling: a

strategy for high resolution sequence-based physical mapping of complex genomes. *Nature Genetics* **7**, 40-47 (1994).]. Použitím GSS se získala DNA sekvenční data zakončení 4,9 kb BamHI subfragmentu kosmidu 27E12, který, jak ukázala analýza FISH, je rozdělen anomáliemi chromozomu 12 na tři testované děložní leiomyomové buněčné linie. Výzkum BLAST [Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990).] ukázal, že část těchto sekvencí vykazuje sekvenční identitu s veřejně dostupnou cDNA sekvencí (EMBL, registrační číslo Z31595) genu HMGI-C proteinu vysoce mobilní skupiny (HMG) [Patel, U.A. a kol., Expression and cDNA cloning of human HMGI-C phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 63-70 (1994).], což je člen HMG genové rodiny [Bustin, M., Lehn, D.A. & Landsman, D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochem. Biophys. Acta* **1049**, 231-243 (1990).]. Ve světle těchto pozorování byl HMGI-C považován za kandidátový MAG gen a byl studován podrobněji.

3.4. Genomová organizace HMGI-C a přeuspořádání v benigních pevných nádorech

Vzhledem k tomu, že veřejně dostupných je pouze 1200 nukleotidů HMGI-C transkriptu (uvedená velikost přibližně 4 kb [Patel, U.A. a kol., Expression and cDNA cloning of human HMGI-C phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 63-70 (1994).; Manfioletti, G. a kol., cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucl. Acids Res.* **19**, 6793-6797 (1991).], bylo třeba nejprve určit většinu zbývajících nukleotidových sekvencí HMGI-C

transkriptu (genBank, # U28749). To umožnilo následně založit genomovou organizaci genu. Pokud jde o sekvenční data je zajímavé uvést, že CT repetice se objevuje v 5'-UTR HMGI-C a GGGGT-pentanukleotid se opakuje v 3'-UTR, což by mohlo představovat určitou regulační relevanci. Srovnání popsaného s genomovými DNA sekvencemi (GenBank, # U28750, U28751, U28752, U28753 a U28754) genu ukázalo, že HMGI-C obsahuje alespoň 5 exonů (obr. 2). Transkripční orientace genu je směřována směrem k telomeru dlouhého ramene chromozomu. Každý z prvních tří exonů kóduje pravděpodobnou DNA vazebnou doménu (DBD), a exon 5 kóduje kyselinovou doménu, která se separuje od tří DBD mezerníkovou doménou, kódovanou exonem 4. Tři exony, kódující DBD, jsou uspořádány relativně blízko sebe a jsou od dalších dvou exonů odděleny velkým intronem o velikosti přibližně 140 kb, přičemž tyto další exony jsou od sebe odděleny přibližně 11 kb. Za pozornost zvláště stojí ta skutečnost, že pět exonů je dispergovaných v genomové oblasti o velikosti alespoň 160 kb, takže většinou pokrývají celkem 175 kb hlavní, výše popsané, oblasti shluků zlomových bodů MAR. Výsledky molekulárních cytogenetických studií, využívajících jako molekulovou sondu směs kosmidů 142H1 (obsahujících exony 1 až 3) a 27E12 (obsahujících exony 4 a 5), jasně ukazují, že HMGI-C gen je ve většině nádorů a nádorových buněčných linií, které se hodnotily, přímo ovlivněn pozorovanými odchylkami chromozomu 12 (obr. 3; tabulka 4). Tato cytogenetická pozorování byla v případě LM-608/SV40 (výsledky nejsou zařazeny), LM-30.1/SV40 [Schoenmakers, H.F.P.M., Mols, R., Wanschura, S., Kools, P.F.J., Geurts, J.M.W., Bartnitzke, S., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1994b). Identification, molecular cloning and

characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. *Genes Chrom. & Cancer*. **11**: 106-118.] a Ad-312/SV40 nezávisle potvrzena analýzou na bázi Southernova přenosu; přičemž použité sondy zahrnovaly CH76, RM118-A a EM26. Neúspěch při detekci zlomových bodů LM-65/SV40, LM-609/SV40, Ad-211/SV40, Ad-263/SV40, Ad-302/SV40, Li-14/SV40 a Li-538/SV40, prováděné pomocí libovolné z těchto tří sond, se rovněž shodoval s FISH daty, určujícími relativní polohy zlomových bodů v oblasti MAR (viz obr. 3). Tyto výsledky učinily z genu HMGI-C základního kandidáta na MAG gen.

3.5. Exprese odchylných HMGI-C transkriptů v buňkách pevných benigních nádorů

Obsah následujících studií se zaměřil na určování možné odchylné HMGI-C exprese. Počáteční studie založené na Northernovu přenosu ukázaly, že transkripty HMGI-C by nemohly být detekovány v celé řadě normálních testovaných tkání (mozek, srdce, plíce, játra, ledvina, slinivka, placenta, kosterní sval), a stejně tak ani v celé řadě nádorových buněčných linií, jejichž výčet je uveden v tabulce 3 (data nejsou uvedena). Je známo, že koncentrace HMGI-C mRNA v normálních diferencovaných tkáních jsou podstatně nižší než v maligních tkáních [Patel, U.A. a kol., Expression and cDNA cloning of human HMGI-C phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 63-70 (1994).; Manfioletti, G. a kol., cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucl. Acids Res.* **19**, 6793-6797 (1991).]. Jako kontrola byla v Northernových studiích použita hepatomová buněčná linie Hep 3B o níž se ví, že

exprimuje relativně vysoké koncentrace HMGI-C. Snadno se určily dva hlavní HMGI-C transkripty, přibližně o velikosti 3,6 a 3,2 kb; přičemž difference v molekulové hmotnosti jsou pravděpodobně způsobeny rozdíly v jejich 5'-nekódujících oblastech. Při alternativním a citlivějším přístupu, který měl detekovat HMGI-C nebo 3'-odchylné HMGI-C transkripty, se provedly 3'-RACE experimenty. V kontrolních experimentech, používajících širokou škálu tkání a odlišné koncentrace HMGI-C transkriptů (vysoké koncentrace v Hep 3B hepatomových buňkách, střední koncentrace v Hep G2 hepatomových buňkách a nízké koncentrace v myometriu, normální tukové tkáni a pseudomyxomu), se získaly 3'-RACE klony, které, jak se zdá, po molekulárním klonování a analýze nukleotidové sekvence, reprezentovaly perfektní parciální cDNA kopie 3'-HMGI-C mRNA sekvencí; bez ohledu na to, která ze tří zvolených primerových sad se použila (viz metodologie). Případně byly pozorovány RACE produkty nejpravděpodobněji odpovídající latentním nebo odchylně sestřiženým HMGI-C transkriptům; jejichž ektopické sekvence se mapovaly zpět na HMGI-C intron 3 nebo 4.

Při podobných 3'-RACE analýzách deseti různých primárních nádorů nebo nádorových buněčných linií odvozených z lipomu, děložního leiomyomu a pleomorfního adenomu slinných žláz, se detekovaly jak konstantní, tak unikátní PCR produkty. Zdá se, že konstantní PCR produkty jsou ve většině případů perfektními parciálními cDNA kopiemi 3'-HMGI-C mRNA sekvencí. Nejpravděpodobněji pochází z pravděpodobně neovlivněné HMGI-C alely, a lze je považovat za vnitřní kontroly. Zdá se, že unikátní PCR produkty deseti zde přítomných nádorových buněčných vzorků obsahují ektopické sekvence, nakondenzované na HMGI-C sekvence. Ve většině případů se zjistilo, že jsou tyto

ektopické sekvence odvozeny od založených translokačních partnerů, což poskytuje nezávislou evidenci pro translokačně indukovaná přeuspořádání HMGI-C genu. Informace, týkající se nukleotidových sekvencí, diverzních bodů a chromozomových původů ektopických sekvencí těchto RACE produktů, jsou shrnuty v tabulce 5. Je vhodné zmínit, že původy chromozomů ektopických sekvencí byly určeny CASH (chromozomové označení pomocí somatických buněčných hybridů) analýzou pomocí NIGMS lidského/hlodavčího somatického hybridního mapovacího panelu 2, získaného od Coriell Cell Repositories. Chromozomové označení se pro případy pCH1111, pCH172, pCH174, pCH193 a pCH117 nezávisle potvrdilo dalšími údaji, které jsou shrnuty v tabulce 5. Pokud se vezmou v úvahu omezení běžné cytogenetické analýzy, zejména v případech se složitými karyotypy, souhlasí chromozomová označení ektopických sekvencí poměrně dobře s předcházejícím cytogenetickým popisem translokací.

Poněkud neočekávané byly údaje získané při použití Ad-312/SV40, protože dostupná molekulární cytogenetická analýza naznačila, že jeho chromozomový 12 zlomový bod je mapován daleko od HMGI-C genu a vzdálenost od tohoto genu přesahuje 1 Mb [Kools, P.F.J., Wanschura, S., Schoenmakers, E.F.P.M., Geurts, J.W.M., Mols, R., Kazmierczak, B., Bullerdiek, J., Van den Berghe, H. a Van de Ven, W.J.M. (1995). Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12) (p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet. Cytogenet., 79: 1-7.]. Ukázalo se, že tyto ektopické sekvence pochází z chromozomu 1 (přesněji ze segmentu uvnitř M.I.T. YAC kontigu WC-511, který je částečně mapován na 1p22) zavedeného translokačního partnera (obr. 2). Provedení další molekulární analýzy je

potřebné pro přesné definování účinku na funkční expresi odchýleného HMGI-C genu v tomto konkrétním případě. Dále je zajímavé zmínit, že sekvence vycházející z chromozomu 1 zřejmě odstraňuje GGGGT repetici, zjištěnou v 3'-UTR oblasti HMGI-C, protože v RACE produktu již tato repetice není přítomná. Na druhé straně v případě primárního děložního leiomyomu LM-#58 (t(8;12) (q24;q14-q15)), který, jak se ukázalo, má svůj zlomový bod rovněž v oblasti 3'-UTR, byla tato repetice v RACE produktu přítomna. Takže odstranění této repetice není pravděpodobně podstatné pro vývoj nádoru. Výsledky, dosažené za použití nádoru LM-#168.1, ve kterém je X chromozom cytogeneticky označený translokační partner, ukázaly, že ektopické sekvence se odvodily z chromozomu 14 preferenčního translokačního partnera v leiomyomu. Je možné, že zařazení chromozomu 14 nelze v tomto konkrétním případě detekovat pomocí standardního karyotypování jako v případě Li-501/SV40. V primárním lipomu Li-#294 (t(8;12)(q22;q14)), byly detekovány dvě ektopické sekvence. Další CASH analýza, používající hybridní buněčný mapovací panel pro regionální lokalizaci sond na lidský chromozom 8 [Wagner, M.J., Ge, Y., Siciliano, M. & Wells, D.E. A hybrid cell mapping panel for regional localization of probes to human chromosome 8. *Genomics* **10**, 114-125 (1991).] ukázala, že obě tyto sekvence byly odvozeny z chromozomu 8q22-qter (tabulka 5). Je velmi dobře možné, že tyto RACE produkty odpovídají alternativně sestřiženým transkriptům. Konečně ve čtyřech případech (tabulka 5, případy pCH114, pCH110, pCH109, pCH116) se zdá, že RACE produkty odpovídají latentním nebo odchylně sestřiženým HMGI-C transkriptům, protože se zjistilo, že odpovídající ektopické sekvence jsou odvozeny buď z HMGI-C intronu 3 nebo 4. Tyto RACE produkty byly rovněž pozorovány

při výše popsaných kontrolních experimentech. Na závěr je možné říci že detekce odchylných HMGI-C transkriptů v nádorových buňkách poskytuje další silný argument pro HMGI-C, který je konzistentně přeuspořádán různými odchylkami chromozomu 12. Je vhodné uvést, že odchylné HMGI-C transkripty by měly být v jednotlivých případech charakterizovány celou svou délkou před vyslovením jakéhokoliv závěru, týkajícího se biologických implikací.

První a předběžné vyhodnocení izolovaných ektopických sekvencí poskytlo fázové otevřené čtecí rámce různé délky. Například v případě primárního nádoru LM-#25 se již druhý kodon ektopických sekvencí zdál být koncovým kodonem (tabulka 5). Zde je třeba upozornit, že sekvenční data byla získána pouze pro klony, které byly produkovány během dvou kol extenzivní PCR (zahrnující pravděpodobně mutace). V případě Li-501/SV40 je zajímavé zmínit, že při Northernově přenosu izolované ektopické sekvence detekovaly v různých tkáních, včetně srdce, ledviny, jater, plic, slinivky, placenty a kosterního svalů, ale s výjimkou mozku (data nejsou uvedena), transkript, přesahující 10 kb. Protože chromozom 3 je výhodným partnerem při chromozomových 12q13-q15 translokacích v lipomech a protože se zjistilo, že tyto chromozomové 3 zlomové body různých lipomů jsou překryty YAC klonem CEPH192B10, mohl by detekovaný transkript odpovídat genu partnera, výhodného pro pravděpodobný lipom (LPP).

4. Diskuse

V dodatku 1 je uvedeno, že chromozomové 12q13-q15 zlomové body lipomů pleomorfního adenomu slinných žláz a

děložního leiomyomu, v minulosti označovány cytogeneticky nesprávně jako segment q13, q14 nebo q15 chromozomu 12, se shlukují v 1,7 Mb DNA intervalu, označeném jako MAR. Potvrzení tohoto shlukování zlomových bodů představuje nedávná studie Schoenberga Fejza a kol. [Schoenberg Fejzo, M., Yoon, S.J., Montgomery, K.T., Rein, M.S., Weremowicz, S., Krauter, K.S., Dorman, T.E., Fletcher, J.A., Mao, J., Moir, D.T., Kucherlapati, R.S. a Morton, C.C. (1995). Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma and lipoma. Physical mapping of the 12q14-15 breakpoint region in uterine leiomyomata. Genomics **26**: 265-275.], identifikující CEPH mega-YAC rozpětí translokačních zlomových bodů chromozomu 12 ve dvou ze tří popisovaných typů nádorů. Analýza FISH ukazuje, že zlomové body chromozomu 12 sedmi různých typů pevných nádorů se shlukují v relativně malém (175 kb) segmentu MAR. V případě některých nádorových buněčných linií se získala pomocí Southernova přenosu data, která ve všech případech potvrzovala výsledky analýzy FISH. Ze všech těchto pozorování vyplývá, že tento segment MAR tvoří hlavní cílovou oblast pro odchylky chromozomu 12 těchto nádorů, a že pravděpodobně reprezentuje předpokládané MAG místo (místo růstu multinádorových odchylek), které lze považovat za společný jmenovatel těchto nádorů.

V 175 kb MAR segmentu se identifikoval HMGI-C gen a stanovily se charakteristiky jeho genomové organizace. Strukturně HMGI-C kóduje fosforprotein, tvořený třemi pravděpodobnými DNA vazebnými doménami, mezeríkovou oblastí a terminační doménou, zakončenou kyselinovou karboxyskupinou a obsahující potenciální fosforylační místa jak pro kaseinkinázu II, tak pro p34/cdc2 [Patel, U.A. a

kol., Expression and cDNA cloning of human HMGI-C phosphoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 63-70 (1994).; Manfioletti, G. a kol., cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucl. Acids Res.* **19**, 6793-6797 (1991).]. Z těchto studií vyplývá, že HMGI-C je hlavním kandidátem pro cílový gen v různých typech zde testovaných nádorů. Při studiích FISH se zjistilo, že 29 ze 33 zlomových bodů primárních nádorů je zmapováno mezi dvěma vysoce informativními kosmidy 142H1 a 27E12, přičemž první z nich obsahuje tři exony kódující DBD a druhý obsahuje zbývající exony, které kódují dvě další domény. Takže většina těchto zlomových bodů je zmapována uvnitř zmíněného genu, přičemž většina z nich se pravděpodobně nachází ve 140 kb intronu (intronu 3), což rovněž odpovídá výsledkům analýzy FISH, získaným při hodnocení 26 nádorových buněčných linií. Je třeba uvést, že 5'-konec HMGI-C genu není ještě zcela charakterizován. Protože je známo, že HMGI(Y), což je další člen této genové rodiny, vykazuje různé alternativní první exony [Friedman, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. & Reeves, R. Organization, inducible-expression and chromosome of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucl. Acids Res.* **21**, 4259-4267 (1993).], velikost HMGI-C genu může být větší, než se předpokládá. Další důkaz toho, že HMGI-C je ovlivněn odchylkami chromozomu 12 lze vydedukovat z výsledků 3'-RACE experimentů. Odchylné HMGI-C transkripty byly zjištěny v nádorových buňkách, tvořených přepsanými HMGI-C sekvencemi kondenzovanými na nově získané sekvence, které ve většině případů zřejmě pocházejí z chromozomů, které byly cytogeneticky identifikovány jako translokační partneři. Ukázalo se, že mnoho chromozomů se nachází ve studovaných

nádorech jako translokační partner. Tato heterogenita v převrácených oblastech zlomových bodů při zmíněných translokacích připomíná varietu hematologických malignancí s chromozomovým 11q23 přeuspořádáním, zahrnujícím MLL gen [Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149 (1994).], jehož translační produkt nese motiv zakončený aminoskupinou, příbuzný s motivy, vážícími DNA HMGI proteinů.

Spekulativní výsledky se týkají vlivu odchylek chromozomu 12 na expresi HMGI-C genů a přímý vliv na fyziologické implikace. Některé funkční vlastnosti HMGI-C jsou známy nebo mohou být spekulativně odvozeny ze studií dalších členů této genové rodiny. Protože se váže v minoritním žlábků DNA, dá se předpokládat, že HMGI-C může hrát určitou roli při organizování satelitního chromatinu nebo působit jako transkripční faktor [Yang-Yen, H.F. & Rothblum, L.I. Purification and characterization of a high-mobility-group-like DNA-binding protein that stimulates rRNA synthesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3406-3414 (1988).; Reeves, R., Langan, T.A. & Nissen, M.S. Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1671-1675 (1991).]. Studie, prováděné na HMGI(Y), který je členem nejbližší příbuzným HMGI-C, navrhl, že HMGI(Y) může působit jako pomocný faktor pro NF- κ B transkripční aktivity, specifické pro promotor [Thanos, D. & Maniatis, T. The high mobility group protein HMGI(Y) is required for NF- κ B-dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* 71, 777-789 (1992).]. Rovněž se ukázalo, že HMGI(Y) stimuluje nebo inhibuje DNA vaznost distinktních ATF-2 isoformů transkripčního faktoru [Du, W. & Maniatis, T. The

high mobility group protein HMGI(Y) can stimulate or inhibit DNA binding of distinct transcriptional factor ATF-2 isoforms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 11318-11322 (1994).]. Obě studie naznačují, že protein může jednoduše tvořit strukturní složku transkripčního aparátu, fungujícího ve smyslu promotoru a zesilovače. Nedávno bylo poukázáno na protein vysoce mobilní skupiny (HMG1), což je ještě další člen HMG genové rodiny s podobnou doménovou strukturou jako HMGI-C, který působí jako kvazi-transkripční faktor při genovém přepisu a jehož zkrácený HMG1 protein postrádá oblast končící kyselinovou karboxyskupinou a inhibuje, jak se ukázalo, genový přepis [Aizawa, S., Nishino, H., Saito, K., Kimura, K., Shirakawa, H. & Yoshida, M. Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: Essential role of acidic carboxy-terminal region. Biochemistry **33**, 14690-14695 (1994).]. Rovněž bylo zjištěno, že kyselinové zakončení HMG1 molekuly je, kromě eliminace represe způsobené navázáním DNA, podstatné pro zvýšení genové exprese. Protože se většina zlomových bodů chromozomu 12 nachází ve 140 kb intronu, dochází k separaci DBD domény zakončené karboxylovou skupinou poměrně často. V případě kyselinové domény v HMGI-C má podobnou funkci jako v HMGI(Y), přičemž výsledkem odchylek chromozomu 12 je pravděpodobně ovlivnění genové exprese. Konečně je třeba zmínit, že předurčení sekvencí kódujících oblast zakončenou kyselinovou karboxylovou skupinou není doposud známo.

Protože HMGI-C je prvním členem HMG genové rodiny, která se může podílet na vývoji benigních nádorů, vyvstává zde otázka, zda lze výše získané poznatky aplikovat na další členy této rodiny. HMG proteinová rodina je tvořena třemi podrodinami: i) typem proteinů HMG1 a 2, které, jak

se zjistilo, zvyšují transkripci in vitro a mohou být velmi dobře členy větší třídy regulátorů s HMG boxy; ii) nahodile svinutými proteiny HMG14 a 17 s ještě neznámou funkcí; iii) HMGI-typem proteinů, které se váží do menšího žlábků a zahrnují HMGI-C, HMGI a HMGI-Y; přičemž poslední dvě jsou kódovány stejným genem. Je zajímavé zmínit, že publikované, zmapované polohy členů HMG rodiny odpovídají publikovaným zlomovým bodům chromozomů benigních pevných nádorů, které zde byly popsány. HMGI(Y) gen byl například zmapován na lidském chromozomu 6p21 [Friedman, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y. & Reeves, R. Organization, inducible-expression and chromosome of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. Nucl. Acids Res. **21**, 4259-4267 (1993).] který, jak je známo, je zahrnut v souběžných translokacích, pozorovaných v děložním leiomyomu, lipomu a pleomorfním adenomu slinných žláz [Mitelman F. (1994): Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. 4. vyd., New York, Wiley-Liss.]. Jak je uvedeno v lidské genomové databázi, ne všichni známi členové HMG rodiny jsou v současnosti chromozomálně označeni, ačkoliv poloha některých z těchto členů byla relativně přesně zmapována. Například HMG17 pro chromozom 1p36.1-p35, HMG1L pro 13q12 a HMG14 pro 21q22.3 představují chromozomové segmenty, ve kterých byly zjištěny chromozomové zlomové body zde studovaných typů nádorů [Mitelman F. (1994): ~~Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. 4. vyd., New York, Wiley-Liss.~~]. Nyní zbývá zjistit, zda jsou HMGI(Y), nebo libovolný další člen této HMG skupiny, skutečně ovlivněny v dalších podskupinách těchto nádorů. Za zmínku stojí dále syndromy, například Bannayan-Zonana (McKusick # 153480), Proteus (McKusick # 176920) a Cowden (McKusick # 158350); přičemž poslední syndrom se rovněž označuje jako mnohočetný hemartomový syndrom. V 60 % jedinců s

kongenitálním Bannayan-Zonana syndromem byly zjištěny makrocefalie s mesodermálními hemartomy, diskrétními lipomy a hemangiomy [Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. Nature 372, 143-149 (1994).].

Konečně posledním faktem vyplývajícím ze získaných výsledků, který by neměl uniknout pozornosti, je to, že všechny hodnocené nádory v této studii byly mesenchymálního původu nebo obsahovaly mesenchymální složky. Zajímavé by bylo zjistit, zda je pozorované zařazení HMGI-C specifické pouze pro nádory mesenchymálního původu, nebo zda-li se může nacházet rovněž v nádorech jiného původu. Různé, zde popsané DNA klony jsou hodnotnými zdroji pro zjištění těchto důležitých faktů, které mohou usnadnit studie výsledné implikace HMGI-C genů v genezi nádorů.

Příklad 3

Přeuspořádání dalšího členu HMG genové rodiny

1. Úvod

Tento příklad jasně ukazuje, že v dané nádorové entitě (tj. pulmonálních chondroidních hemartomech, děložních leiomyomech a endometriálních polypech) dojde ke vzniku ~~histologicky=prakticky=vzájemně nerozlišitelných nádorů~~ v případech, že je HMGI-C gen nebo HMGI(Y) gen ovlivněn chromozomovým přeuspořádáním. Takže ve skutečnosti je možné definovat skupinu genů, která vede k abnormálnímu mesenchymálnímu růstu a zahrnuje neomezujícím způsobem HMGI-C a HMGI(Y).

2. Materiál a metody

2.1. Příprava chromozomu

Příprava chromozomu se prováděla následujícími rutinními způsoby. Buňky se ošetřily 30 μ l colcemidu (10 μ d/ml) v průběhu dvou až tří hodin a následně se sklídily za použití trypsinové metody (0,05 % trypsinu a 0,02 % EDTA) a následně se podrobily dvacetiminutovému hypotonickému šoku v šestinásobně naředěném médiu TC 199 při pokojové teplotě a fixaci směsí methanolu a kyseliny octové (3 : 1). Chromozomy se následně GTG-pásmovaly.

2.2. Hybridizace insert situ

Hybridizace in situ se provedla způsobem popsaným v jednom z předcházejících příkladů.

2.3. Průzkum PAC knihovny

PAC knihovna (Genome Systems Library Screening Service, St. Louis, Missouri, USA) byla prozkoumávána metodou PCR za použití primerové sady, specifické pro HMGI(Y) gen. Pro průzkum byl navržen původní primer s následující sekvencí:

5'-CTC CAA GAC AGG CCT CTG ATG T-3' (intron 3)

a zpětný primer:

5'-ACC ACA GGT CCC CTT CAA ACT A-3' (intron 3)

poskytující fragment 338 bp. Pro amplifikaci následující konečné cyklizace se použilo: 94°C, 5 min, (94°C, 1 min, 59°C, 1 min, 72°C, 2 min) x 30, 72°C, 10 min.

2.4. DNA přípravky z PAC klonů

Bakteriální kolonie, obsahující jednoduché PAC klony, se inkubovaly v LB médiu a nechaly růst přes noc při 37°C. 660 µl této kultury se doředilo do 25 ml LB média a klony rostly na OD₅₅₀ 0,05 až 0,1. Přidáním IPTG do konečné koncentrace 0,5 mM se indukoval P1 lytický replikon. Po přidání IPTG se pokračovalo v růstu na OD₅₅₀ 0,5 až 1,5 a plasmid DNA se extrahoval za použití alkalického lyzového postupu doporučeného genomovými systémy.

3. Výsledky

Primerová sada pro průzkum lidské PAC knihovny se navrhla ze sekvencí, příslušících intronu 3 HMGI(Y). Vzhledem k sekvenční homologii mezi HMGI-C a HMGI(Y) amplifikovanou sekvencí 338 bp bylo možno testovat homologickým průzkumem, specifickým výlučně pro HMGI(Y). Průzkum knihovny poskytl tři pozitivní PAC klony, které měly průměrnou délku inzertu přibližně 100 kb. Dva z těchto klonů (Pac604, Pac605) se použily pro následující FISH studie. Pro potvrzení přeuspořádání HMGI(Y) v nádorech s translokacemi, zahrnujícími 6p21.3 buď v jednoduché nebo složité formě, se použila analýza FISH na rozšíření ~~metafáze ze čtyř primárních pulmonálních chondroidních~~ hemartomů a dvou endometriálních polypů s abnormalitou 6p21.3. V každém případě se hodnotilo 20 metafází. Alespoň jeden ze dvou výše popsaných PAC klonů Pac604 a Pac605 byl přetnut zlomovým bodem ve všech šesti analyzovaných případech. Tyto výsledky jasně ukazují, že zlomové body těchto nádorů se zde zjištěnými abnormalitami 6p21 se shlukují buď v HMGI(Y) genu nebo v jeho těsné blízkosti.

Příklad 4

Hybridní HMGI-C v lipomových buňkách

Izolovaly se cDNA klony genu LPP, představujícího výhodného partnera lipomu odvozeného od chromozomu 3 (>50 kb) a stanovila se jejich nukleotidová sekvence. Data kompozitu cDNA jsou znázorněna na obrázku 4. Identifikoval se otevřený čtecí rámec pro protein (612 aminokyselin (aa)) s aminokyselinovou sekvenční podobností (přes 50 %) s kuřecím zyxinem. Zyxin je členem LIM proteinové rodiny, jejíž všechny členy obsahují tak zvané LIM domény [Crawford, A.W., Pino, J.D. & Beckerie, M.C.J., Cell. Biol., 124, 117-127 (1994).]. LIM domény jsou na cystein bohaté proteinové sekvence vážící zinek, které se nacházejí v rostoucím počtu proteinů s diverzními funkcemi, včetně transkripčních regulátorů, proto-onkogenových produktů a složek adhezních plak. Zjistilo se, že mnoho členů LIM rodiny hraje určitou roli při signalizaci buněk a kontrolách předurčení buněk během vývoje. V nedávné době bylo dokázáno, že LIM domény jsou modulárními rozhraními, vážícími proteiny [Schmeichel, K.L. & Beckerie, M.C. Cell, 79, 211-219 (1994).]. Podobně jako zyxin, který se nachází na místech buněčného přilnutí k extracelulární matici a k dalším buňkám, bude odvozený protein, kódovaný pomocí LPP (obr. 6), vykazovat tři domény a postrádat klasické homeodomény, vážící DNA.

Ve 3'-RACE analýze Li-501/SV40 se identifikoval HMGI-C, obsahující kondenzační transkript, z něhož je možné předpovědět hybridní protein (324 aa), a který se následně navrhne tak, aby obsahoval tři DBD (83 aa) HMGI-C a karboxylové konce těchto tří LIM domén (241 aa), kódovaných pomocí LPP. Při PCR analýze, používající příslušné sady uhnížděných amplimerů se v různých primárních lipomech a

lipomových buněčných liniích, nesoucích $t(3;12)$ a rovněž v cytogeneticky normálním lipomu detekovaly podobné HMGI-C/LPP hybridní transkripty. Tato data ukázala, že cytogeneticky detekovatelné a rovněž skryté $t(3;12)$ translokace v lipomech mají za následek fúzi molekul HMGI-C, vážících DNA na předpokládaná molekulová rozhraní proteinu kódovaného pomocí LPP, vážící protein ve fázi, čímž se kyselinová doména HMGI-C nahradila LIM doménami. Následně tato rozhraní, vážící protein, která se nejpravděpodobněji nachází v okolí jádra těchto lipomových buněk, mohla ovlivnit genovou expresi, což může vést k odchylné růstové kontrole. Mimo velkou varietu benigních mesenchymálních nádorů s odchylkami chromozomu 12q13-q15 je toto první příklad chromozomového translokačního partnera, který přispívá současně a následně k vytvoření dobře definovaného HMGI-C fúzního proteinu, souvisejícího s nádorem.

Obrázek 5 znázorňuje cDNA sekvenci zcela izolovaného LPP genu.

Příklad 5

Diagnostický test pro lipom

Pacientovi, majícímu lipom se odebrala biopsie. Z takto získaného materiálu se pomocí standardního postupu TRIZOL LS od společnosti GIBCO/BRL, popsaného v manuálu výrobce, extrahovala celá RNA. Tato celá RNA se použila pro přípravu prvního řetězce cDNA, který se připravil pomocí reverzní transkriptázy (GIBCO/BRL) a oligo dT(17) primeru, obsahujícího navázaný krátký, dodatečný nukleotidový úsek.

Sekvence použitého primeru je popsána v příkladu 2, odstavci 2.5. RNáza H se následně použila pro separování RNA ze syntetizované DNA/RNA hybridní molekuly. PCR se provedlo za použití genově specifického primeru (příklad 2, odst. 2.5.) a primeru, komplementárního k navázanému krátkému doplňkovému nukleotidovému řetězci. Takto získaný PCR produkt se analyzoval pomocí gelové elektroforézy. Fúzní konstrukty se detekovaly srovnáním s pásy pozadí normálních buněk stejného jedince.

V dalším experimentu se provedlo druhé kolo polouhnízděných PCR za použití jednoho vnitřního primeru a primeru, komplementárního ke krátkému nukleotidovému úseku. Tím se značně zvýšila citlivost testu.

Obrázek 8 znázorňuje typický gel.

Příklad 6

Odchytky 12q14-15 a 6p21 v pulmonálních chondroidních hemartomech

1. Úvod

Pulmonální chondroidní hemartomy (PCH) se často detekují při rentgenování plic, jako tzv. „korunové léze“. Nicméně plicní metastázy maligních nádorů, a řidčeji plicní rakoviny, mohou rovněž existovat jako korunové léze. Tento příklad ukazuje, že ke správnému rozlišení většiny PCH a maligních nádorů lze použít metodu FISH, vyžadující minimální množství nádorových buněk. Tento test lze tedy úspěšně aplikovat například na nádorové buňky, získané pomocí tenké jehly.

2. Materiály a metody

V této studii byly zahrnuty vzorky z 80 histologicky charakterizovaných PCH. Buněčné kultury se získaly způsobem popsaným v předcházejících příkladech a rovněž příprava chromozomu a analýza FISH se prováděly způsoby již popsanými v předcházejících příkladech.

3. Výsledky

Cytogenetické studie ukázaly, že 80 PCH, studovaných cytogeneticky, poskytlo 51 detekovatelných odchylek, zahrnujících buď 12q14-15 nebo 6p21. Pomocí analýzy FISH, používající buď skupinu kosmidů příslušících k HMGI-C genům, nebo PAC klony HMGI(Y), popsané v předcházejícím příkladu, se detekovala skrytá strukturní přeuspořádání těchto oblastí ve čtyřech dalších případech (tři se začleněním 12q a jedno se začleněním 6p). Samotný test FISH může být tedy použit jako sada pro přesné detekování, přeuspořádání HMGI-C nebo HMGI(Y) genová přeuspořádání ve více než 50 % PCH, a je tedy hodnotným pomocným nástrojem pro diagnostikování těchto nádorů (aniž by se omezoval na tento typ nádorů, jak bude ukázáno ve dvou dalších případech).

Příklad 7

Diagnóza nádorů měkké tkáně, zejména adipocytového původu

1. Úvod

Nádory adipocytové tkáně často způsobují problémy s diagnostikováním, zejména pokud se materiál odebere z biopsií odebraných tenkou jehlou nebo kryosekcí. Tento příklad ukazuje platnost testu FISH v případě diferenční diagnózy nádorů adipocytové tkáně a řídkých nádorů měkké tkáně.

2. Materiály a způsoby

2.1. Nádorové vzorky

Nádorové vzorky ze tří nádorů měkké tkáně se testovaly pomocí analýzy FISH. První vzorek se získal z adipocytového nádoru a histologicky představoval buď atypický lipom nebo dobře diferencovaný liposarkom. Druhým diagnostikovaným vzorkem byl nejpravděpodobněji myxoidní liposarkom, ale rovně lze uvažovat další typy maligních nádorů měkké tkáně, včetně agresivního agiomyxomu. Třetí nádor byl rovněž adipocytového původu a uvažoval se jak lipom, tak dobře diferencovaný liposarkom.

2.2. Izolace buněk a FISH

Nádorové vzorky se enzymaticky dezintegrovaly následujícími rutinními metodami. Výsledné jednobuněčné suspenze se odstřeďovaly a fixovaly pomocí směsi methanolu

a ledové kyseliny octové (3 : 1), 1 hodinu při pokojové teplotě. Tyto buněčné suspenze se následně nakapaly na čistá a suchá podložní sklička a nechaly stárnout 6 hodin při 60°C. Při analýze FISH se použily molekulové sondy z HMGI-C genu, které byly popsány v předcházejících příkladech.

3. Výsledky

Na interfázové úrovni jak první nádor, tak nádor druhý vykazoval dělicí signály pro jednu z alel. Tato zjištění se slučují s diagnózou benigních nádorů, tj. atypickým lipomem v prvním případě a agresivním agiomyxomem v případě druhém. Tato zjištění umožňují vyloučit přítomnost maligních a dipocytových tkáňových nádorů.

Ve třetím případě analýza FISH zjistila vysoký stupeň amplifikace oblasti MAR nebo její části. Protože amplifikační jednotky, pozorované v obřích signálních znacích, nebo kruhové chromozomy, v dobře diferencovaných liposarkomech, mohou zahrnovat MAR oblast, vedou tato zjištění k diagnostikování dobře diferencovaného liposarkomu. Tři případy, prezentované v tomto příkladu, potvrzují použitelnost popsaných DNA sond. Lze je použít v ~~sadě pro relativně rychlý a jednoduchý interfázový~~ experiment FISH, nabízející další nástroj pro diagnostikování nádorů v měkké tkáni.

Příklad 8

Exprese HMGI-C genu v normální tkáni

1. Úvod

Cílem tohoto příkladu je ukázat, že exprese HMGI-C genu se omezuje hlavně na lidské tkáně, vznikající v průběhu embryonálního a fetálního vývoje, zatímco u většiny normálních tkání dospělé osoby, zejména zahrnujících ty tkáně a orgány, ze kterých mohou vzniknout nádory s HMGI-C přeuspořádáními, nebyla žádná exprese zjištěna. To naznačuje, že i transkripční reaktivace genu může iniciovat genezi nádoru. Na druhé straně je třeba podtrhnout použitelnost protismyslných strategií (včetně těch protismyslných molekul, které směřují k normální HMGI-C mRNA) při inhibici nebo zastavení nádorového růstu.

2. Materiály a metody

2.1. Tkáňové vzorky

Všechny dospělé tkáňové vzorky, použité pro tuto studii, se odebraly z chirurgicky izolované tkáně, zmrazené v kapalném dusíku během 15 minut po chirurgické izolaci těchto tkání. Většina vzorků byla izolována během chirurgického odstraňování nádoru z normální tkáně, sousedící s tímto nádorem. Konkrétně se použilo osm vzorků odebraných z tukové tkáně v různých anatomických místech, dvacet vzorků odebraných z myometrické tkáně, osm vzorků z plicní tkáně, čtyři vzorky ze slinných žláz (Glandula parotis a Glandula submandibularis), jeden tkáňový vzorek odebraný ze srdečního svalu, dvacet pět vzorků odebraných

od pacientů různého stáří z prsní tkáně, dva vzorky z mozku, tři jaterní vzorky, sedm vzorků odebraných z ledvinové tkáně a embryové/fetální tkáně (šest vzorků) z embryí/plodů (desátý až čtrnáctý týden těhotenství) po interrupcích, provedených ze sociálně ekonomických důvodů.

Dále se použily tři buněčné linie: jako kontrolní vzorek HMGI-C exprese se použila hepatomová buněčná linie Hep 3B a buněčná linie L14, získaná z lipomů s typickou translokací t(3;12). Jako negativní kontrola se použily buňky HeLa, protože RT experimenty, reprodukované desetkrát, nezjistily v prováděných studiích HMGI-C expresi.

2.2. RT-PCR pro expresi HMGI-C

100 ml tkáňového vzorku se homogenizovalo a RNA se izolovala pomocí trizolového reakčního činidla (GibcoBRL, Eggenstein, Německo), obsahujícího fenol a isothiokyanát. K syntéze cDNA se použil poly(A)-oligo(dt)17 primer a M-MLV reverzní transkriptáza (GibcoBRL, Eggenstein, Německo). Následně se použila polouhnízděná PCR. Pro první a druhou PCR se použil stejný nižší primer (Revex 4) (5'-TCC TCC TGA GCA GGC TTC-3' (exon 4/5)). V prvním kole PCR se použil specifický vyšší primer (SE1) (5'-CTT CAG CCC AGG GAC AAC-3' (exon 1)) a v druhém kole PCR se použil uhnízděný vyšší primer (P1) (5'-CGC CTC AGA AGA GAG GAC-3' (exon 1)). Obě kola PCR se provedla ve 100ml objemu, obsahujícím 10 mM tris/HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % želatiny, 100 μM dATP, 100 μM dTTP, 100 μM dGTP, 100 μM dCTP, 200 nM vyššího primeru, 200 nM nižšího primeru a jednu jednotku/100 μl

AmpliTaq polymerázy (Perkin Elmer, Weiterstadt, Německo). Amplifikace se prováděla ve třiceti cyklech (1 minuta 94°C, 1 minuta 53°C, 2 minuty 72°C). Jako matrice v prvním kole PCR se použila cDNA, odvozená z 250 ng celkové RNA, a v druhém kole PCR se použil 1 µl první PCR reakční směsi.

2.3. Kontrolní test pro intaktní mRNA/cDNA

Jako kontrolní reakce pro intaktní RNA a cDNA se použil test PCR, založený na amplifikaci cDNA glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) provozního genu. PCR reakce se prováděla ve třiceti pěti cyklech, za stejných podmínek, jaké byly použity ve výše popsaném prvním kole PCR HMGI-C exprese.

3. Výsledky

Všechny experimenty, prováděné ve studiích exprese se zopakovaly alespoň dvakrát. Exprese provozního genu GAPDH se prováděla rutinním RT-PCR způsobem, čímž se zajistilo, aby všechny RNA cDNA přípravky, použité pro RT-PCR byly intaktní (jinak by se dosáhlo nesprávných negativních výsledků). Pozitivní GAPDH RT-PCR poskytla 299 bp fragment. Do této studie se zahrnuly pouze vzorky, poskytující pozitivní GAPDH RT-PCR. Výsledkem RT-PCR v HMGI-C pozitivních buňkách, například Hep 3B a L14, byla detekce specifického 220 bp fragmentu. HeLa buňky nevykazovaly expresi HMGI-C. Kromě dvou myometrických vzorků (pravděpodobně v důsledku submikroskopické hladiny myomů), všechny vzorky normální tkáně, odebrané z dospělých jedinců, nevykazovaly detekovatelnou hladinu HMGI-C

exprese. Na druhou stranu všechny fetální/embryové testované tkáně ukazovaly HMGI-C expresi.

Příklad 9

Exprese HMGI-C genu jako diagnostický nástroj pro včasnou detekci leukémií.

1. Úvod

Cytogeneticky detekovatelné odchylky, ovlivňující HMGI-C gen byly nalezeny v celé řadě různých benigních pevných nádorů mesenchymálního původu. Odchylky zřejmě rovněž vedou ke transkripční aktivaci genů. Vzhledem k tomu, že krevní buňky jsou rovněž mesenchymálního původu, provedla se u leukemiových buněk analýza na HMGI-C expresi. Příklad 9 ukazuje, že aktivace genů v buňkách periferní krve je vhodným signálním znakem, označujícím nezralé buňky a abnormální kmenové buňky, zjištěné při leukémii. Protože exprese HMGI-C lze určit s vysokým stupněm citlivosti, může být RT-PCR metoda pro stanovení exprese genů pro velmi brzkou detekci různých hematologických chorob použita.

2. Materiály a způsoby

Vzorky, získané z periferní krve dvaceti sedmi pacientů s různými typy leukémií, včetně devatenácti pacientů s pozitivním CML chromozomem Philadelphia, pěti pacientů s AML a třemi pacienty s ALL, se použily pro stanovení HMGI-C exprese. Krevní vzorky z patnácti zdravých jedinců se použily jako kontrolní vzorky.

RT/PCR pro expresi HMGI-C se prováděla způsobem, popsaným v příkladu 8.

3. Výsledky

Zatímco exprese HMGI-C byla jasně detekována ve všech krevních vzorcích leukemických pacientů, nebyla zjištěna ani v jednom ze vzorků, odebraným kontrolním osobám. Není zcela zřejmé, zda je transkripční aktivace genů způsobena mutacemi, ovlivňujícími gen nebo jeho okolí. Je rozumnější předpokládat, že aktivace je spíše sekundárním jevem, souvisejícím s nezralostí buněk nebo jejich abnormální proliferací. Nicméně vysoká a dokonce zvýšená senzitivita činí například ze sady, fungující na bázi RT-PCR analýzy exprese HMGI-C genu, velmi vhodný diagnostický nástroj.

Příklad 10

Transkripční reexprese HMGI-C genu může vést k iniciaci nádorů

1. Úvod

Tento příklad jasně ukazuje, že pro chromozomové zlomové body určitých nádorových entit, nacházejících se na 5'-konci HMGI-C genu, rovněž existuje indikace, která se zakládá na skutečnosti, že zvýšená transkripce genu je dostatečná pro iniciaci růstu odpovídajících typů nádorů.

2. Materiály a metody

2.1. Buněčná kultura

Po chirurgické izolaci buněčných vzorků (tří pulmonálních chondroidních hemartomů a jednoho děložního leiomyomu) se tyto vzorky promyly Hankovým roztokem, doplněným penicilínem (200 IU/ml) a streptomycinem (200 µg/ml). Nádory se dezintegrovaly kolagenázou 5 až 6 hodin při 37°C. Suspenze, obsahující malé fragmenty a jednoduché buňky, se resuspendovaly v kultivačním médiu TC 199 s Earleovými solemi, doplněným 20% fetálním bovinním sérem, 200 IU/ml penicilínu a 200 µg/ml streptomycinu.

2.2. Přípravy chromozomů

Pro přípravu chromozomů se použily následující rutinní způsoby. Buňky se ošetřily 30 µl colcemidu (10 µg/ml) v průběhu 2 až 3 hodin a následně sklidily za použití trypsinové metody (0,05% trypsin, 0,02% EDTA), následně se podrobily dvacetiminutovému hypotonickému šoku v šestinásobně naředěném médiu TC 199 při pokojové teplotě a fixaci směsí methanolu a kyseliny octové (3 : 1). Chromozomy se následně GTG-pásmovaly.

2.3. Studie FISH

Pro zřejmou identifikaci chromozomů se po GTG-pásmování stejných metafázových růstů použila analýza FISH. Jako DNA sondy se použilo pět kosmidů, náležících k YAC kontigu překrývajícímu HMGI-C, jak je popsáno v legendě

k obrázku 2. Tři z těchto kosmidů (27E12, 185H2 a 142H1) jsou zmapovány ve třetím intronu HMGI-C, zatímco kosmidy 260C7 a 245E8 se nacházejí na 3', resp. 5'-konci. Podložní skříčka se analyzovala pomocí Zeissova (Zeiss, Oberkochen, Německo) fluorescenčního mikroskopu Axioplan. Výsledky se zpracovaly a zaznamenaly za použití systému „Power Gene Karyotyping System“ (PSI, Halladale, Velká Británie). Rychlá amplifikace cDNA konců (RACE) se provedla způsobem, popsaným v jednom z předcházejících příkladů.

3. Výsledky

Všechny čtyři nádory vykazovaly stejný typ cytogenetické abnormality, tj. přítomnost 47 chromozomů zahrnujících dva zřejmě normální chromozomy 12, a dalších odvozených 14 $\text{der}(14)\text{t}(12;14)(\text{q}14-15;\text{q}24)$, ale bez odpovídajícího $\text{der}(12)$. Vzhledem k orientaci 3'-5' HMGI-C směřující k centromeru, by mohl jediný zlom uvnitř HMGI-C genu vést ke ztrátě 5'-části společně se ztrátou $\text{der}(12)$. Proto byla provedena série experimentů FISH, jejichž úkolem bylo přesnější stanovení zlomových bodů. Při použití pěti kosmidů 260C7, 27E12, 185H2, 142H1 a 245E8 byly u obou normálních chromozomů 12 a v dalším $\text{der}(14)$ pozorovány hybridizační signály o stejné intenzitě. Výsledky analýzy FISH ukázaly, že ve všech čtyřech případech jsou chromozomové zlomové body umístěny na 5'-konci HMGI-C genu.

Zjištění zlomových bodů ve všech čtyřech případech na 5'-konci HMGI-C genu se dobře shoduje s výsledky RACE-PCR. Kromě normálních HMGI-C transkriptů bylo možné ve všech třech nádorech detekovat odchylné transkripty. Sekvence ukázaly, že nejsou odvozeny z chromozomu 14, ale z intronu

3 HMGI-C, pravděpodobně v důsledku skrytých sestřihových míst. Nicméně RACE výsledky ukazují, že HMGI-C exprese je obsažena skutečně ve všech čtyřech případech.

Příklad 11

Přerozdělení leukemických buněk

1. Úvod

Expresa HMGI-C genu je často zjištěna v širokém rozpětí různých nádorů, pevných nádorů a leukémií. Předpokládalo se, že HMGI-C protein může hrát klíčovou roli při transformaci buněk. Tento příklad ukazuje, že exprese HMGI-C genu může být podstatně zredukována exprimováním protismyslných HMGI-C sekvencí, a že redukce HMGI-C hladin v nádorových buňkách má za následek reverzi transformovaného fenotypu, takže exprese nebo podání protismyslných molekul lze úspěšně terapeuticky aplikovat.

2. Materiály a metody

2.1. Nádorové buněčné linie

~~Nádorové buněčné linie se generovaly z primárního~~
maligního nádoru slinných žláz a primárního karcinomu prsu. Buněčné linie se stanovily způsobem, který popsal Kazmierczak, B., Thode, B., Bartnitzke, S., Bullerdiel, J., a Schloot, W., „Pleomorphic adenoma cells vary in their susceptibility to SV40 transformation depending on the initial karyotype“, Genes. Chrom. Cancer 5:35-39 (1992).

2.2. Zkouška transformovaného stavu

Testování měkké agarové kolonie se provedlo způsobem, který popsal Macpherson a Montagnier, „Agar suspension culture for the selective assays of cells transformed by polyoma virus“, Virology **23**, 291-294 (1964).

Buňky slinných žláz a nádoru prsu se propagovaly v TC199 kultivačním médiu s Earleovými solemi, doplněném 20% fetálním bovinním sérem (GIBCO), 200 IU/ml penicilínu a 200 µg/ml streptomycinu.

Tvorba nádorů v případě transfekovaných buněčných linií slinných žláz (AD64) a prsních buněčných linií se testovala podkožním injektováním do athymických myší.

2.3. Transfekční test

Transfekce se prováděly za použití různých postupů, konkrétně se použily:

1. Grahamův a Van der Ebův postup, používající fosforečnan vápenatý („A new technique for the assay of the infectivity of human adenovirus“. Virology **52**, 456 až 467 (1973)).

2. Lipofekce: transfekce se provádějí za použití liposomem zprostředkovaného DNA transferu (lipofectamin, GibcoBRL), podle pokynů výrobce.

2.4. Protismyslné konstrukty

Smyslné a protismyslné konstrukty HMGI-C genu se získaly vložení lidských HMGI-C cDNA sekvencí jak ve

smyslné, tak v protismyslné orientaci v expresních vektorech, za transkripční kontroly různých promotorových kontextů, např. dlouhé terminační repetice Moloneyova myšího leukemického viru, CMV promotoru nebo časného promotoru SV40. CMV/HMGI-C plazmid se například konstruoval klonováním lidského HMGI-C cDNA fragmentu obsahujícího všechny kódovací sekvence lidského HMGI-C v pRC/CMV (Invitogen), umožňujícího expresi pod kontrolou lidského cytomegalovirového časného promotoru a zesilovače a selekci na G418 resistenci.

3. Výsledky

3.1. Reverze transformovaného fenotypu

Reverze transformovaného fenotypu byla pozorována v prsních nádorových buňkách a nádorových buňkách slinných žláz po indukci protismyslné HMGI-C exprese v těchto nádorových buňkách. Silná redukce tvorby nádoru byla zaznamenána měřením za použití testu měkké agarové kolonie a in vivo v athymických myších. Imunologické vysrážení a analýza na bázi Westernova přenosu naznačily silnou redukci úrovně HMGI-C proteinu v buňkách, exprimujících protismyslné HMGI-C sekvence. Tento přístup může být tedy terapeuticky využit u nádorů se začleněním HMGI-C.

Příklad 12

Modely zvířecích nádorů, zahrnující HMGI-C jako nástroje při in vivo terapeutickém testování účinné látky.

Na základě získaných znalostí, týkajících se HMGI-C genu, lze jako nástroje pro in vivo testování účinné látky vyvinout zvířecí nádorové modely. Pro dosažení objektivitu (například v případě děložního leiomyomu) lze použít dva přístupy, konkrétně genový přenos (generace transgenových zvířat) na jedné straně, a technologie cílení genů (imitování in vivo specifické genetické odchylky pomocí homologické rekombinace v embryonálních kmenových buňkách (ES buňkách)) na straně druhé.

Tyto technologie umožňují specifickým a předem navrženým způsobem manipulovat s genetickou konstrukcí komplexu živých systémů. Velké množství technických detailů lze nalézt například v manuálu, jehož autory jsou B. Hogan, R. Beddington, F. Contantini a E. Lacy, „Manipulating the mouse embryo, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1994; ISBN 0-87969-384-3.

Pro dosažení inaktivace nebo mutace HMGI-C genu, konkrétně ve zvolených buněčných typech a zvolených časových okamžicích, je možné použít nedávno popsany Cre/LoxP systém (Gu H. a kol., Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using type-specific gene targeting. Science 265, 103-106, 1994). Tento Cre enzym je rekombinázou z bakteriofágu P1, jehož fyziologickým úkolem je separovat fázové genomy, které se vzájemně spojily během infikování. Za účelem získání takto krátkých sekvencí fágu DNA Cre linií byly označeny loxP místa a odstraněna DNA,

ležící mezi takto označenými místy při ponechání jednoho loxP místa vzadu. Nyní se ukázalo, že tento systém je efektivní pokud je excidování savčích buněk při vysoké účinnosti chromozomové DNA. Tkáňově specifickou inaktivaci nebo mutaci genu, která využívá tento systém, lze získat díky tkáňově specifické expresi Cre enzymu.

Například vývoj zvířecích systémových modelů pro děložní leiomyom, používající člen MAG genové rodiny, bude popsán níže jako nástroj pro in vivo testování terapeutických účinných látek.

Pro testování účinných látek in vivo lze použít dva následující přístupy:

a) in vivo indukování specifických genových odchylek, které byly pozorovány u lidských pacientů ((podmíněný) genově (isogenový) cílený přístup); a

b) zavedení DNA konstruktů, reprezentujících genetické odchylky pozorované u pacientů (genově přenosový přístup).

DNA konstrukty, které mají být použity při genovém přenosu, lze generovat na základě pozorování, provedených u pacientek s děložním leiomyomem, pokud jde o strukturu a expresní kontrolu; například HMGI-C fúzní geny s různými translokačními partnerskými geny, zejména preferenční translokační partnerský gen chromozomu 14, umístěného v YAC kontigu, reprezentovaném CEPH YAC 6C3, 89C5, 308H7, 336H12, 460A6, 489F4, 902F10, 952F5, 958C2, 961E1 a 971F5, zkrácenými geny kódujícími v podstatě tři DNA vážící domény HMGI-C a kompletní HMGI-C nebo deriváty HMGI-C pod kontrolou silného promotoru.

Příklad 13

Příprava protilátek namířených proti HMGI-C

Jedním typem vhodných molekul, pokud jde o použití při diagnostice a terapii, jsou protilátky namířené proti MAG genům. Při přípravě králičích polyklonových protilátek proti HMGI-C se použily následující tři komerčně dostupné peptidy:

(H-ARREGAGQPSTSAQGQPAAPAPQKR) 8-Multiplexní Antigenový Peptid,

(H-SPSKAAQKKAEATGEKR) 8-MAP,

(H-PRKWPQQVVQKKPAQEE) 8-MAP,

které nabízí společnost Research Genetics Inc., Huntsville, AL, USA. Polyklonové protilátky se připravily pomocí standardních technik.

20.04.98

TABULKA I

ANALÝZY YAC KLONŮ

CEPH-kód	Velikost (kb)	Levý mezní bod #	Pravý mezní bod #	Chimerický
183F3	715		[RM10]	ANO (L+P)
70E1	450	RM29 U27125		ND
95F1	390		RM30 U29054	ND
201H7	320	RM13 U29051	RM14 U29053	ND
186G12	320			ND
354B6	280			ANO (P)
126G8	410			ND
258F11	415	RM4 U29052		ND
320F6	290	RM5 U29050	RM21 U29047	ND
234G11	475	RM7 U29046		ND
375H5	290			ND
262E10	510	[RM15]	RM16 U29048	ANO (L)
181C8	470		RM26 U29045	ND
107D1	345	RM31 U29043		ND
499C5	320	RM44 U29044	RM46 U29037	ND
340B6	285			ND
532C12	400	RM45 U29041		ND
138C5	510	[RM59]	RM65 U29042	ANO (L)
145F2	490	RM60 U29030	RM66 U29040	ND
106E8	340	RM57 U29033	RM63 U29038	ND
55G1	365	RM56 U29031	RM62 U29039	ND
103G7	370	RM85 U29025	RM80 U29036	ND
295B10	295	RM77 U29035	RM81 U29026	ND
338C2	200	RM78 U29034	RM82 U29029	ND

20.04.98

TABULKA I (pokračování)

ANALÝZY YAC KLONŮ

CEPH-kód	Velikost (kb)	Levý mezní bod #	Pravý mezní bod #	Chimerický
391C12	160	[RM79]	RM83 U29027	ANO (L)
476A11	225	[RM87]	RM84 U29032	ANO (L)
138F3	460	RM90 U29028	RM91 U29019	ND
226E7	500	RM48 U29024	RM54 U29015	ND
499E9	375	RM51 U29016		ANO (P)
312F10	580	[RM50]	RM69 U29021	ANO (L)
825G7	950			ND
34B5	315	RM88 U29020	RM89 U29013	ND
94A7	610			ANO (P)
305B2	660			ANO (L)
379H1	280	RM104 U29014	RM105 U29009	ND
444E6	350	RM92 U29017	RM93 U29010	ND
446H3	370	RM94 U29011	RM95 U29018	ND
403B12	380			ND
261E5	500	RM102 U29012	RM103 U26689	ND
78B11	425			ND
921B9	1670			ND
939H2	1750			ND
188H7	360			ND
142F4	390			ND
404E12	360			ND
164A3	375			ND
244B12	415	RM106 U29007	RM107 U29008	ND
275H4	345	RM108 U29004	RM109 U29005	ND
320F9	370			ND
51F8	450			ND
242A2	160	CH1 U29006		ND
253H1	400			ND
303F11	320			ND

TABULKA I (pokračování)

ANALÝZY YAC KLONŮ

CEPH-kód	Velikost (kb)	Levý mezní bod #		Pravý mezní bod #		Chimerický
322C8	410			CH2	U29003	ND
208G12	370	RM96	U29002	RM97	U27135	ND
341C1	270	RM98	U26647	RM99	U27130	ND
354F1	270					ND
452E1	270	CH5	U27136			ND
41A2	310					ND
934D2	1370					ND
944E8	1290			CH8	U28792	ND
2G11	350					ND
755D7	1390					ANO (L)
365A12	370					ND
803C2	1080					ND
210C1	395	RM70	U28998	RM86	U27133	ND
433C8	360	RM73	U29000	RM76	U27132	ND
402A7	500	RM41	U28994	[RM42]		ANO (P)
227E8	485	RM53	U27134	RM55	U28996	ND
329F9	275	RM72	U28793	RM75	U28997	ND
261E6	395	[RM71]		RM74	U28995	ANO (L)
348F2	370			[RM136]		ANO (P)
6F3	320	RM35	U27140	RM36	U27141	
59F12	430	RM34	U28794	RM33	U27131	
265H3	300			RM40	U28999	

YAC klony se izolovaly z CEPH YAC knihovny způsobem popsaným v části, nazvané Materiály a metody. ND: nebyly určeny použitými metodami. Mezní body, vymezující širší rozsah než 6 Mb, jsou uvedeny v závorkách. Identifikační číslo genobanky (#).

TABULKA II
PCR primery

STS označení (STS 12-)	Nukleotidová sekvence 5'-3'	Velikost produktu (bp)	T _{temp.} (°C)
CH1	TGGGACTAACGGATTTTCAA TGTGGTTCATTCATGCATTA	213	58
CH2	TCCATCATCATCTCAAAACA CTCTACCAAATGGAATAAACAG	145	58
CH5	GCAGCTCAGGCTCCTTCCCA TGGCTTCCTGAAACGCGAGA	143	58
CH8	TCTCCACTGCTTCCATTAC ACACAAAACCACTGGGGTCT	147	58
CH9	CAGCTTTGGAATCAGTGAGG CCTGGGGAAGAGGAGTAAAG	262	58
RM1	GAGCTTCCTATCTCATCC ATGCTTGTGTGTGAGTGG	308	60
RM4	TTTGCTAAGCTAGGTGCC AGCTTCAAGACCCATGAG	236	60
RM5	CAGTTCTGAGACTGCTTG TAATAGCAGGGACTCACG	324	60
RM7	CTTGTCTCATTCTTTTAAAGGG CACCCCTTTTATAGATCCTAC	538	58
RM13	GAATGTTTCATCACAGTGCTG AATGTGAGGTTCTGCTGAAG	+500	58
RM14	TTCTCATGGGGTAAGGACAG AAAGCTGCTTATATAGGGAATC	158	58
RM16	CCTTGGCTTAGATATGATACAC GCTCTTCAGAAATATCCTATGG	252	58
RM21	CCTTAGCAGTTGCTTGTCTG TCGTCACAGGACATAGTCAC	290	58
RM26	TCTATGGTATGTTATAACAAGATG CAGTGAGATCCTGTCTCTA	102	58
RM31	TCTGTGATGTTTTAAGCCACTTAG AATTCTGTGTCCCTGCCACC	239	56

TABULKA II (pokračování)
PCR primery

STS označení (STS 12-)	Nukleotidová sekvence 5'-3'	Velikost produktu (bp)	T _{temp.} (°C)
RM33	ATTCTTCCTCACCTCCCACC AATCTGCAGAGAGGTCCAGC	+600	60
RM34	AATTCTCCATCTGGGCCTGG GAACGCTAAGCATGTGGGAG	+600	60
RM36	CTCCAACCATGGTCCAAAAC GACCTCCAGTGGCTCTTTAG	296	60
RM46	ACCATCAGATCTGGCACTGA TTACATTGGAGCTGTCATGC	241	57
RM48	TCCAGGACATCCTGAAAATG AGTATCCTGCACTTCTGCAG	391	58
RM51	GATGAACTCTGAGGTGCCTTC TCAAACCCAGCTTTGACTCC	311	60
RM53	GTCTTCAAAACGCTTTCCTG TGGTTTGCATAATGGTGATG	333	60
RM60	TACACTACTCTGCAGCACAC TCTGAGTCAATCACATGTCC	94	58
RM69	CTCCCCAGATGATCTCTTTC CGGTAGGAAATAAAGGAGAG	236	58
RM72	TATTTACTAGCTGGCCTTGG CATCTCAGGCACACACAATG	101	62
RM76	ATTCAGAGAAGTGCCAAGT GGGATAGGTCTTCTGCAATC	496	58
RM85	TCCAACAATACTGAGTGACC TCCATTTCACTGTAGCACTG	435	58
RM86	GTAATCAACCATTTCCCTGA AAAATAGCTGGTATGGTGGC	203	56
RM90	ACTGCTCTAGTTTTCAAGGA AATTTACCTGACAGTTTCCT	257	58
RM93	GCATTTGACGTCCAATATTG ATTCCATTGGCTAACACAAG	347	60

TABULKA II (pokračování)
PCR primery

STS označení (STS 12-)	Nukleotidová sekvence 5'-3'	Velikost produktu (bp)	T _{emp.} (°C)
RM98	GCAAAACTTTGACTGAAACG CACAGAGTATCGCACTGCAT	356	58
RM99	AAGAGATTTCCCATGTTGTG CTAGTGCCTTCACAAGAACC	240	58
RM103	AATTCTTGAGGGGTTCAGTG TCCACACTGAGAGCTTTTCA	199	60
RM108	GTGGTTCTGTACAGCAGTGG TGAGAAAATGTCTGCCAAAT	439	60
RM110	GCTCTACCAGGCATACAGTG ATTCCTAGCATCTTTTCACG	328	58
RM111	ATATGCATTAGGCTCAACCC ATCCACAGGTCAACATGAC	312	58
RM130	ATCCTTACATTTCCAGTGGCATTCA CCCAGAAGACCCACATTCCTCAT	336	58
RM131	TTTTAAGTTTCTCCAGGGAGGAGAC AATAGGCTCTTTGGAAAGCTGGAGT	226	58
RM132	TCTCAGCTTAATCCAAGAAGGACTTC GGCATATTCCTCAACAATTTATGCTT	376	58
RM133	TGGAGAAGCTATGGTGCTTCCTATG TGACAAATAGGTGAGGGAAAGTTGTTAT	225	58
EST01096	TCACACGCTGAATCAATCTT CAGCAGCTGATACAAGCTTT	188	58
IFNG	TGTTTTCTTTCCCGATAGGT CTGGGATGCTCTTCGACCTC	150	52
Rap13	CCATCCAACATCTTAAATGGAC CAGCTGCAAACCTCTAGGACTATT	149	58

STS vzorky se izolovaly způsobem popsaným v části, nazvané Materiály a metody nebo se vzaly z knihoven EST01096, IFNG a Rap1B.

Tabulka 3

Registrační označení (D-čísla) genomové databáze pro různé sekvence, naznačené na obr. 1

genomová databáze

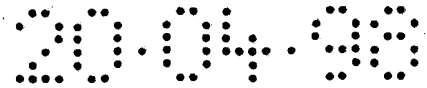
pro	symbol výskytu	PCR	PCR gdb id	locus	locus gdb id
CH1-spodní/CH1-horní	D12S1484	CH1-spodní/CH1-horní	G00-595-292	D12S1484	G00-595-415
CH2-spodní/CH2-horní	D12S1485	CH2-spodní/CH2-horní	G00-595-295	D12S1485	G00-595-416
CH5-spodní/CH5-horní	D12S1486	CH5-spodní/CH5-horní	G00-595-298	D12S1486	G00-595-417
CH8-spodní/CH8-horní	D12S1487	CH8-spodní/CH8-horní	G00-595-301	D12S1487	G00-595-418
CH9-spodní/CH9-horní	D12S1488	CH9-spodní/CH9-horní	G00-595-304	D12S1488	G00-595-419
EM2-spodní/EM2-horní	D12S1489	EM2-spodní/EM2-horní	G00-595-307	D12S1489	G00-595-420
EM3-spodní/EM3-horní	D12S1490	EM3-spodní/EM3-horní	G00-595-310	D12S1490	G00-595-421
EM4-spodní/EM4-horní	D12S1491	EM4-spodní/EM4-horní	G00-595-313	D12S1491	G00-595-422
RM13-spodní/RM13-horní	D12S1492	RM13-spodní/RM13-horní	G00-595-316	D12S1492	G00-595-423
RM14-spodní/RM14-horní	D12S1493	RM14-spodní/RM14-horní	G00-595-319	D12S1493	G00-595-424
RM16-spodní/RM16-horní	D12S1494	RM16-spodní/RM16-horní	G00-595-322	D12S1494	G00-595-425
RM25-spodní/RM25-horní	D12S1507	RM25-spodní/RM25-horní	G00-595-325	D12S1495	G00-595-426
RM26-spodní/RM26-horní	D12S1495	RM26-spodní/RM26-horní	G00-595-328	D12S1496	G00-595-427
RM31-spodní/RM31-horní	D12S1497	RM29-spodní/RM29-horní	G00-595-331	D12S1497	G00-595-428
RM33-spodní/RM33-horní	D12S1498	RM31-spodní/RM31-horní	G00-595-334	D12S1498	G00-595-429
RM34-spodní/RM34-horní	D12S1499	RM33-spodní/RM33-horní	G00-595-337	D12S1499	G00-595-430
RM36-spodní/RM36-horní	D12S1500	RM34-spodní/RM34-horní	G00-595-340	D12S1500	G00-595-431
RM46-spodní/RM46-horní	D12S1501	RM36-spodní/RM36-horní	G00-595-343	D12S1501	G00-595-432
RM48-spodní/RM48-horní	D12S1502	RM46-spodní/RM46-horní	G00-595-346	D12S1502	G00-595-433
RM51-spodní/RM51-horní	D12S1503	RM48-spodní/RM48-horní	G00-595-349	D12S1503	G00-595-434
RM53-spodní/RM53-horní	D12S1504	RM51-spodní/RM51-horní	G00-595-352	D12S1504	G00-595-435
RM60-spodní/RM60-horní	D12S1505	RM53-spodní/RM53-horní	G00-595-355	D12S1505	G00-595-436
RM69-spodní/RM69-horní	D12S1506	RM60-spodní/RM60-horní	G00-595-358	D12S1506	G00-595-437
RM72-spodní/RM72-horní	D12S1508	RM69-spodní/RM69-horní	G00-595-361	D12S1507	G00-595-438
RM76-spodní/RM76-horní	D12S1509	RM72-spodní/RM72-horní	G00-595-364	D12S1508	G00-595-439
RM85-spodní/RM85-horní	D12S1510	RM76-spodní/RM76-horní	G00-595-367	D12S1509	G00-595-440
RM90-spodní/RM90-horní	D12S1511	RM85-spodní/RM85-horní	G00-595-370	D12S1510	G00-595-441
RM93-spodní/RM93-horní	D12S1512	RM90-spodní/RM90-horní	G00-595-373	D12S1511	G00-595-442
RM98-spodní/RM98-horní	D12S1513	RM93-spodní/RM93-horní	G00-595-376	D12S1512	G00-595-443
RM99-spodní/RM99-horní	D12S1514	RM98-spodní/RM98-horní	G00-595-379	D12S1513	G00-595-444
RM-29-spodní/RM29-horní	D12S1515	RM99-spodní/RM99-horní	G00-595-382	D12S1514	G00-595-445
RM103-spodní/RM103-horní	D12S1496	RM-29-spodní/RM29-horní	G00-595-385	D12S1515	G00-595-446
RM108-spodní/RM108-horní	D12S1516	RM103-spodní/RM103-horní	G00-595-388	D12S1516	G00-595-447
RM110-spodní/RM110-horní	D12S1517	RM108-spodní/RM108-horní	G00-595-391	D12S1517	G00-595-448
RM111-spodní/RM111-horní	D12S1518	RM110-spodní/RM110-horní	G00-595-394	D12S1518	G00-595-449
RM121-spodní/RM121-horní	D12S1519	RM111-spodní/RM111-horní	G00-595-397	D12S1519	G00-595-450
RM130-spodní/RM130-horní	D12S1520	RM121-spodní/RM121-horní	G00-595-400	D12S1520	G00-595-451
RM131-spodní/RM131-horní	D12S1521	RM130-spodní/RM130-horní	G00-595-403	D12S1521	G00-595-452
RM132-spodní/RM132-horní	D12S1522	RM131-spodní/RM131-horní	G00-595-406	D12S1522	G00-595-453
RM133-spodní/RM133-horní	D12S1523	RM132-spodní/RM132-horní	G00-595-409	D12S1523	G00-595-454
	D12S1524	RM133-spodní/RM133-horní	G00-595-412	D12S1524	G00-595-455

TABULKA 4

FISH mapování zlomových bodů chromozomu 12 v primárních benigních pevných nádorech do podoblasti MAR

Typ nádoru	Zlomový bod uvnitř MAR	Frakce nádoru se zlomovými body uvnitř hlavní oblasti zlomových bodů*
Lipom	6/6	6/6
Pleomorfní adenom slinných žláz	7/7	5/7
Děložní leiomyom	7/8	7/8
Plicní hemartom	1/1	1/1
Plicní fibroadeom	1/1	1/1
Žaludeční hemartom	8/9	8/9
Angiomyxom	1/1	1/1

* Nádorové vzorky se shromáždily a analyzovaly v histopatologickém a cytogenetickém zařízení „University of Bremen“. Jako molekulární sonda FISH analýzy se použila směs kosmidových klonů 27E12 a 142H1.



Tabulka 5-1

Klon	Nábor/buněčná linie	Diverzní bod	Nuk. sekvence (10 b)	Chrom. RACE	Zdroje cyto-gen	poly (A) signál	#A	Sada primerů
pCH108	Li-14/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	CTGAGTAAATA				
pCH113	Li-538/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	AATACTCTGG	3q27	AGTAAA	26	?
pCH234	#2528-90	po DBD3	TAGGAATGG	AATACTCTGG	3q27	AGTAAA (AGTAAA)	26	?
pCH259	#2344-94	po DBD3	TAGGAATGG	AATACTCTGG		?	?	
pCH260	#2344-94	po DBD3	TAGGAATGG	AATACTCTGG		?	?	
pCH148	#192	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG				---
pCH245	#568 92	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG	12	ATATAA	18	
pCH247	#568 92	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG		ATATAA	17	
pCH261	#2344-94	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG		ATATAA	53	
pCH212	#1321-89 ?	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG		ATATAA	27	
pCH213	#1321-89 ?	po DBD3	TAGGAATGG	CCTACTATTG		ATATAA	16	
pCH216	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	GGAGTGTGA		?	?	
pCH229	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	GGAGTGTGA		N.D.	13	
pCH232	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	AACACAGGAC		ATATAA	12	
pCH177	#367	po DBD3	TAGGAATGG	AACACAGGAC		ATATAA	15	
pCH191	#25 ?	po DBD3	TAGGAATGG	AACACAGGAC		ATATAA	25	
pCH210	#837-88	po DBD3	TAGGAATGG	GTTTAATATT	2p21	ATATAA	29	177
pCH211	#837-88	po DBD3	TAGGAATGG	GTTTAATATT	?	ATATAA	49	(177)
pCH230	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	AAGAAGGCAG		ATATAA	22	
pCH233	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	AAGAAGGCAG		ATATAA	22	
pCH111	Li-501/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	TAGGAGGTAG		ATATAA	27	
pCH112	Li-501/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	TAGGAGGTAG		ATATAA	18	
pCH114	Li-538/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	GGTGGCCATT	3q27	ATATAA	33	111-AB
pCH115	Li-538/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	GGTGGCCATT	3q27	ATATAA	33	111-AB
pCH147	#192	po DBD3	TAGGAATGG	GACATCTAC	3q27	(CATAAA)	24	115-AB
pCH153	#203	po DBD3	TAGGAATGG	GACATCTAC	12	(CATAAA)	24	115-AB
pCH169	#294	po DBD3	TAGGAATGG	GGGCTTCAG	12	ATATAA	23	147
pCH172	#294	po DBD3	TAGGAATGG	GGGCTTCAG	12	ATATAA	22	---
pCH173	#294	po DBD3	TAGGAATGG	GGGCTTCAG	12	ATATAA	22	---
pCH174	#294	po DBD3	TAGGAATGG	GGGCTTCAG	12	ATATAA	26	169
pCH110	LM-30-1/SV40	po DBD3	TAGGAATGG	CTGTCTGTGA	8q22	ATATAA	24	172-AB
pCH164	Myo 168.1	po DBD3	TAGGAATGG	TCTGTATCCT	8q22	ATATAA	24	173-AB
pCH165	Myo 168.1	po DBD3	TAGGAATGG	ATACACAGGA	8q22	ATATAA	12	174-AB
pCH168	Myo 194.4	po DBD3	TAGGAATGG	ATACACTTC	8q22	ATATAA	15	110-AB
pCH209	#837-88 ?	po DBD3	TAGGAATGG	ATATTTATGA	8q22	ATATAA	17	164-AB
pCH217	#2100-89 ?	po DBD3	TAGGAATGG	GAGGAGTTT	14	ATATAA	30	165-AB
pCH219	#2100-89 ?	po DBD3	TAGGAATGG	GAGGAGTTT	14	ATATAA	168	
pCH220	#3391-90	po DBD3	TAGGAATGG	TTACCTGCTG	x	(GATAAA)	30	
pCH223	#CG592	po DBD3	TAGGAATGG	CTCTCTCTCC	x	(ATATAC)	30	
pCH226	#3100-88	po DBD3	TAGGAATGG	CTCTCTCTCC	14	(CATAAA)	23	
pCH231	#2100-89	po DBD3	TAGGAATGG	TTTNTCTCTT		ATATAA	19	
pCH246	#568-92	po DBD3	TAGGAATGG	AGTCCAAAGAA		ATATAA	22	
pCH248	#568-92	po DBD3	TAGGAATGG	AGTCCAAAGAA		ATATAA	17	
pCH249	#2617-93	po DBD3	TAGGAATGG	ATGGAGTCTC		(CATAAA)	40	
pCH251	#2617-93	po DBD3	TAGGAATGG	ATGGAGTCTC		ATATAA	19	
pCH250	#2617-93	po DBD3	TAGGAATGG	ATGGAGTCTC		ATATAA	13	
pCH252	#2617-93	po DBD3	TAGGAATGG	TTCCAGATAC		N.D.	13	
			TAGGAATGG	TTCCAGATAC		N.D.		

20.04.99

Tabulka 5-2

Klon	Nádor/buněčná linie	Diverzní bod	Nuk. sekvence (10 b)	Chrom. RACE	Zdroje cytojen.	poly (A) signál	#A	Sada primerů
		exon/intron 4	GCCTGCTCAG	GTAAAGACATA				
pCH109	LM-30.1/SV40	po	GCCTGCTCAG	GTCAATGTTG	12	12	17	109-AB
pCH238	#2778-93	po	GCCTGCTCAG	GTCAATGTTG	12	12	17	109-AB
pCH244	#2162-91	po	GCCTGCTCAG	GTCAATGTTG	12	12	17	109-AB
pCH254	#2776-93	po	GCCTGCTCAG	GTCAATGTTG	12	12	17	109-AB
pCH203	#2528-90	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12 (NFI'')	12	19	
pCH199	#CG575	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12 (NFI'')	12	15	
pCH222	#CG575	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12 (NFI'')	12	16	
pCH206	#CG575	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12 (NFI'')	12	16	
pCH175	#275	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	1	15	175-AB
pCH237	#2617-93	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	1	16	
pCH207	#2540-87	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	18	
pCH239	#2344-94	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	18	
pCH116	Li-14/SV40	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	17	116-AB
pCH184	Myo163.1	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	19	184-AB
pCH208	#2540-87	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	47	
pCH224	#2540-87	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	15	
pCH201	#837-88	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	15	
pCH236	#2162-91	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	28	
pCH243	#2162-91	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	?	
pCH227	#183-89	po	GCCTGCTCAG	TCTTGTACC	12	12	14	
3'-nepřenesená oblast (různé polohy)								
pCH193	#58	... 3'-UTR	TATCCTTTCA	AGTCAAGAG	12	8q22-qter	23	(195-AB)
pCH194	#58	3'-UTR	TATCCTTTCA	AGTCAAGAG	12	8q22-qter	34	(195-AB)
pCH195	#192	3'-UTR	TATCCTTTCA	AGTCAAGAG	12	8	23	195-AB
pCH196	#192	3'-UTR	TATCCTTTCA	AGTCAAGAG	12	8	>17	195-AB
pCH189	Myo 192.1	3'-UTR	ATACCACTTA	TTTMAACA	12	N.T. ¹	23	---
pCH117	Ad-312/SV40	3'-UTR	TTGCCATGGT	ATATGAAAT	12	1p22	7	117-AB
pCH253	#2617-93	3'-UTR	CACCTTCATC	ATATGCAAG	12	?		
pCH264	#1568-92	3'-UTR	ATAAGGACTA	TCAGGCATCA	12	N.D.	19	
pCH270	#2528-90	3'-UTR	NCTTGTNAGC	TAGAGATTAG	12	N.D.	4	

N.T.: NETESTOVATELNÉ

N.T.¹: DELKA EKTOPICKÉ SEKVENCE NEUMOŽNĚJE VÝVOJ PRIMEROVÉ SADYN.T.²: EKTOPICKÁ SEKVENCE JE TVOŘENA REPETIČNÍMI SEKVENCEMI

N.D.: NEDETEKOVÁNO

DODATEK 1

Genes, Chromosome & Cancer 12:296-303 (1995)

Molecular characterization of MAR, a Multiple Aberration Region on Human Chromosome Segment 12q13-q15 Implicated in Various Solid Tumors

Wim J.M. Van de Ven, Eric F.P.M. Schoenmakers, Sylke Wanschura, Bernard Kazmierczak, Patrick F.J. Kools, Jan M.W. Geurts, Sabine Bartnitzke, Herman Van den Berghe, and Jörn Bullerdiek

Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium
(W.J.M.V.D.V., E.F.P.M.S., P.F.J.K., J.W.M.G., H.V.D.B.);

Center for Human Genetics, University of Bremen, Germany
(S.W., B.K., S.B., J.B.).

Zlomové body chromozomového ramene 12q v sedmi buněčných liniích, odvozených z primárních pleomorfních adenomů slinných žláz, byly zmapovány pomocí analýzy FISH, za použití devíti DNA sond. Všechny tyto sondy leží v 2,8 Mb genomové DNA oblasti chromozomového segmentu 12q13-q15 a odpovídají již publikovaným místům se sekvenční adresou (STS). Jejich relativní pozice byly stanoveny na základě YAC klonování a širokorozsahových fyzikálních map a map obsahu STS. Ukázalo se, že 12q zlomové body pěti buněčných linií jsou zmapovány uvnitř tří různých podoblastí 445 kb DNA intervalu, který byl nedávno

Received September 27, 1994; accepted November 7, 1994; Address reprint requests to Dr. Wim J.M. van de Ven, Center for Human Genetics, University of Leuven, Herestraat 49, B-3000 Leuven, Belgium.

definován jako shluková oblast zlomových bodů chromozomu 12 děložního leiomyomu (ULCR12) mezi STS RM33 a RM98. Všechny zlomové body bylo, jak se zdá, zmapováno uvnitř 1,7-Mb DNA oblasti mezi STS RM36 a RM103. Kromě toho, jak se ukázalo, byly zlomové body chromozomu 12 tří primárních pleomorfních adenomů slinných žláz zmapovány mezi RM36 a RM103. Konečně, analýza FISH dvou lipomových buněčných linií s 12q13-q15 abnormalitami přesně vymezuje zlomové body těchto linií vzhledem k relativně malým a sousedícím DNA segmentům, které, jak se zdá, jsou uspořádány, stejně jako zlomové body dvou primárních lipomů, mezi RM36 a RM103. Z pozorovaného shlukování 12q zlomových bodů tří různých typů pevných nádorů jsme usoudili, že 1,7 Mb DNA oblast dlouhého ramene chromozomu 12 mezi RM36 a RM103 je oblastí mnohočetných odchylek, která byla označena jako MAR. (Genes Chromosom Cancer 12:296-303 (1995). 1995 Wiley-Liss, Inc..

ÚVOD

Chromozomové translokace, zahrnující q13-q15 chromozomu 12 se objevily u různých pevných nádorů (Mitelman F (1991): Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. 4. vyd., New York, Alan R. Liss.). V podskupinách cytogeneticky abnormálních děložních leiomyomů (Nilbert M, Heim S (1990) Uterine leiomyoma cytogenetics. Genes Chromosom Cancer 2:3-13.; Pandis N, Heim S, Bardi G, Flodérus U-M, Willén H, Mandahl N, Mitelman F (1991) Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. Cancer Genet Cytogenet 55:11-18.), pleomorfních adenomů slinných žláz (Sandros J, Stenman G, Mark J (1990): Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary

gland tumours. Cancer Genet Cytogenet 44: 153-167.; Bullerdiel J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S (1993): Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. Cancer Genet Cytogenet 65: 27-31.) a benigních nádorů tukové tkáně (Sreekantaiah C, Leong SLP, Karakousis CP, McGee DL, Rappaport WD, Villar HV, Neal D, Fleming S, Wankel A, Herrington PN, Carmona R, Sandberg AA, (1991) Cytogenetic profile of 109 lipomas. Cancer Res 51: 422-433.) jsou často pozorovány abnormality 12q13-q15. V nedávné studii (Schoenmakers HJPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiel J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.) se identifikovala a molekulárně charakterizovala ULCR12, shluková oblast zlomových bodů chromozomu 12 děložního leiomyomu. Tato studie se zaměřuje na zlomové body chromozomového ramene 12q v pleomorfním adenomu slinných žláz, benigním epitelovém nádoru pocházejícím z hlavních nebo minoritních slinných žláz. Jedná se o nejběžnější typ nádoru slinných žláz a představuje většinou 50 % všech novotvarů v těchto orgánech. Přibližně 85 % nádorů bylo nalezeno v příušnici, 10 % ve vedlejších slinných žlázách a 5 % v submandibulární žláze (Seifert G, Miehke A, Haubrich J, Chilla R (1986): Diseases of the salivary glands. Pathology. Diagnosis. Treatment. Facial nerve surgery. Translated by P.M. Stell. Thieme, Stuttgart, New York, pp 182-194.). Ačkoliv se zdá, že mnoho těchto adenomů má normální karyotyp, cytogenetické studie rovněž ukázaly opakující se chromozomové anomálie

(Sandros J, Stenman G, Mark J (1990): Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153-167.; Bullerdiak J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S (1993): Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31.). Kromě odchylek chromozomu 8 jsou nejběžnější abnormalitou rovněž časté translokace se zlomovým bodem v 8q12 s t(3;8)(p21;q12) abnormalitami chromozomu 12, přičemž časté jsou zpravidla translokace zahrnující 12q13-q15. Neopakující klonové abnormality byly rovněž popsány. Časté zařazení oblasti 12q13-q15 v distinktních typech pevného nádoru navrhuje, tuto chromozomovou oblast jako oblast výskytu genu (genů), které by se mohly podílet na vývoji těchto nádorů. Molekulové klonování zlomových bodů chromozomu 12 těchto nádorů a charakteristika spojovacích fragmentů mohou vést k identifikaci zmíněného genu (genů).

Na základě FISH dat jsme již uvedli, že zlomové body chromozomu 12 v celé řadě buněčných linií, odvozených z primárních pleomorfních adenomů slinných žláz (Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiak J (1990): In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13→q15 rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 53: 37-39.; Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiak J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* 20: 210-222.) je umístěna na dlouhém rameni

chromozomu 12 v intervalu mezi místem D12S19 a D12S8 (Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiel J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.). Stanovená délka tohoto DNA intervalu byla přibližně 7 cM (Keats B, Ott J, Conneally M (1989) Report of the committee on linkage and gene order. Cytogenet Cell Genet 51: 459-502.; Craig IW, Gedde-Dahl T, Gemmill R, Kucherlapati R (1993) Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 12. Genome Prior Rep 1: 402-418.). Tento interval, obsahující zlomové body chromozomu 12 těchto nádorových buněk, se dále zúžil tím, že byly všechny zlomové body zmapovány daleko od CHOP genu, který je přímo ovlivněn charakteristickou t(12;16) translokací v myxoidních liposarkomech (Aman P, Ron D, Mandahl N, Fioretos T, Heim S, Arheden K, Willen H, Rydholm A, Mitelman F (1992) Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16) (g13;p11). Genes Chromosom Cancer 5: 278-285.; Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D (1993) Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. Nature 363: 640-644.; Rabbitts TH, Forster A, Larson R, Nathan P (1993) Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. Nature Genet 4: 175-180.) a nachází se mezi D12S19 a D12S8. V nedávných studiích (Kools PFJ, Wanschura S, Schoenmakers HFPM, Geurts JWM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiel J, Van de Berghe H, Van de Ven WJM (1995) Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary

gland adenoma with $t(1;12)(p22;q15)$ as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet, In press, 1995.) byl zlomový bod chromozomu 12 pleomorfní adenomové buněčné linie slinných žláz Ad-312/SV40 přiřazen do DNA oblasti mezi místa se sekvenční adresou (STS) RM110 a RM111, která je menší než 165 kb. FISH evoluce zlomových bodů chromozomu 12 dalších pleomorfních adenomových buněčných linií slinných žláz naznačuje, že Ad-312/SV40 se musí nacházet v blízkosti této oblasti, ve vzdálenosti větší než 800 kb (Kools PFJ, Wanschura S, Schoenmakers EFPM, Geurts JWM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Van de Berghe H, Van de Ven WJM (1995) Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with $t(1;12)(p22;q15)$ as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet, In press, 1995.). Získané výsledky ukazují na možnou disperzi zlomových bodů chromozomu 12 v relativně velké genomové oblasti na dlouhém rameni chromozomu 12.

Přihláška vynálezu popisuje fyzikální mapování zlomových bodů chromozomu 12 v pleomorfních adenomových buňkách slinných žláz z primárních nádorů, stejně jako stanovené nádorové buněčné linie. Karyotypické anomálie, pozorované ve všech buňkách, byly rovněž rozdílné, ale vždy zahrnovaly oblast q13-q15 chromozomu 12. Experimenty FISH, které přesněji definovaly hlavní shlukovou oblast zlomových bodů chromozomu 12 u pleomorfního adenomu slinných žláz za použití DNA sond mezi D12S8 a CHOP, které odpovídaly místům se sekvenční adresou (STS) širokorozsahové fyzikální mapy 6 Mb DNA oblasti, a které se získaly v průběhu procházení chromozomů, se provedly. Zdá se, že shluková oblast tohoto zlomového bodu se překrývá s ULCR12. Navíc se zjišťovalo, zda by mohly být 12q13-q15 zlomové body lipomů rovněž

zmapovány ve stejné oblasti jako zlomové body pleomorfního adenomu slinných žláz a děložního leiomyomu.

MATERIÁLY A METODY

Primární pevné nádory a odvozené buněčné linie

Primární pevné nádory, zahrnující pleomorfní adenomy slinných žláz, lipomy a děložní leiomyomy, se získaly z Univerzitních klinik v Leuvenu, (Belgie, Dr. I. De Wever); v Bremenu (Německo, Dr. R. Chille); v Krefeldu (Německo, Dr. J. Haubrich); a z institutu patologie v Göteborgu (Švédsko, Dr. G. Stenman). Nádorové vzorky, určené pro buněčnou kultivaci a následnou analýzu FISH, se jemně nakrájely, ošetřovaly 4 až 6 hodin 0,8% kolagenázou (Boehringer, Mannheim, FRG) a dále zpracovaly pro potřeby analýzy FISH rutinními postupy.

Lidské nádorové buněčné linie, použité v této studii, zahrnovaly již popsané buněčné linie pleomorfních adenomů slinných žláz Ad-211/SV40, Ad-248/SV40, Ad-263/SV40, Ad-295/SV40, Ad-302/SV40, Ad-366/SV40 a Ad-386/SV40 (Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiek J (1990): In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13→q15 rearrangement. Cytogenet Cell Genet 53: 37-39.; Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.) a lipomových buněčných linií Li-

14/SV40 (Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.) a nedávno vyvinutou Li-538/SV40. Seznam odchylek chromozomu 12, které se vyskytují v těchto buněčných liniích je uveden v tabulce 1. Buňky se propagovaly v TC199 živném médiu s Earleovými solemi, doplněném 20% fetálním bovinním sérem.

TABULKA 1. Abnormality chromozomu 12 v primárních lidských pevných nádorech a buněčných liniích *

----- Odchylka -----	
Buněčné linie	
Ad-211/SV40	t(8;12)(q21;q13-q15)
Ad-248/SV40	ins(12;6)(q15;q16q21)
Ad-263/SV40	INV(12)(Q15Q24.1)
Ad-295/SV40	t(8;12;18)(p12;q14;p11.2)
Ad-302/SV40	t(7;12)(q31;q14)
Ad-366/SV40	inv(12)(p13q15)
Ad-386/SV40	t(12;14)(q13-q15;q13-q15)
Li-14/SV40	t(3;12)(q28;q13)
Li-538/SV40	t(3;12)(q27;q14)
LM-5.1/SV40	t(12;15)(q15;q24)
LM-30.1/SV40	t(12;14)(q15;q24)
LM-65/SV40	t(12;14)(q15;q24)
LM-67/SV40	t(12;14)(q13-q15;q24)
Lm-100/SV40	t(12;14)(q15;q24)
LM-605/SV40	ins(12;11)(q14;q21qter)
LM-608/SV40	t(12;14)(q15;q24)
LM-609/SV40	t(12;14)(q15;q24)

TABULKA 1-pokračování

Abnormality chromozomu 12 v primárních lidských pevných nádorech a buněčných liniích *

Odchylka	

Primární nádory	
Ad-386	t(12;14)(q15;q11.2)
Ad-396	t(3;12)
Ad-400	t(12;16)
Li-166	t(12;12)
Li-167	t(3;12)(q28;q14-q15)
LM-163.1	t(12;14)(q14;q24)
LM-163.2	t(12;14)(q14-q24)
LM-168.3	t(X;12)(q22;q15)
LM-192	t(2;3;12)(q35;p21;q14)
LM-196.4	t(12;14)(q14;q24)

* Ad - pleomorfni adenom slinných žláz; Li - lipom;

LM - děložní leiomyom

DNA sondy

V rámci lidského genomového projektu, který se zaměřoval na dlouhé rameno chromozomu 12, se z testované kosmidové knihovny LLNL12NC01 (Montgomery KT, LeBlanc JM, Tsai P, McNinch JS, Ward DC, De Jong PJ, Kucherlapati R, Krauter KS (1993) Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSs from coosmids mapped by FISH. Genomics 1: 682-693.) izolovaly kosmidové klony cRM33, cRM36, cRM51, cRM69, cRM72, cRM76, cRM98, cRM103 a cRM133. Další detaily, týkající se těchto kosmidových klonů, byly zveřejněny na „Second International Chromosome 12 Workshop, New Haven, CT, USA, June 20-22, 1994“ a jsou rovněž popsány v publikaci, jejímiž autory jsou (Kucherlapati R, Craig I, Marynen P (1994) Report of

the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. Cytogenet Cell Genet 67: 245-276.). Úvodní průzkum se prováděl za použití průzkumové strategie, založené na PCR (Green ED, Olson MV (1990) Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 87: 1213-1217.) a následovala filtrační hybridizační analýza, která představovala konečný průzkumový krok (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Kosmidové klony se izolovaly pomocí STS, odvozených z YAC klonů. STS se získaly po zachycení YAC inzertních konců způsobem, zahrnujícím „vectorette-PCR“ a následně přímé fluorescenční sekvencování pevné fáze PCR produktu (Geurts JMW, Schoenmakers HFPM, Mols R, Van de Ven WJM (1994) An improved procedure to quickly isolate and sequence the termini of DNA inserts of yeast artificial chromosomes. Meth Mol Cell Biol 4: 257-265.) nebo pomocí inter-Alu PCR (Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter HD, Caskey CT (1989) Alu polymerase chain reaction: A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6686-6690.). Kosmidové klony se nechaly vyrůst a následně se s nimi zacházelo podle standardních postupů (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.).

Kosmidový klon cPK12qter, který byl zmapován v telomerické oblasti dlouhého ramene chromozomu 12 (Kools PFJ, Wanschura S, Schoenmakers EFPM, Geurts JWM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiel J, Van de Berghe H, Van de Ven WJM (1995) Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet, In press, 1995.) se použil jako referenční signální znak (marker).

Příprava chromozomu a fluorescenční hybridizace in situ

Metafázové nárustové frakce buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz nebo normálních lidských lymfocytů se připravily již popsáním způsobem (Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiel J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993) Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. Cell Genet Cytogenet 62: 159-161.). K přesnému stanovení identity chromozomu při experimentech FISH se po GTG-pásmování stejných metafázových nárustových frakcí provedla analýza FISH. GTG-pásmování se provádělo v podstatě způsobem, který popsal Smit VTHBM, Wessels JW, Mollevanger P, Schrier PI, Raap AK, Beverstock GC, Cornelisse CJ (1990) Combined GTG-banding and nonradioactive in situ hybridization improves characterization of complex karyotypes. Cytogenet Cell Genet 54: 20-23. In situ hybridizace se prováděly za použití postupu, který popsal Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Devilee P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen G, Pearson PL (1990) Rapid subchromosomal localization of

cosmids by nonradioactive in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 53: 134-136 s některými malými modifikacemi (Kools PFJ, Roebroek AJM, Van de Velde HJK, Marynen P, Bullerdiek J, Van de Ven WJM (1993): Regional mapping of the human NSP gene to chromosome 14q21-q22 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 66: 48-50.; Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Kosmid a YAC DNA se označily pomocí biotinu-11-dUTP (Boehringer Mannheim) nebo biotinu-14-dATP (BRL, Gaithersburg), které již byly popsány (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Vzorke se analyzovaly pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axiophot a filtru FITC (Zeiss). Výsledky se zaznamenaly na film Scotch (3M) 640 asa.

VÝSLEDKY

FISH mapování 12q zlomových bodů v buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz

V dřívějších studiích (Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994a) Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma,

pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics 20: 210-222.) se zmapovaly zlomové body chromozomu 12 v celé řadě pleomorfních adenomů slinných žláz vzhledem k různým DNA signálním znakům a zjistilo se, že se všechny tyto zlomové body vyskytují v blízkosti místa D12S8 a daleko od CHOP genu. Tato oblast je o něco menší, než 7 cM oblast vymezená vazebnými místy D12S8 a D12S19 (Keats B, Ott J, Conneally M (1989) Report of the committee on linkage and gene order. Cytogenet Cell Genet 51: 459-502.). Za použití YAC klonování se sestavila širokorozsahová fyzikální/STS mapa, pokrývající většinu této 7 cM oblasti, jak nedávno popsal Kucherlapati R, Craig I, Marynen P (1994) Report of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. Cytogenet Cell Genet 67: 245-276. Navíc se izolovala celá řada genomových klonů (kosmidových klonů) a stanovila se jejich relativní poloha ve zmíněné mapě (Kucherlapati R, Craig I, Marynen P (1994) Report of the second international workshop on human chromosome 12 mapping 1994. Cytogenet Cell Genet 67: 245-276.). Devět těchto kosmidů cRM33, cRM36, cRM51, cRM69, cRM72, cRM76, cRM98, cRM103 a cRM133 se izolovalo v rámci studií FISH za účelem stanovení poloh zlomových bodů chromozomu 12 sedmi buněčných linií, odvozených z pleomorfních adenomů slinných žláz (tabulka 1). Relativní mapovací pořádek těchto devíti kosmidových klonů, které pokrývají genomovou oblast na dlouhém rameni chromozomu 12, jejíž velikost je přibližně 2,8 Mb, je naznačen na obrázku 1 a výsledky FISH studií s různými kosmidovými sondami jsou schematicky shrnuty na stejném obrázku. Pro názornost jsou FISH výsledky, získané za použití metafázových buněk buněčné linie Ad-295/SV40 a cRM76 a cRM103 jako sond, znázorněny na obrázku 2. Je třeba

uvést, že pro identifikaci chromozomů se běžně použilo pre-FISH GTG-pásmování. Na základě tohoto pásmování mohly být hybridizační signály následně přiřazeny ke chromozomům, jejichž identita byla známa, což bylo zvláště důležité v případech s křížovými hybridizačními signály nebo hybridizačními signály pozadí, které byly v těchto případech pozorovány. V případě, že GTG-pásmování v kombinaci s analýzou FISH poskytlo nejasné výsledky buď z důvodu slabých hybridizačních signálů nebo z důvodu nepřesného pásmování se použily FISH experimenty s kosmidovým klonem cPK12qter (Kools PFJ, Wanschura S, Schoenmakers EFPM, Geurts JWM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Van de Berghe H, Van de Ven WJM (1995) Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet, In press, 1995.) jako referenční sondou.

Analýza FISH metafázových chromozomů každé ze sedmi buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz, prováděná pomocí kosmidů CRM103 ukázala, že tento kosmid se nachází daleko od zlomových bodů chromozomu 12 všech sedmi zde studovaných buněčných linií. Metafázové chromozomy šesti ze sedmi buněčných linií se rovněž testovaly za použití sondy CRM69 a ve dvou případech CRM51. Výsledky posledních experimentů ve všech případech odpovídaly výsledkům, získaným pomocí CRM103. Podobně analýza FISH, využívající jako sondu CRM36 naznačila, že tato sonda byla zmapována v blízkosti všech zlomových bodů. Tyto výsledky opět ve všech případech odpovídaly výsledkům, získaným pro pět ze sedmi buněčných linií při experimentech, používajících CRM72. Výsledky zmíněných FISH studií

dohromady ukazují, že zlomové body chromozomu 12 všech sedmi buněčných linií byly zmapovány mezi cRM36 a cRM103, což představuje genomovou oblast o velikosti 1,7 Mb.

Podrobné mapování 12q zlomových bodů v buněčných liniích, odvozených z pleomorfních adenomů slinných žláz

Při následném podrobném mapování zlomových bodů chromozomu 12 sedmi buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz se provedly další studie FISH, které jsou schematicky znázorněny na obrázku 1. Zlomové body buněčných linií Ad-211/SV40, Ad-295/SV40 a Ad-366/SV40 se, jak se zdá, vyskytují v DNA oblasti mezi cRM76 a cRM133, jejíž velikost je přibližně 75 kb. Zlomové body čtyř dalších buněčných linií se nacházely v různých oblastech zmíněné 1,7 Mb oblasti mezi cRM36 a cRM103. Zlomové body buněčné linie Ad-248/SV40 se nacházejí v přibližně 270 kb DNA segmentu mezi cRM33 a cRM76, Ad-263/SV40 se nacházejí v přibližně 1 Mb DNA segmentu cRM98 a cRM103, Ad-302/SV40 se nacházejí v přibližně 240 kb DNA segmentu mezi cRM33 a cRM36, a Ad-386/SV40 se nacházejí v přibližně 100 kb DNA segmentu mezi cRM98 a cRM133. Tyto výsledky ukazují, že zlomové body chromozomu 12 většiny (pět ze sedmi) buněčných linií jsou dispergovány na 445 kb genomové oblasti na dlouhém rameni chromozomu 12 mezi cRM33 a cRM98. Je důležité zde zmínit, že se nedávno ukázalo, že konkrétně tato oblast obsahuje zlomové body chromozomu 12 v buněčných liniích, odvozených z primárních děložních leiomyomů (viz obr. 3) a byla proto označena jako ULCR12 (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and

characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Protože se tento segment dlouhého ramene chromozomu 12 vyskytuje alespoň ve dvou typech pevných nádorů (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.; tato studie) a, jak bude ukázáno níže, rovněž ve třetím typu pevného nádoru, bude tato DNA oblast mezi cRM36 a cRM103 od tohoto okamžiku označována jako MAR (oblast mnohočetných odchylek).

Mapování FISH 12q zlomových bodů v primárních pleomorfních adenomech slinných žláz

FISH studie na metafázových chromozomech pleomorfních adenomů slinných žláz, prezentovaných dále, se omezily na buněčné linie, odvozené z primárních nádorů. Ačkoliv je rozumné předpokládat, že zlomové body chromozomu 12 v buněčných liniích budou podobné, pokud nebudou přímo identické se zlomovými body chromozomu 12 primárních nádorů, nelze zcela vyloučit rozdíly ve výsledku založení buněčných linií nebo při následné buněčné kultivaci. Úkolem tohoto testu tedy bylo zjistit, zda jsou zlomové body chromozomu 12 ve třech primárních adenomech slinných žláz rovněž zmapovány v oblasti MAR. Ve všech třech případech tato kosmidová banka zřejmě pokrývala zlomové body chromozomu 12 (data nejsou uvedena), což naznačuje, že tyto zlomové body se ve skutečnosti nacházely uvnitř MAR. V nedávné studii (Wanschura S, Belge G, Stenman G, Kools P,

Dal Chin P, Schoenmakers E, Huysmans C, Bartnizke S, Van de Ven W, and Bullerdiek J (připraveno pro publikaci). Mapping of the translocation breakpoints of primary pleomorphic adenomas and lipomas within a common region of chromosome 12.,) je uvedeno, že zlomové body chromozomu 12 pěti primárních děložních leiomyomů s 12q14-15 odchylkami se všechny nacházely ve shluku v 1,5 Mb DNA fragmentu (mezi cRM33 a cRM103), o kterém se ví, že je místem výskytu zlomových bodů různých buněčných linií, odvozených z primárních děložních leiomyomů (schematicky znázorněno na obr. 3). V souladu s výsledky studií, mapujících zlomové body buněčných linií, ukázaly výsledky mapování zlomových bodů nádorů dvou typů primárních pevných nádorů, že se zlomové body primárních nádorových buněk nacházejí v MAR.

Zlomové body chromozomového segmentu 12q13-q15 lipomů zmapovaných uvnitř MAR

Zjišťování, zda se zlomové body chromozomu 12 dalších pevných nádorů s 12q13-q15 odchylkami rovněž nacházejí uvnitř MAR se provádělo pomocí analýzy FISH v lipomových buněčných liniích Li-14/SV40 a Li-538/SV40. Odchylny chromozomu 12 těchto dvou lipomových buněčných linií jsou uvedeny v tabulce 1. Jako molekulové sondy se použily kosmidové klony cRM33, cRM53, cRM72, cRM76, cRM99, cRM103 a cRM133. Zlomový bod Li-14/SV40 se zmapoval v 75 kb DNA intervalu mezi RM76 a RM133 a Li-538/SV40 se zmapoval v 90 kbp intervalu mezi RM76 a RM99 (údaje nejsou uvedeny), což je schematicky znázorněno na obr. 3. Podobná analýza FISH dvou primárních lipomů, používající směs cRM36 a cRM103 jako molekulovou sondu, poskytla hybridizační vzor naznačující, že směs sond detekovala sekvence na druhé

straně zlomových bodů. Získané výsledky jsou prvním důkazem toho, že zlomové body chromozomu 12q13-q15 v lipomu jsou rovněž zmapovány v MAR. Aby bylo možné správně interpretovat získané výsledky testu, je třeba provést více testů zaměřených na lipomy.

DISKUSE

V popsané studii byly zmapovány zlomové body chromozomu 12 tří primárních pleomorfních adenomů slinných žláz a sedmi založených buněčných linií, odvozených z těchto pleomorfních nádorů. Zdá se, že se všechny zlomové body nacházejí v již molekulově klonovaném a charakterizovaném chromozomovém DNA segmentu na dlouhém rameni chromozomu 12, jehož velikost je přibližně 1,7 Mb, přičemž pět z nich se shlukuje v DNA intervalu menším než 500 kb. 1,7 Mb DNA oblast zřejmě obsahuje hlavní shlukovou oblast zlomových bodů pro tento typ nádoru. V předcházející studii byla popsána charakteristika zlomového bodu chromozomu 12 pleomorfní adenomové buněčné linie slinných žláz Ad-312/SV40 (Kools PFJ, Wanschura S, Schoenmakers EFPM, Geurts JWM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Van de Berghe H, Van de Ven WJM (1995) Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet, In press, 1995.). Nyní se zjistilo, že zlomový bod této buněčné linie je zmapován ve vzdálenosti více než 2 Mb od této, zde uvedené, hlavní shlukové oblasti zlomových bodů. Je možné, že Ad-312/SV40 zlomový bod zahrnuje další patogeneticky relevantní genetické sekvence kromě těch, které jsou ovlivněny shlukem zlomových bodů. Nicméně nelze

vyloučit ani možnost, že všechny 12q13-q15 zlomové body v pleomorfních adenomech slinných žláz, které jsou zmapovány takto daleko, spadají do stejné kategorie a jsou dispergovány v relativně velké DNA oblasti tohoto chromozomu a připomínají 11q13 zlomové body v B-buněčných malignancích (Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, Grosgeorge J, Klein B, Bastard C, Gaudray P, Simon MP (1993) Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies. Genes Chromosom Cancer 8: 80-87.). Přesnější identifikace různých zlomových bodů by mohla vnést do těchto studií více světla.

Důležité je zjištění, že se zdá, že DNA segment, ve kterém se vyskytují shluky 12q zlomových bodů pleomorfních adenomů slinných žláz, je shodný s DNA oblastí, která byla nedávno definována jako děložní leiomyomová shluková oblast zlomových bodů chromozomu 12, a je známa jako ULCR12 (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Dále je zajímavá skutečnost, že tato oblast chromozomu 12 je rovněž místem výskytu zlomových bodů primárních lipomů a lipomových buněčných linií, odvozených z primárních nádorů s 12q13-q15 odchylkami. Výsledky všech těchto studií nyní jasně ukazují, že zlomové body chromozomu 12 tří různých typů pevných nádorů jsou zmapovány ve stejné 1,7 Mb genomové oblasti na dlouhém rameni chromozomu 12, což činí z této oblasti oblast mnohočetných odchylek. Na základě těchto zjištění byl tento DNA segment označen jako MAR.

Genetické odchylky, zahrnující chromozomovou oblast 12q13-q15, byly zjištěny při mnoha dalších cytogenetických studiích i v celé řadě různých jiných pevných nádorů, než jen ve třech výše zmíněných nádorech. Výskyt 12q13-q15 byl rovněž zjištěn u endometrických polypů (Walter TA, Xuan Fan S, Medchill MT, Berger CS, Decker H-JH, Sandberg AA (1989) Inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp. Cancer Genet Cytogenet 41: 99-103.; Vanni R, Dal Cin P, Marras S, Moerman Ph, Andria M, Valdes E, Deprest J, and Van den Berghe H (1993) Endometrial polyp: Another benign tumor characterized by 12q13-15 changes. Cancer Genet Cytogenet 68: 32-33.), v čirých buněčných sarkomech charakterizovaných opakující se t(12;22)(q13;q13) (Fletcher JA (1992) Translocation (12;22)(q13-14;q12) is a nonrandom aberration in soft-tissue clear-cell sarcoma. Genes Chromosom Cancer 5: 184.; Reeves BR, Fletcher CDM, Gusterson BA (1992) Translocation t(12;22)(q13;q13) is a nonrandom rearrangement in clear cell sarcoma. Cancer Genet Cytogenet 64: 101-103.; Rodriguez E, Sreekantaiah C, Reuter VE, Motzer RJ, Chaganti RSK (1992) t(12;22)(q13;q13) and trisomy 8 are nonrandom aberrations in clear-cell sarcoma. Cancer Genet Cytogenet 64: 107-110.) podskupinou rabdomyosarkomu (Roberts P, Browne CF, Lewis IJ, Bailey CC, Spice RD, Williams J, Batcup G (1992) 12q13 Abnormality in rhabdomyosarcoma. A nonrandom Occurrence, Cancer Genet Cytogenet 60: 135-140.) a hemangiopericytomu (Mandahl N, Orndal C, Heim S, Willen H, Rydholm A, Bauer HCF, Mitelman F (1993a) Aberrations of chromosome segment 12q13-15 characterize a subgroup of hemangiopericytomas. Cancer 71: 3009-3013.), v chondromatózních nádorech (Mandahl N, Heim S, Arheden K, Rydholm A, Willen H, Mitelman F (1989) Chromosomal rearrangements in chondromatous tumors. Cancer

65: 242-248.; Bridge JA, Persons DL, Neff JR, Bhatia P (1992) Clonal karyotypic aberrations in enchondroma. *Cancer Detect Prev* 16: 215-219.; Hirabayashi Y, Yoshida MA, Ikeuchi T, Ishida T, Kojima T, Higaki S, Machinami R, Tonomura A (1992) Chromosome rearrangements at 12q13 in two cases of chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 60: 35-40.; Mandahl N, Willen H, Rydholm A, Mitelman F (1993b) Rearrangement of band q13 on both chromosomes 12 in a periosteal chondroma. *Genes Chrom Cancer* 6: 121-123.) a hemartomu plic (Dal Cin P, Kools P, De Jonge I, Moerman Ph, Van de Ven W, Van den Berghe H (1993) Rearrangement of 12q14-15 in pulmonary chondroid hamartoma. *Genes Chromosom Cancer* 8: 131-133.). Konečně, bylo publikováno i několik zpráv týkajících se pevných nádorů s výskytem chromozomové oblasti 12q13-q15, například v nádorech prsu (Birdsal SH, MacLennan KA, Gusterson, BA (1992) t(6;12) (q23;q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodes tumor of the breast. *Cancer Genet Cytogenet* 60: 74-77.; Rohen C, Bonk U, Staats B, Bartnizke S, Bullerdiek J (1993) Two human breast tumors with translocations involving 12q13-15 as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 69: 68-71.), difúzních astrocytomech (Jenkins RB, Kimmell DW, Moertel CA, Schulz CA, Menezes RM, Scheihauer B, Kelly PJ, Dewald GW (1989) Recurrent cytogenetic abnormalities in 80 gliomas. *Cytogenet Cell Genet* 51: 1019.) a v obřím-buněčném nádoru kosti (Noguera R, Llombart-Bosch A, Lopez-Gines C, Carda C, Fernandez Cl (1989) Giant-cell tumor of bone, stage II, displaying translocation t(12;19)(q13;q13). *Ichrows Archiv A Pathol Anat* 415: 377-382.). Na základě výsledků cytogenetických studií nemohl být vytvořen žádný předpoklad, který by se týkal distribuce zlomových bodů těchto typů nádorů. Ve světle dosažených výsledků

předložené studie by bylo zajímavé vědět, zda zlomové body libovolného výše popsaného nádoru lze rovněž zmapovat uvnitř MAR nebo v její blízkosti. To lze snadno určit pomocí testů, využívajících různé, v současnosti dostupné, kosmidové klony.

Zjištění, že se 12q zlomové body alespoň tři odlišných typů pevných nádorů nachází ve stejné DNA oblasti, je zavádějící, protože by mohlo směřovat k možnému závěru, podle kterého by se stejné genetické sekvence v MAR patogenicky týkaly vývoje nádoru v různých tkáních. Pokud ano, potom by bylo možné spekulativně tvrdit, že gen(y) ovlivněný genetickými odchylkami by se měl podílet na regulaci růstu. Na druhé straně nelze vyloučit možnost, že genetické sekvence v MAR nejsou patogenicky relevantní, protože zjištěné shlukování genetických odchylek v MAR by mohlo jednoduše odrážet genetickou nestabilitu této oblasti. Za účelem získání většího množství materiálu v této oblasti by se mělo provést identifikování a charakterizování genů vyskytujících se v MAR, což lze provést pomocí různých přístupů, využívajících celou řadu technik (Parrish JE, Nelson DL (1993) Methods for finding genes a major rate-limiting step in positional cloning. GAT 10: 29-41.).

Stručný popis obrázků k dodatku 1

Obrázek 1

Schematicky znázorňuje data FISH mapování, získaná pro sedm buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz testovaných v této studii. Kosmidové klony, které se

použily jako sondy při mapování FISH na STS získaných ze vzájemně se překrývajících YAC klonů, jsou pojmenovány po akronymech STS, které jsou znázorněny v rámečcích a jejich relativní pořadí odpovídá prezentovanému pořadí. Zjištěná velikost DNA intervalu mezi RM69 a RM72 byla 2,8 Mb. Pevné linie naznačují DNA intervaly, ve kterých se vyskytují zlomové body různých buněčných linií. Tečky označují experimenty FISH, které se prováděly na metafázových chromozomech různých buněčných linií za použití kosmidového klonu odpovídajícího STS, naznačeného nad těmito liniemi, jako molekulární sondy. Relativní pozice MAR a ULCR12 jsou naznačeny ve spodní části obrázku.

Ad - pleomorfní adenom slinných žláz; MAR - oblast mnohočetných odchylek; ULCR12 - shluková oblast zlomových bodů chromozomu 12 děložního leiomyomu.

Obrázek 2

a: znázorňuje parciální karyotyp Ad-295/SV40 ukazující der(8), der(12), der(18) a odpovídající normální chromozomy;

b: znázorňuje FISH analýzu metafázových chromozomů Ad-295/SV40 buněk za použití DNA kosmidového klonu CRM76 jako molekulové sondy (hybridizační signály na normálním chromozomu 12 (šipka) a der(12) (kótová špička));

c: GTG-pásmovací vzor metafázových chromozomů Ad-295/SV40 znázorněných v b;

d: FISH analýza metafázových chromozomů Ad-295/SV40 buněk, používající DNA kosmidového klonu CRM103 jako

molekulové sondy (hybridizační signály na normálním chromozomu 12 (šipka) a der(18) (kótová špička).

Obrázek 3

Schematicky znázorňuje data, získaná mapováním zlomových bodů chromozomu 12, pro primární pleomorfní adenomy slinných žláz, děložní leiomyomy a lipomy a rovněž pro buněčné linie, odvozené z těchto pevných nádorů. Výsledky jsou srovnatelné s daty získanými pro primární děložní leiomyomy (Wanschura S, Belge G, Stenman G, Kools P, Dal Chin P, Schoenmakers E, Huysmans C, Bartnizke S, Van de Ven W, and Bullerdiek J (předložena pro publikaci). Mapping of the translocation breakpoints of primary pleomorphic adenomas and lipomas within a common region of chromosome 12.) a buněčné linie odvozené z těchto nádorů (Schoenmakers HFPM, Mols R, Wanschura S, Kools PFJ, Geurts JMW, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1994b) Identification, molecular cloning and characterization of the chromosome 12 breakpoint cluster region of uterine leiomyomas. Genes Chromosom Cancer 11: 106-118.). Kosmidové klony, které se použily jako sondy ve FISH mapujících studiích, odpovídají STS, získaným ze vzájemně se překrývajících YAC klonů. Kosmidové klony se pojmenovaly po akronymech STS, které jsou znázorněny v rámečkích a jejichž relativní pořadí odpovídá znázorněnému pořadí. Určila se velikost DNA intervalů mezi STS.

Ad - pleomorfní adenom slinných žláz; Li - lipom; LM - děložní leiomyom.

DODATEK 2

Identification of the Chromosome 12 Translocation Breakpoint Region of a Pleomorphic Salivary Gland Adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the Sole Cytogenetic Abnormality

Patrick F.J. Kools, Sylke Wanschura, Eric F.P.M. Schoenmakers, Jan W.M. Geurts, Raf Mols, Bernd Kazmierczak, Jörn Bullerdiek, Herman Van den Berghe and Wim J.M. Van de Ven

Buněčná line Ad-312/SV40, která se odvodila z primárního pleomorfního adenomu slinných žláz s t(1;12)(p22;q15), se použila při fluorescenční in situ hybridizační (FISH) analýze, jejímž úkolem bylo charakterizovat její oblast translokačních zlomových bodů na chromozomu 12. Výsledky předcházejících studií naznačily, že zlomový bod chromozomu 12 v Ad-312/SV40 se vyskytuje v blízkosti místa D12S8 a daleko od CHOP genu. Byly popsány dva částečně se vzájemně překrývající klony kvasinkového umělého chromozomu (YAC) Y4854 (500 kbp) a Y9091 (460 kbp), které se izolovaly v rámci projektu procházení chromozomy, při kterém byly jako výchozí body použity body D12S8 a CHOP. Následně se izolovaly kosmidové klony odpovídající různým místům se sekvenční adresou (STS), zmapovaným uvnitř inzertů těchto YAC klonů. Tyto kosmidové klony zahrnovaly cRM51, cRM69, cRM85, cRM90, cRM91, cRM110 a cRM111.

From the Center for Human Genetics (P.F.J.K., E.F.P.M.S., J.W.M.G., R.M., H.V.D.B., W.J.M.V.D.V.), University of Leuven, Leuven, Belgium and Center for Human Genetics (S.W., B.K., J.B.), University of Bremen, Bremen, Germany.

P.F.J. Kools and Sylke Wanschura contributed equally to this study and must be considered joint first authors.

Address reprint requests to Dr. Wim J.M. Van de Ven, Center for Human Genetics, University of Leuven, Herestraat 49, B-3000, Leuven, Belgium.

Received April 13, 1994; accepted July 6, 1994.

Byla předložena širokorozsahová restriční mapa, vymezující inserty těchto dvou YAC klonů a analýza FISH ukázala, že oba YAC pokrývají zlomový bod chromozomu 12, který je přítomen v Ad-312/SV40 buňkách. U studií FISH se zdá, že jsou kosmidové klony cRM85, cRM90 a cRM111 zmapovány daleko od zlomového bodu chromozomu 12, zatímco kosmidové klony cRM51, cRM69, cRM91 a cRM110 se nalézají na mapě v blízkosti tohoto zlomového bodu. Tyto výsledky potvrzují, že se zlomový bod chromozomu 12 v Ad-312/SV40 vyskytuje ve vzdálenosti menší než 165 kbp od DNA oblasti. Vyhodnocení FISH zlomových bodů chromozomu 12 v pěti dalších buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz naznačuje, že se nacházejí v jeho blízkosti v Ad-312/SV40, ve vzdálenosti větší než 0,9 Mb od STS RM91. Tyto výsledky kromě toho, že ukazují potenciálně kritickou oblast na chromozomu 12, rovněž představují evidenci možného začlenění sekvencí chromozomu 12q13-q15, lokalizovaných na jiném místě.

ÚVOD

Pleomorfní adenom slinných žláz tvoří benigní epitelový nádor, který pochází z hlavních a vedlejších slinných žláz. Je nejčastějším typem nádoru slinných žláz a tvoří většinou 50 % všech neoplasmů v těchto orgánech; 85 % těchto nádorů se nachází v příušní žláze, 10 % ve vedlejších slinných žlázách a 5 % v submandibulární žláze [Seifert G, Miehlike A, Haubrich J, Chilla R (1986): Diseases of the salivary glands. Pathology. Diagnosis. Treatment. Facial nerve surgery. Translated by P.M. Stell. Thieme, Stuttgart, New York, pp 1820194.]. Zdá se, že přibližně 50 % těchto adenomů má normální karyotyp, ale

cytogenetické studie rovněž ukázaly opakující se specifické chromozomové anomálie [Sandros J, Stenman G, Mark J (1990): Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153-167; Bullerdiel J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R., Haubrich J, Thode B, Bartnizke S (1993): Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cell behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31.]. Často byl pozorován anomálie, které zahrnují odchylky chromozomu 8, zpravidla zahrnující oblast 8q12-q13 s nejběžnější odchylkou $t(3;8)(p21;q12)$, a odchylky chromozomu 12, zpravidla translokace, zahrnující oblast 12q13-q15. Rovněž byly zaznamenány neopakující se klonové chromozomové abnormality. Vysoce specifický vzor chromozomových přeuspořádání s pevnými zlomovými body v 8q12-q13 a 12q13-q15 dává tušit, že tyto chromozomové oblasti jsou místem výskytu genů, které by se mohly podílet na vývoji těchto nádorů. Molekulové klonování chromozomových zlomových bodů a charakterizace jejich spojovacích fragmentů může vést k identifikaci patogeneticky relevantních genů. Do současné doby zatím nebyla tato data pro zmíněné nádory popsána.

Na základě výsledků fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se nedávno zjistilo, že zlomové body chromozomu 12 v šesti buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz mapují oblast 12q13-q15, konkrétněji genomový interval mezi místem D12S19 a D12S8 [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiel J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van den Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the $der(16)t(12;16)(q13;p11.2)$ from a myxoid liposarcoma cell line. *Cell Genet*

Cytogenet 62: 159-161; Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.]. Průměrná genetická oblast tohoto genomového DNA intervalu, zaznamenaná v HGM10, byla 7 cM [Keats B, Ott J, Conneally M (1989): Reports of the committee on linkage and gene order. Cytogenet Cell Genet 51: 459-502.]. Rovněž bylo zaznamenáno, že zlomové body chromozomu 12 adenomů slinných žláz jsou zmapovány daleko od CHOP genu [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.], což je oporou pro dřívější studii, která naznačila, že 12q13-q15 translokační zlomové body v pleomorfních adenomech slinných žláz jsou odlišné od zlomových bodů v myxoidním liposarkomu [Stenman G, Sahlin P, Mark J, Chaganti RKS, Kindblom LS, Aman P (1993): The 12q13-q15 translocation breakpoints in pleomorphic adenoma and clear-cell sarcoma of tendons and aponeuroses are different from that in myxoid liposarcoma. Genes Chrom Cancer 7: 178-180.]. Zde se uvádí, že fyzikální mapování zlomových bodů chromozomu 12 v buněčné linii Ad-312/SV40 pleomorfního adenomu slinných žláz nese t(1;12)(p22;q15) jako jedinou cytogenetickou abnormalitu.

MATERIÁLY A METODY

Nádorové buněčné linie

Buněčné linie lidského nádoru, použité v této studii, zahrnují již popsané buněčné linie Ad-248/SV40, Ad-263/SV40, Ad-295/SV40, Ad-302/SV40, Ad-312/SV40 a Ad-366/SV40 pleomorfního adenomu slinných žláz [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics*, 20: 210-222.; Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiek J (1990): In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13→q15 rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 53: 37-39.]. Buňky se kultivovaly v TC199 kultivačním médiu s Earleovými solemi, doplněném 20% fetálním bovinním sérem. Další buněčné linie, použité v této studii, zahrnují somatický buněčný hybrid PK69-12, který obsahuje chromozom 12, jako celý lidský chromozom v křeččím genetickém pozadí [Warburton D, Gersen S, Yu M-T, Jackson C, Handelin B, Housman D (1990): Monochromosomal rodent-human hybrids from microcell fusion of human lymphoblastoid cells containing an inserted dominant selectable marker. *Genomics* 6: 358-366.] a somatický buněčný hybrid LIS-3/SV40/A9-B4 [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van den Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. *Cell Genet Cytogenet* 62: 159-161.]. Poslední buněčná linie se získala po fúzi myxoidní liposarkomové buněčné

linie LIS-3/SV40, která nese specifickou $t(12;16)(q13;p11.2)$, s myšími A9 buňkami. Tento somatický buněčný hybrid, jak již bylo ukázáno, obsahuje $der(16)$, ale neobsahuje $der(12)$ ani normální chromozom 12 [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van den Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the $der(16)t(12;16)(q13;p11.2)$ from a myxoid liposarcoma cell line. Cell Genet Cytogenet 62: 159-161.]. PK89-12 a LIS-3/SV40/A9-B4 buňky se nechaly růst v DME-F12 médiu, doplněném 10% fetálním bovinním sérem. Buněčné linie se v pravidelných intervalech analyzovaly standardními cytogenetickými technikami.

Izolace YAC a kosmidové klony

V rámci lidských genomových mapovacích studií, které budou popsány podrobněji na jiném místě (Schoenmakers a kol., v přípravě), se izolovaly z první generace CEPH YAC knihovny [Albertsen HM, Abderrahim H, Cann HM, Dausset J, Le Paslier D, Cohen D (1990): Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4256-4260.] YAC klony Y4854 a Y9091 a z testované kosmidové knihovny LLNLNC01 specifické pro chromozom 12 [Montgomery KT, Le Blanc JM, Tsai P, McNinch JS, Ward DC, De Jong PJ, Kucherlapati R, Krauter KS (1993): Characterization of two chromosome 12 cosmid libraries and development of STSs from cosmids mapped by FISH. Genomics 17: 682-693.] kosmidové klony CRM51, CRM69, CRM85, CRM90, CRM91, CRM103, CRM110 a CRM111. YAC kosmidové klony se izolovaly již popsaným způsobem [Schoenmakers HFPM, Kools

PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. *Genomics*, 20: 210-222.]. Počáteční průzkum (screenování) YAC, a rovněž kosmidové knihovny, se prováděl za použití průzkumové (screenovací) strategie, zahrnující reakci polymerázového řetězce (PCR) [Green ED, Olson MV (1990): Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1213-1217.]. Filtrová hybridizační analýza se použila, jak již bylo popsáno, jako konečný průzkumový (screenovací) krok [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. *Genomics*, 20: 210-222.]. Kosmidové klony se izolovaly za použití STS a ty kosmidové klony, odpovídající STS uvnitř inzertů YAC klonů Y4854 a Y9091, jsou naznačeny na obrázku 1. STS se získaly zachráněním YAC inzertních koncových sekvencí pomocí „vectorette-PCR“ postupu [Geurts JMW, Schoenmakers HFPM, Mols R, Van de Ven WJM (1994): Improved procedure for rapid isolation and sequencing of DNAS termini in yeast artificial chromosomes. *Meth Mol Cell Biol*, In Press.] nebo Alu-PCR [Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH, Caskey CT (1989): Alu polymerase chain reaction. A method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6686-6690; Breukel C, Wijnen J, Trops C, Van de Klift H, Dauwerse H, Meera Khan P

(1990): Vector-Alu PCR: a rapid step in mapping cosmids and YACs. Nucl Acids Res 18: 3097.]. PCR produkty se sekvencovaly přímo, přes fluorescenční sekvencování pevné fáze. Kosmidové klony se nechaly růst a následně se s nimi zacházelo podle standardních postupů [Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.]. YAC klony se charakterizovaly pomocí gelové pulzní elektroforézy [Chu G, Vollrath D, Davis RW (1986): Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234: 1582-1585.], restrikčního mapování a hybridizace, které již byly popsány [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.].

Chromozomové přípravky a fluorescenční hybridizace in situ

Buňky z nádorových buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz se ošetřily během 30 minut Colcemidem (0,04 µg/ml) a následně sklídily běžným způsobem. Metafázové nárůsty nádorových buněk se připravily již popsaným způsobem [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van den Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. Cell Genet Cytogenet 62: 159-161.]. Za účelem

stanovení identity chromozomů ve FISH experimentech, se FISH analýza prováděla až po G-pásmování totožných metafázových nárůstů. G-pásmování se provádělo v podstatě způsobem, který popsal Smit a kol. [Smit VTHBM, Wessels JW, Mollevanger P, Schrier PI, Raap EK, Beverstock GC, Cornelisse CJ (1990): Combined GTG-banding and nonradipactive in situ hybridization improves characterization of complex karyotypes. Cytogenet Cell Genet 54: 20-23.]. In situ hybridizace se prováděly podle postupu, který popsal Kievits a kol. [Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Deville P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen G, Pearson PL (1990): Rapid subchromosomal localization of cosmid by nonradioactive in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 53: 134-136.], s použitím některých drobných modifikací [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.; Kools PFJ, Roebroek AJM, Van de Velde HJK, Marynen P, Bullerdiek J, Van de Ven WJM (1993): Regional mapping of the human NSP gene to chromosome 14q21-q22 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 66: 48-50.].

Kosmidová a YAC DNA se označila pomocí biotinu-11-dUTP (Boehringer Mannheim) nebo biotinu-14-dATP (BRL, Gaithersburg), jak již bylo uvedeno dříve [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20:

210-222.]. Chromozomy se opatřily protibarvivem pomocí propidiumjodidu a analyzovaly na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axiophot, za použití filtru FITC (Zeiss). Výsledky se zaznamenaly na film Scotch (3M) 640 asa.

VÝSLEDKY

Izolace a charakterizace YAC klonů překrývajících zlomový bod chromozomu 12 buněčné linie Ad-312/SV40 pleomorfního adenomu slinných žláz

V předcházejících studiích [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.] se zmapovaly zlomové body chromozomu 12 šesti buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz v blízkosti místa D12S8 a daleko od CHOP. DNA interval mezi těmito místy je o něco menší než 7 cM (stanovená vzdálenost mezi místem D12S8 a D12S19 [Keats B, Ott J, Conneally M (1989): Reports of the committee on linkage and gene order. Cytogenet Cell Genet 51: 459-502.]), ale stále dost velká. Pro molekulární definici translokačního zlomového bodu Ad-312/SV40 se provedlo mapování lidského genomu na DNA intervalu mezi místem D12S8 a CHOP genem. Při směrovém procházení chromozomem, kdy se jako výchozí bod vzalo místo D12S8 a CHOP gen, se získaly vzájemně se překrývající YAC kolony Y9091 a Y4854. DNA inzert Y9091, jak se zdá, měl velikost 460 kbp a Y4854 měl velikost 500 kbp. Kromě toho, jak bude naznačeno níže, DNA inzert každého YAC klonu překrývá

zlomový bod chromozomu 12 Ad-312/SV40. Širokorozsahová restriční mapa inzertů těchto YAC klonů se získala pomocí elektroforézy pulzního pole a hybridizační analýzy (obr. 1). Na základě mapování obsahu STS a analýzy Southernova přenosu se zjistilo, že inzerty YAC klonů Y9091 a Y4854 se překrývají způsobem, naznačeným na obrázku 1. Testované STS odpovídají koncovým sekvencím dalších vzájemně se překrývajících YAC klonů, které zde nejsou znázorněny, nebo sekvencím, získaným pomocí inter-Alu-PCR. Z nich RM90 a RM91 reprezentují tyto STS koncových klonů YAC Y9091 a RM48 a RM54 Y4854, zatímco RM110 a RM111 reprezentují STS odvozené z inter-Alu-PCR. Pro celou řadu STS, zmapovaných uvnitř inzertů YAC klonů Y4854 a Y9091 se izolovaly odpovídající kosmidové klony pro analýzu FISH, např. cRM51, cRM69, cRM85, cRM90, cRM91, cRM110 a cRM111.

Inzerty dvou vzájemně se překrývajících YAC klonů nejsou pravděpodobně chimerické, jak bylo odvozeno z následujících pozorování. FISH analýza metafázových chromozomů normálních lidských lymfocytů, prováděná za použití Y4854 nebo Y9091 DNA jako molekulové sondy, poskytla hybridizační signály pouze v chromozomové oblasti 12q13-q15. To pro Y9091 potvrdila další pozorování, prováděná v rámci FISH studií, ve kterých se jako molekulová sonda použil kosmidový klon cRM90 nebo cRM91.

DNA inzert každého z těchto dvou kosmidů odpovídá alternativním koncovým sekvencím YAC klonu Y9091. Konečně STS koncové sekvence Y9091 jsou zmapovány v chromozomu 12 a daleko od CHOP genu, který se určil pomocí PCR analýzy na PK89-12 DNA, která obsahuje lidský chromozom 12, jako celý lidský chromozom v křeččím genetickém pozadí a LIS-3/SV40/A9-B4 DNA, která, jak již bylo naznačeno, obsahuje der(16) ze specifické t(12;16) myxoidního

liposarkomu, ale neobsahuje ani der(12), ani normální chromozom 12 [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Kaźmierczak B, Bullerdiel J, Claussen U, Horsthemke B, Van den Berghe H, Van den Ven WJM (1993): Isolation of a somatic cell hybrid retaining the der(16)t(12;16)(q13;p11.2) from a myxoid liposarcoma cell line. Cell Genet Cytogenet 62: 159-161.]. Ze studií procházení chromozomem se odvodilo, že vzájemně se překrývající inzerty dvou DNA klonů reprezentují DNA oblast o velikosti přibližně 640 kbp, která se nachází na chromozomu 12q mezi D12S8 a CHOP. Protože byla 640 kbp kompozitní širokorozsahová restriční mapa YAC kontigu konstruovaná alespoň s dvojím překrytím celé oblasti, je nerozumné se domnívat, že 640 kbp oblast sousedí s chromozomovou DNA, ačkoliv mikrodeletace nelze v tomto ohledu vynechat.

Procházení chromozomy se rutinně vyhodnotilo FISH mapováním YAC klonů a/nebo kosmidových klonů, odpovídajících YAC inzertním sekvencím. Je třeba zmínit, že pro identifikaci chromozomů se ve většině případů použilo G-pásmování. Na základě tohoto G-pásmování mohly být hybridizační signály posléze přiřazeny chromozomům o známé identitě, což bylo rovněž důležité v případech, ve kterých byly případně pozorovány křížové hybridizační signály a hybridizační signály pozadí. G-pásmování, prováděné před FISH analýzou, má v některých případech za následek slabší hybridizační signály nebo neurčité pásmovací vzory. Z tohoto důvodu se provedly FISH experimenty, při kterých se YAC a kosmidové klony, které se měly hodnotit, použily v kombinaci s referenční sondou. Kosmidový klon cPK12qter, který se náhodně získal během screenování kosmidové knihovny, se zvolil jako referenční signální znak (marker). FISH analýza metafázových chromozomů normálních lymfocytů

(obr. 2A) poskytla cPK12qter mapy v telomerické oblasti dlouhého ramene chromozomu 12. Za účelem identifikace chromozomu 12 v tomto experimentu, se použila sonda p α 12H8, specifická pro centromer 12 [Looijenga LHJ, Smit VTHBM, Wessels JW, Mollevanger P, Oosterhuis JW, Cornelisse CJ (1990): Localization and polymorphism of a chromosome 12-specific α satellite DNA sequence. Cytogenet Cell Genet 53: 216-218.]. FISH analýza metafázových chromozomů Ad-312/SV40 buněk, používající YAC klon Y4854 (obr. 2B) nebo Y9091 (obr. 2C) v kombinaci s referenční sondou cPK12qret, poskytla v obou případech hybridizační signály YAC inzertu na der(1) a rovněž na der(12). Z těchto výsledků se usoudilo, že inzert DNA každého YAC klonu může překrývat zlomový bod chromozomu 12 v této buněčné linii. Je třeba uvést, že G-pásmování poskytlo telomerní společenství, zahrnující krátké rameno chromozomu 12, znázorněné na obrázku 2C. Pozorování toho, že YAC klon Y9091 překrývá v Ad-312/SV40 zlomový bod chromozomu 12 se nezávisle potvrdilo při studiích FISH, při kterých se použil kosmidový klon cRM90 nebo cRM91 jako molekulová sonda, a které ukázaly výskyt alternativních koncových sekvencí Y9091 inzertu. Zdá se, že cRM90 je zmapován daleko od zlomového bodu chromozomu 12, zatímco cRM91 se nachází v blízkosti tohoto zlomového bodu (data nejsou znázorněna). Tyto výsledky rovněž zakládají chromosomovou orientaci YAC kontigu, znázorněnou na obrázku 1. V souhrnu z těchto studií FISH vyplývá, že translokační zlomový bod chromozomu 12 v Ad-312/SV40 musí být umístěn v DNA intervalu, odpovídajícímu vzájemně se překrývajícím sekvencím (přibližně 300 kbp), dvou YAC klonů.

Podrobné mapování traslokačního zlomového bodu chromozomu 12 Ad-312/SV40

Při dalším zúžení oblasti translokačního bodu chromozomu 12 Ad-312/SV40 se uvnitř YAC klonu Y9091 izolovaly kosmidové klony s různými mapovacími polohami. Tyto klony zahrnovaly cRM69, cRM85, cRM110 a cRM111. Na základě STS sekvencí YAC klonů se izolovaly cRM69 a cRM85, které zde nejsou znázorněny. Klony cRM110 a cRM111 se získaly pomocí inter-Alu-PCR. Analýza Southernova přenosu ukázala, že cRM110 hybridizuje na koncový MluI fragment Y9091 a nikoliv na DNA inzert vzájemně se překrývajícího YAC klonu s cRM69 jako telomerní koncovou sekvencí. Oblast cRM110 je naznačena na obrázku 1. Ukázalo se, že cRM111 hybridizuje na BssHII, MluI, PvuI a SfiI fragmentu Y9091 a je tedy lokalizován v PvuI-SfiI fragmentu Y9091, ve kterém byl rovněž zmapován STS RM48 (obr. 1). FISH analýza metafázových chromozomů Ad-312/SV40 za použití cRM69 nebo cRM110 jako sondy naznačila, že DNA inzert těchto kosmidů je zmapován v blízkosti translokačního zlomového bodu chromozomu 12 v této linii, jak ukazuje obrázek 3A pro cRM69. Následná FISH analýza Ad-312/SV40, využívající jako sondu cRM85 nebo cRM111, poskytla hybridizační signály daleko od translokačního zlomového bodu, jak ukazuje obrázek 3B pro cRM111. Výsledky, získané pro cRM85 a cRM111, se shodují s rozpětím zlomového bodu, získaného pomocí YAC klonu Y4854 jako cRM85 mapy daleko od cRM111 a blízko k STS RM48, které označuje telomerní konec YAC klonu Y4854. Závěrem je možné říci, že translokační bod chromozomu 12 v Ad-312/SV40 musí být lokalizován v DNA intervalu mezi cRM110 a cRM111, jak schematicky znázorňuje obrázek 4.

Vyhodnocení FISH zlomových bodů chromozomu 12 v dalších buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz

Pro stanovení relativní polohy zlomových bodů chromozomu 12, vzhledem ke zlomovým bodům Ad-312/SV40, se pomocí analýzy FISH prozkoumaly další dvě buněčné linie pleomorfního adenomu slinných žláz, jak schematicky znázorňuje obrázek 4. Tyto buněčné linie, které se vyvinuly z primárních nádorů [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. *Genomics*, 20: 210-222.; Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiek J (1990): In vitro transformation by the SV40 "early region" of cells from a human benign salivary gland tumour with a 12q13→q15 rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 53: 37-39.], zahrnující Ad-248/SV40, Ad-263/SV40, Ad-295/SV40, Ad-302/SV40 a Ad-366/SV40. Odchytky chromozomu 12 těchto buněčných linií jsou shrnuty na obrázku 4. Analýza FISH metafázových chromozomů těchto buněčných linií využívající cRM91 ukázala, že zlomové body všech těchto buněčných linií jsou zmapovány v blízkosti tohoto kosmidového klonu (data nejsou uvedena). Podobná analýza FISH se rovněž provedla za použití kosmidového klonu, odpovídajícího STS, RM103 jako sondy. RM103 byly zmapovány v blízkosti RM91, přesněji ve vzdálenosti přibližně 0,9 Mbp. Ve všech případech se ukázalo, že cRM103 se nachází daleko od translokačních zlomových bodů chromozomu 12 což naznačuje, že zlomové body chromozomu 12 v těchto pěti buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz jsou lokalizovány v relativně velké vzdálenosti od zlomových bodů Ad-312/SV40 buněk.

DISKUSE

Ve zde prezentovaných studiích se identifikovala, molekulárně klonovala a charakterizovala chromozomová oblast na dlouhém rameni chromozomu 12, ve které byl zmapován translokační zlomový bod buněčné linie Ad-312/SV40 pleomorfního adenomu slinných žláz. Ve dřívějších studiích [Schoenmakers HFPM, Kools PFJ, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJM (1993): Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myoxid liposarcoma. Genomics, 20: 210-222.] byl již poskytnut důkaz o tom, že se zlomový bod chromozomu 12 této buněčné linie nachází mezi místem D12S8 a CHOP. Vzhledem k tomu, že zmíněné dva zlomové body překrývají popsané YAC klony, zmapovaly experimenty směrového procházení chromozomy, které použily D12S8 a CHOP gen jako výchozí body, zlomové body chromozomu 12 a potvrdily tak dřívější tvrzení. FISH výsledky, získané pomocí kompletního YAC inzertu Y9091 jako molekulární sondy, se potvrdily nezávisle ve studiích FISH, používajících kosmidové klony obsahující sekvence, odpovídající různým oblastem zmíněného inzertu tohoto YAC klonu. Tento fakt je velmi důležitý, protože nezávislé potvrzující výsledky činí nepravděpodobným to, že signály dělení zjištěné za použití kompletního inzertu Y9091, by bylo množné vysvětlit jinak, než skutečným dělením sekvencí, reprezentovaných v YAC. Například přítomnost velmi blízkých genetických sekvencí na obou stranách zlomového bodu chromozomu by mohla snadno vést k chybnému závěru, pokud by se vycházelo pouze z FISH výsledků YAC inzertu. Konečně předložené mapovací studie umožnily následně stanovit chromozomovou orientaci širokorozsahové

restrikční mapy. Tuto orientaci již bylo možné předpokládat na základě dvoubarevných FISH studií (nepublikovaná pozorování).

Zde popsané FISH studie umožnily zmapování zlomového bodu chromozomu 12 v Ad-312/SV40 buňkách v 190 kbp DNA intervalu mezi stanovenými STS RM48 a RM69. Nicméně oblast zlomového bodu lze na základě následujících skutečností ještě o něco zúžit. Fakt, že Y4854, jak se ukázalo, překrývá zlomový bod, naznačuje, že alespoň podstatná část telomerní poloviny tohoto YAC klonu musí být zmapována daleko od zmíněného zlomového bodu. Je třeba určit kolik přesně zbývá. Na druhé straně se zdá, že se STS RM69 nachází přibližně ve středu DNA inzertu kosmidového klonu cRM69, což dává tušit, že zlomový bod bude lokalizován ve vzdálenosti 25 kbp od RM69. Kromě toho cRM69 postrádá RM110 (data nejsou uvedena), a protože se cRM110 nachází v blízkosti zlomového bodu chromozomu 12 v Ad-312/SV40 buňkách, měl by se tento zlomový bod nacházet ještě ve větší vzdálenosti od RM69 než je dříve zmíněných 25 kbp. Tyto skutečnosti dohromady zužují oblast zlomového bodu chromozomu 12 na DNA interval, který musí být podstatně menší než 165 kbp. Další konkretizování zlomového bodu umožní molekulární klonování zlomového bodu chromozomu 12 a charakterizování genových sekvencí ve spojovací oblasti zlomových bodů, které mohou vést k identifikování patogeneticky relevantních sekvencí. Identifikace genů, přítomných v DNA inzertech YAC klonů Y4854 a Y9091 pomocí sekvencování, přímé hybridizace, přímé selekce nebo záchytu exonů, by mohla tvořit užitečný alternativní přístup pro identifikaci genu v této oblasti dlouhého ramene chromozomu 12, která by mohla být patogeneticky kritická pro vývoj pleomorfního adenomu slinných žláz.

Pozorování, která ukázala, že se zlomové body chromozomu 12 v dalších pleomorfních adenomech slinných žláz nacházejí ve vzdálené a bližší oblasti na dlouhém rameni chromozomu 12, jsou zajímavá. To by mohlo vést k závěru, že jsou zlomové body chromozomu 12 v pleomorfních adenomech slinných žláz dispergovány v relativně velké DNA oblasti dlouhého ramene chromozomu 12, což připomíná 11q13 zlomové body B-buněčných malignancí [Raynaud SD, Bekri S, Leroux D, Grosgeorge J, Klein B, Bastard C, Gaudray P, Simon MP (1993): Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies. *Genes Chrom Cancer* 8: 80-87.]. Objasnění přesného umístění zlomových bodů chromozomu 12 v dalších buněčných liniích pleomorfního adenomu slinných žláz by mohlo vnést více světla do této problematiky. Na druhé straně by se mohla pozornost zaměřit na alternativní sekvence na dlouhém rameni chromozomu 12 mezi D12S8 a CHOP genem, které by mohly být, jak lze předpokládat, důležité pro růstovou regulaci v pleomorfním adenomu slinných žláz. Vzhledem ke skutečnosti, že zde popsaná oblast zlomového bodu chromozomu 12 másofar byla zjištěna pouze v Ad-312/SV40 buněčné linii, je nutné provést analýzu většího počtu adenomů slinných žláz s chromozomovými 12q13-q15 odchylkami, která by poskytla obrázek o potenciální relevanci sekvencí chromozomu 12 ve studované buněčné linii pro vývoj nádoru. Pokud by bylo v této konkrétní oblasti chromozomu 12 nalezeno více případů s odchylkami, bylo by zajímavé zjistit, zda tyto nádory tvoří klinickou podskupinu. Konečně chromozomové translokace, zahrnující oblast q13-q15 lidského chromozomu 12, byly zaznamenány v celé řadě dalších pevných nádorů: v benigních adiposových tkáňových nádorech, v děložním leiomyomu, v rabdomy-

osarkomu, v hemangiopericytomu, v sarkomu čiré buňky, v chondromatózních nádorech a v hemartomu plic. Zbývá tedy zjistit, zdali jsou zlomové body chromozomu 12 v některém z těchto nádorů mapovány ve stejné oblasti jako v případě Ad-312/SV40. Popsané YAC a kosmidové klony v této zprávě představují užitečné nástroje pro toto zjištění.

Stručný popis obrázků k dodatku 2

Obrázek 1

Znázorňuje kompozitní fyzikální mapu vzájemně se překrývajících DNA inzertů YAC klonů Y4854 a Y9091. Velikosti DNA inzertů jsou naznačeny. Relativní polohy YAC klonů jsou naznačeny pomocí čar pod širokorozsahovou fyzikální mapou. Místa se sekvenční adresou (STS), odpovídající koncovým klonům YAC, které zde nejsou znázorněny, jsou označeny pomocí zarámovaných RM kódů nad restriční mapou. STS, získané z inter-Alu-PCR produktů, jsou uvedeny pod restriční mapou a DNA oblasti, ve kterých se mapovalo, jsou vyznačeny pomocí šipek.

B: BssHII; M: MluI; P: PvuI; Sf: SfiI.

Polymorfní MluI místo je označeno hvězdičkou.

Obrázek 2

A) mapuje kosmidový klon cPK12qter do telomerní oblasti dlouhého ramene chromozomu 12. Sonda pa12H8, specifická pro centromer 12, se použila pro stanovení identity chromozomu 12. Analýza FISH se provedla na metafázových chromozomech kontrolních lidských lymfocytů.

Hybridizační signály cPK12qter jsou označeny pomocí malých kótových šipek a signály sondy, specifické pro centromer 12, hvězdičkami.

B), C) znázorňují FISH analýzy metafázových chromozomů Ad-312/SV40 buněk, používající DNA YAC klonu Y4854 (B) nebo Y9091 (C) jako molekulární sondu v kombinaci s kosmidovým klonem cPK12qter jako referenčním signálním znakem (markrem). Hybridizační signály YAC klonů na chromozomu 12 jsou označeny pomocí velkých kótových šipek; přičemž signály na der(1) pomocí velkých šipek, resp. signály na der(12) pomocí malých šipek. Hybridizační signály kosmidového klonu cPK12qter jsou označeny malými kótovými šipkami.

Obrázek 3

Znázorňuje FISH analýzu metafázových chromozomů Ad-312/SV40 buněk, používající DNA kosmidový klon cRM69 (A) nebo cRM111 (B) jako molekulovou sondu v kombinaci s kosmidovým klonem cPK12qter jako referenčním signálním znakem (markerem). Pozice hybridizačních signálů cPK12qter jsou označeny malými kótovými šipkami. Na (A) je poloha hybridizačního signálu cRM69 na normálním chromozomu 12 naznačena velkou kótovou šipkou a hybridizační signál na der(12) malou šipkou. Na (B) je poloha hybridizačního signálu cRM111 na normálním chromozomu 12 naznačena velkou kótovou šipkou a hybridizační signál na der(1) malou šipkou.

Obrázek 4

Schematicky znázorňuje data, získaná pomocí mapování FISH, šesti buněčných linií pleomorfního adenomu slinných žláz, testovaných v této studii. Získaly se odchylky specifické pro chromozom 12 v různých buněčných liniích. Kosmidové klony, které se použily jako sondy ve FISH mapovacích studiích odpovídají STS, získaným ze vzájemně se překrývajících YAC klonů. Jednotlivé FISH experimenty se označily tečkami. Kosmidové klony se nazvaly podle akronymů STS, které jsou uvedeny v rámečcích, a jejichž relativní pořadí odpovídá prezentovanému pořadí. Zjistilo se, že DNA interval mezi RM90 a RM103 představuje přibližně 1,3 Mb. Inzert: schematická reprezentace G-pásmovaných odvozených chromozomů der(1) a der(12) Ad-312/SV40 buněčné linie, která nese $t(1;12)(p22;q15)$. Pozice zlomových bodů chromozomu 12 Ad-248/SV40, Ad-263/SV40, Ad-295/SV40, Ad-302/SV40 a Ad-366/SV40 jsou daleko od RM103, jak naznačuje šipka.

h

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Gen vícenádorového odchylného růstu (MAG) mající nukleotidovou sekvenci některého z řetězců některého ze členů genů vysoce mobilní skupiny proteinů nebo genů LIM proteinu včetně jeho modifikovaných verzí.

2. Gen podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že má v podstatě nukleotidovou sekvenci HMGI-C genu, znázorněnou na obrázku 7, nebo jeho komplementární řetězec včetně modifikovaných nebo prodloužených verzí obou řetězců.

3. Gen podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že má v podstatě nukleotidovou sekvenci LPP genu, znázorněnou na obrázku 5, nebo jeho komplementární řetězec včetně modifikovaných nebo prodloužených verzí obou řetězců.

4. Gen podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a č e n ý t í m , že je použitelný jako výchozí bod pro navržení vhodných sloučenin modulujících expresi nebo pro techniky ošetření nefyziologického proliferčního jevu u člověka nebo zvířete.

5. Gen podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a č e n ý t í m , že je použitelný jako výchozí bod pro navržení vhodných nukleotidových sond pro (klinické/lékařské) diagnostikování buněk, majících nefyziologicky proliferační kapacitu v porovnání se standardními buňkami.

6. Protein kódovaný genem mnohonádorového odchylného růstového (MAG) genu podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a - č e n ý t í m , že je použitelný jako výchozí bod pro navržení vhodných nukleotidových sond pro (klinické/lékařské) diagnostikování buněk, majících nefyziologicky proliferační kapacitu v porovnání se standardními buňkami.

7. Deriváty MAG genu podle nároku 1, 2 nebo 3 nebo jejich bezprostřední okolí, v y z n a č e n é t í m , že jsou použitelné pro diagnostikování a přípravu terapeutických kompozic, v nichž jsou zmíněné deriváty zvoleny ze skupiny zahrnující smyslnou a protismyslnou cDNA nebo její fragmenty, transkripty genu nebo jeho prakticky použitelné fragmenty, protismyslnou RNA, fragmenty genu nebo jeho komplementárního řetězce, proteiny kódované genem nebo jeho fragmenty, protilátky namířené proti genu, cDNA, transkript, protein nebo jeho fragmenty a rovněž fragmenty protilátky.

8. In situ diagnostický způsob diagnostikování buněk majících nefyziologickou proliferační kapacitu,

20.04.98

v y z n a ě n ý t í m , že zahrnuje alespoň některé z následujících kroků:

a) navržení sady nukleotidových sond na základě informace, kterou je možné získat z nukleotidové sekvence MAG genu podle nároku 1 nebo 2, přičemž jedna ze sond je hybridizovatelná do oblasti odchylného genu, která je zmapována v podstatě ve stejném místě jako odpovídající oblast standardního genu, a druhá sonda je hybridizovatelná do oblasti odchylného genu, která je zmapována v jiném místě než odpovídající oblasti standardního genu;

b) inkubování jednoho nebo více interfázových nebo metafázových chromozomů nebo buněk majících nefyziologickou proliferaci sondou za hybridizačních podmínek; a

c) vizualizace hybridizace mezi sondou a genem.

9. Způsob diagnostikování buněk majících nefyziologickou proliferaci, v y z n a ě n ý t í m , že obsahuje alespoň některé z následujících kroků:

a) odběr biopsie buněk, které mají být diagnostikovány;

b) izolování vhodné makromolekuly příbuzné s MAR z těchto buněk;

c) analyzování takto získané makromolekuly porovnáním se standardním typem referenční molekuly, výhodně ze stejného jedince.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a ě n ý t í m , že zahrnuje alespoň některé z následujících kroků:

a) odběr biopsie buněk, které mají být diagnostikovány;

- b) extrahování jeho celé RNA;
- c) přípravu alespoň jedné první řetězové cDNA mRNA druhů v celkovém RNA extraktu, ve kterém cDNA obsahuje vhodný konec;
- d) provedení PCR a/nebo RT-PCR za použití primeru specifického pro MAG gen a primeru specifického pro konec a/nebo specifického pro partnera/uhnížděného primeru za účelem amplifikace cDNA specifického pro MAG gen;
- e) separování PCR produktů na gelu a získání vzoru pásem;
- f) vyhodnocení přítomnosti odchylných pásů porovnáním se standardními typy pásem, výhodně pocházejícími ze stejného jedince.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje alespoň některé z následujících kroků:

- a) odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány;
- b) izolování celého proteinu z těchto buněk;
- c) separování celkového proteinu na gelu a získání v podstatě individuálních pásem a případně přenesení těchto pásem na Westernovu membránu;
- d) hybridizaci takto získaných pásů pomocí protilátek namířených proti části proteinu kódovaného zbývajících částí MAG genu a proti části proteinu kódovaného substituovanou částí MAG genu;
- e) vizualizace reakcí antigenu a protilátky a stanovení přítomnosti odchylných pásem porovnáním s pásmy ze standardních proteinů, výhodně pocházejícími ze stejného jedince.

20.04.98

146

12. Způsob podle nároku 9, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje alespoň některé z následujících kroků:

- a) odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány;
- b) izolování celé DNA z těchto buněk;
- c) digerování DNA pomocí jednoho nebo více tzv. „vzácně štěpících“ restričních enzymů;
- d) separování takto připraveného digestu na gelu a získání separačního vzoru;
- e) případný přenos separačního vzoru na Southernovu membránu;
- f) hybridizace separačního vzoru v gelu nebo na membráně pomocí jedné nebo více informativních sond za hybridizačních podmínek;
- g) vizualizace hybridizací a stanovení přítomnosti odchylných pásem porovnáním se standardním typem pásem, výhodně pocházejících ze stejného jedince.

13. Způsob podle nároku 9, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje alespoň některé z následujících kroků:

- a) odebrání biopsie buněk, které mají být diagnostikovány;
- b) extrahování mRNA z těchto buněk;
- c) stanovení přítomnosti nebo (relativního) množství mRNA odvozené z MAG genu; a
- d) porovnání výsledků z kroku c) s výsledkem podobného experimentu prováděného se standardním typem buněk, výhodně pocházejících ze stejného jedince.

20.04.98

14. Způsob podle některého z nároků 8 až 13, v y z n a č e n ý t í m , že uvedené buňky, mající nefyziologickou proliferační kapacitu, se zvolí ze skupiny zahrnující hemartomy mesenchymálních nádorů (např. prsu a plic), adipóзовé tkáňové nádory (např. lipomy), pleomorfní adenomy slinných žláz, děložní leiomyomy, angiomyxomy, fibroadenomy prsu, polypy endometria, aterosklerotické plaký a další benigní nádory a rovněž různé maligní nádory, například včetně sarkomů (např. rabdomyosarkomu, osteosarkomu) a karcinomů (např. prsu, plic, kůže, štítné žlázy) a hematologických zhoubných nádorů, např. leukemiů a lymfomů.

15. Protismyslné molekuly MAG genu podle nároku 1,2 nebo 3, v y z n a č e n é t í m , že jsou použitelné při léčení chorob, zahrnujících buňky mající nefyziologickou proliferační kapacitu, modulací exprese tohoto genu.

16. Expresní modulátory, například inhibitory nebo zesilovače, včetně ribozymů MAG genu podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a č e n é t í m , že jsou použitelné při léčení chorob, zahrnujících buňky mající nefyziologické proliferační kapacity.

17. Protismyslné RNA molekuly komplementární k mRNA molekulám MAG genu a/nebo protilátky, namířené protigenovému produktu MAG genu podle nároku 1, 2 nebo 3, v y z n a č e n é t í m , že jsou použitelné při léčení

chorob, zahrnujících buňky mající nefyziologické proliferální kapacity.

18. Diagnostická souprava pro provádění způsobu podle nároku 8, v y z n a č e n á t í m , že zahrnuje vhodnou sadu označených nukleotidových sond.

19. Diagnostická souprava pro provádění způsobu podle nároku 10, v y z n a č e n á t í m , že zahrnuje vhodnou sadu označených sond.

20. Diagnostická souprava pro provádění způsobu podle nároku 11, v y z n a č e n á t í m , že zahrnuje vhodnou sadu označených PCR primerů, specifických pro MAG gen a specifických pro konec.

21. Diagnostická souprava pro provádění způsobu podle nároku 11, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje vhodnou sadu označených sond a vhodné vzácně štěpící restriční enzymy.

22. Farmaceutická kompozice pro snižování úrovně exprese MAG genu v buňkách majících nefyziologickou proliferální kapacitu, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje jeden nebo více derivátů podle nároku 7 a/nebo jeden nebo více modulátorů exprese podle nároku 16.

23. Farmaceutická kompozice podle nároku 22, v y z n a č e n á t í m , že uvedené buňky, mající nefyziologickou proliferační kapacitu, se zvolí ze skupiny zahrnující hemartomy mesenchymálních nádorů (např. prsu a plic), adipóзовé tkáňové nádory (např. lipomy), pleomorfní adenomy slinných žláz, děložní leiomyomy, angiomyxomy, fibroadenomy prsu, polypy endometria, aterosklerotické plaký a další benigní nádory a rovněž různé maligní nádory, například včetně sarkomů (např. rabdomyosarkomu, osteosarkomu) a karcinomů (např. prsu, plic, kůže, štítné žlázy) a hematologických zhoubných nádorů, např. leukemiů a lymfomů.

24. Použití derivátů podle nároku 7 pro přípravu diagnostické soupravy nebo farmaceutické kompozice pro diagnostikování nebo léčení chorob nebo poruch zahrnujících buňky mající nefyziologickou proliferační kapacitu.

25. Použití modulátorů exprese podle nároku 16 pro přípravu farmaceutické kompozice pro diagnostikování nebo léčení chorob nebo poruch zahrnujících buňky mající nefyziologickou proliferační kapacitu.

26. Použití podle nároku 24 nebo 25, v y z n a č e n é t í m , že uvedené buňky, mající nefyziologickou proliferační kapacitu, se zvolí ze skupiny zahrnující hemartomy mesenchymálních nádorů (např. prsu a plic),

adipózní tkáňové nádory (např. lipomy), pleomorfní adenomy slinných žláz, děložní leiomyomy, angiomyxomy, fibroadenomy prsu, polypy endometria, aterosklerotické plaky a další benigní nádory a rovněž různé maligní nádory, například včetně sarkomů (např. rabdomyosarkomu, osteosarkomu) a karcinomů (např. prsu, plic, kůže, štítné žlázy) a hematologických zhoubných nádorů, např. leukemií a lymfomů.

27. Způsob izolace dalších MAG genů na základě existence fúzních genů, fúzního transkriptu nebo fúzního proteinu v nádorové buňce, v y z n a č e n ý t í m , že používá alespoň části MAG genu pro navržení molekulových nástrojů (sond, primerů atd.).

28. MAG geny získané způsobem podle nároku 27.

29. MAG geny podle nároku 28, v y z n a č e n é t í m , že jsou použitelné při diagnostických nebo terapeutických metodách.

~~30. Zvířecí model pro testování použitelnosti~~
sloučenin nebo kompozic při léčení chorob nebo poruch zahrnujících buňky mající nefyziologickou proliferační kapacitu, v y z n a č e n ý t í m , že uvedeným zvířetem je transgenové zvíře, v jehož genomu se vyskytuje MAG gen.

31. Zvířecí model podle nároku 30, v y z n a č e n ý t í m , že MAG genem je odchylný MAG gen, například fúzní produkt zbývající části genu a substituční části jeho translokačního partnera.

32. Zvířecí model podle nároku 30, v y z n a č e n ý t í m , že MAG gen vykazuje nefyziologickou úroveň exprese.

33. Zvířecí model pro testování použitelnosti sloučenin nebo kompozic při léčení chorob nebo poruch zahrnujících buňky mající nefyziologickou proliferační kapacitu, v y z n a č e n ý t í m , že zvíře má v genomu alespoň části svých buněk specifickou genetickou odchylku, ovlivňující MAG gen podle nároku 1, 2 nebo 3, přičemž tato odchylka je indukována homologickou rekombinací v zárodečných kmenových buňkách.

34. Zvířecí model podle některého z nároků 30 až 33, v y z n a č e n ý t í m , že uvedeným zvířetem je savec, zejména myš, krysa, pes, prase nebo vyšší primát, například šimpanz.

35. Polynukleotidové nebo oligonukleotidové sondy a primery, které jsou popsány v popisu a obrázcích.

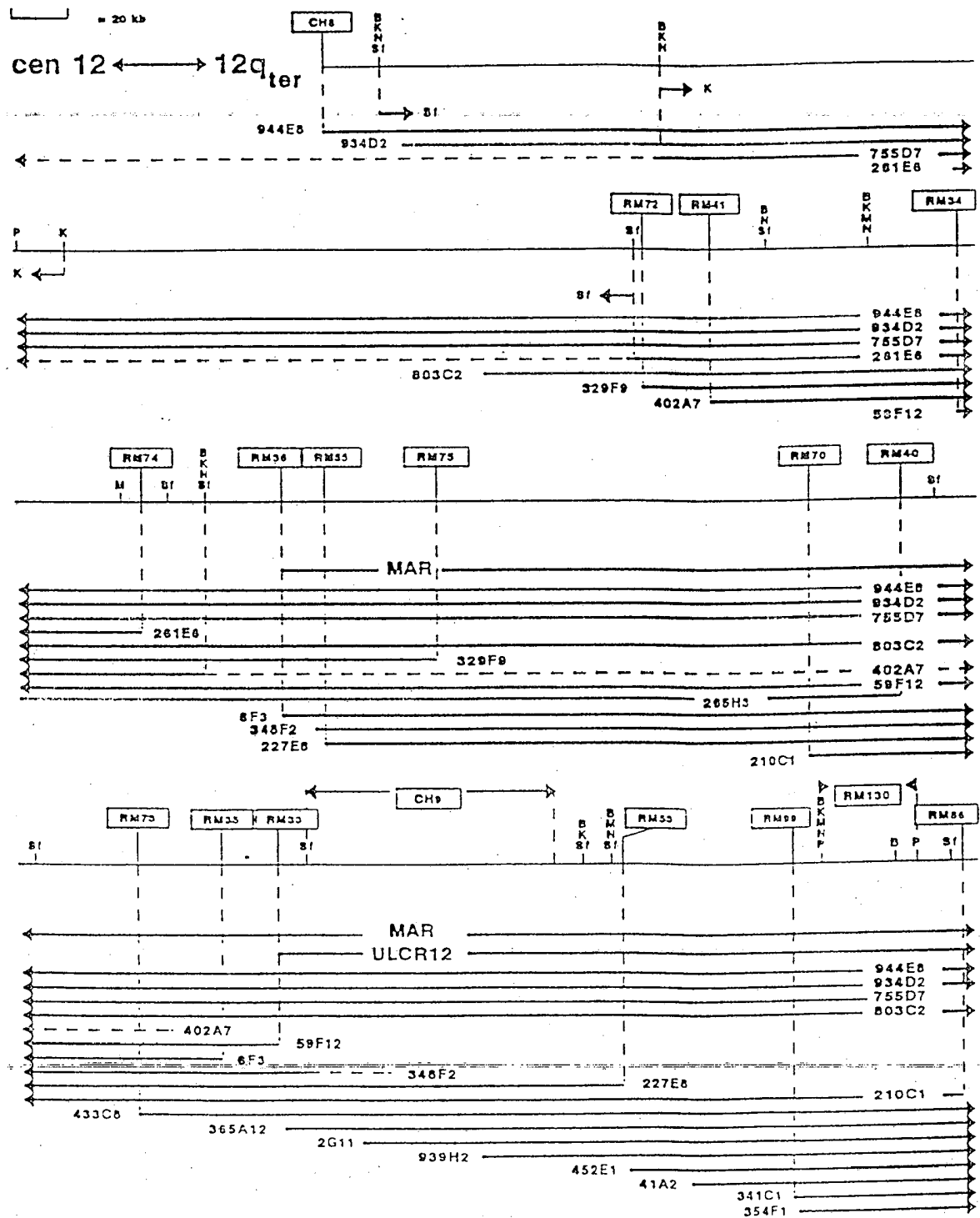
Zastupuje:

ly

20.04.98

PV 445-97

4219

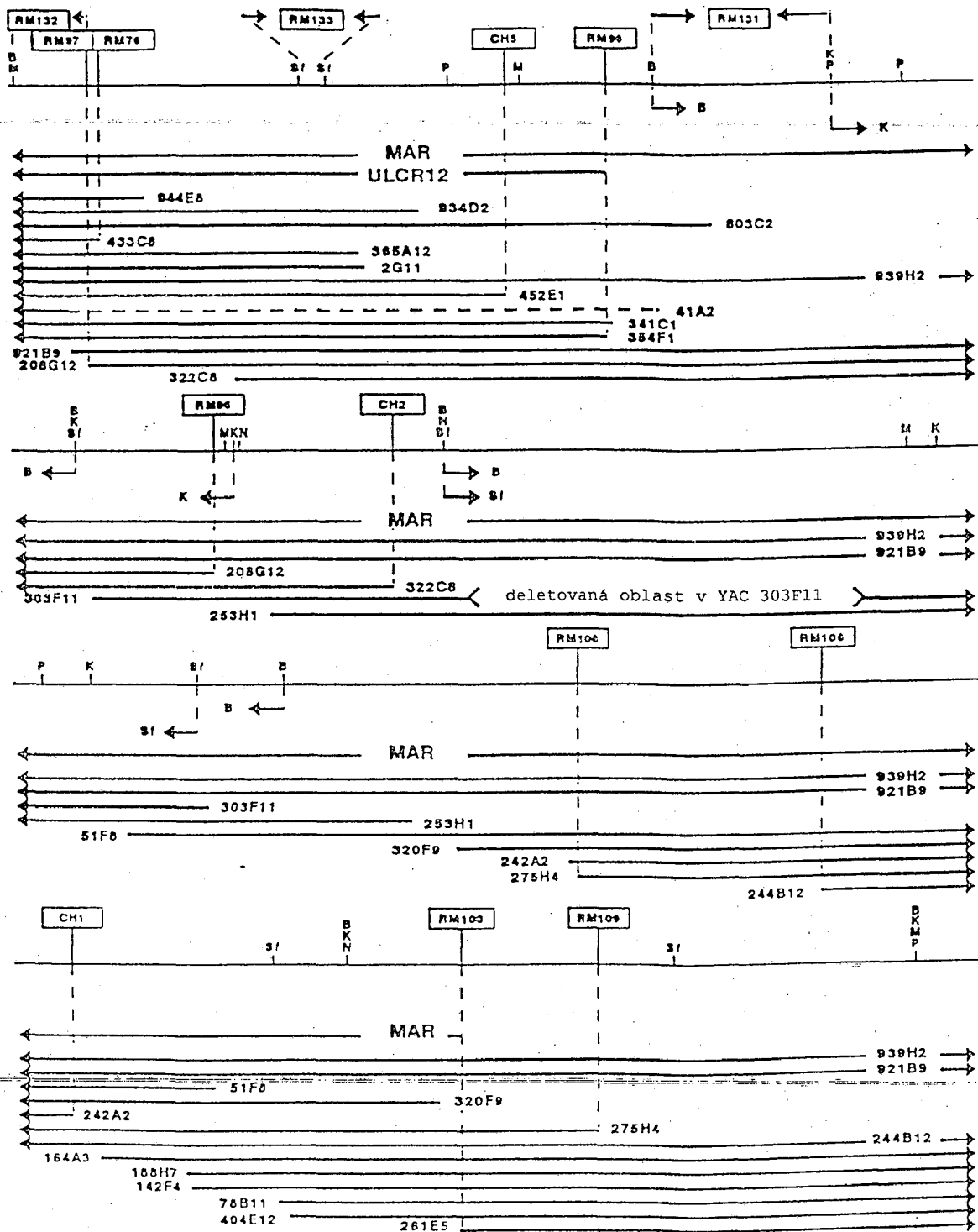


Obr. 1-1

64

20.04.98

2/21

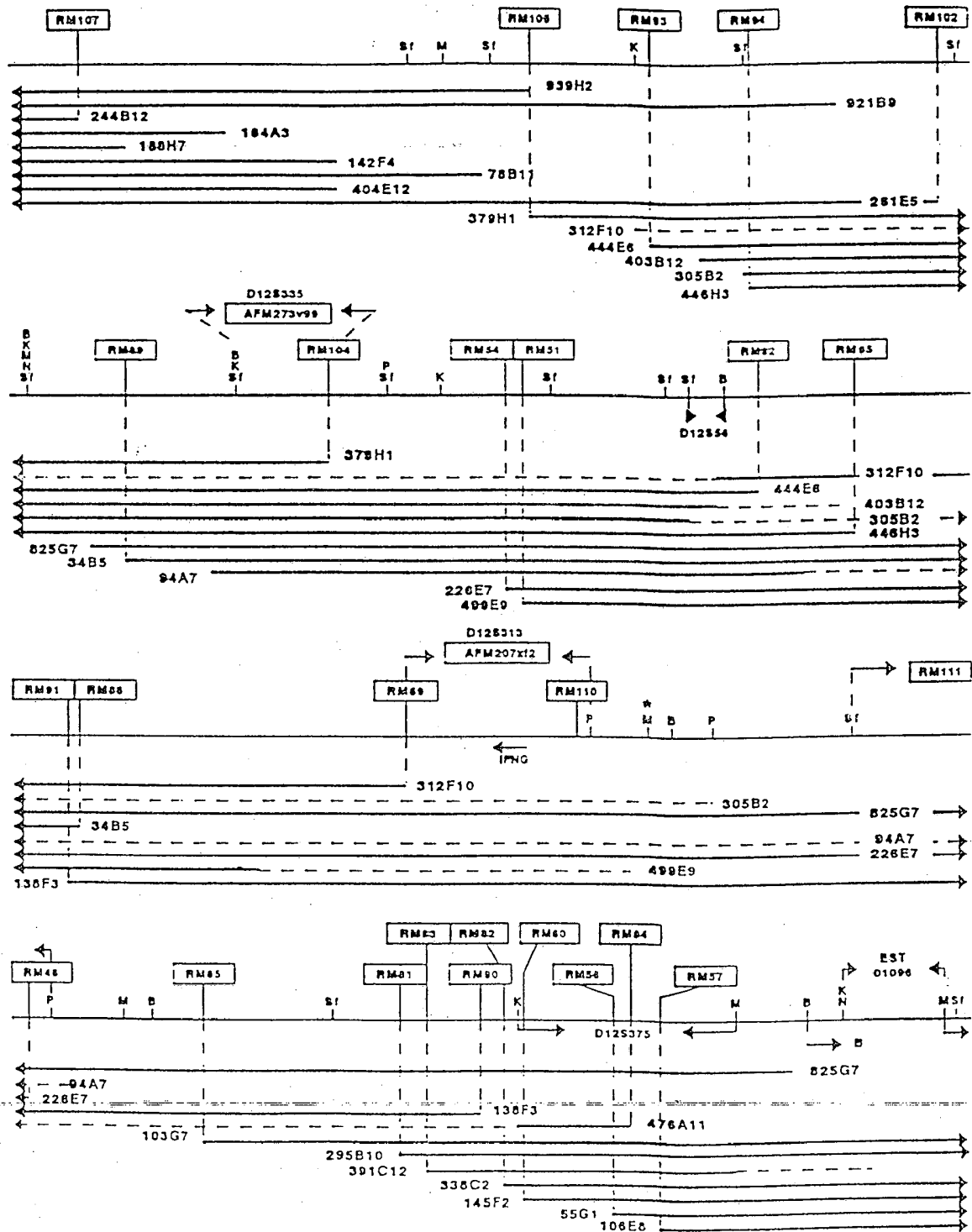


Obr, 1-2

14

20.04.98

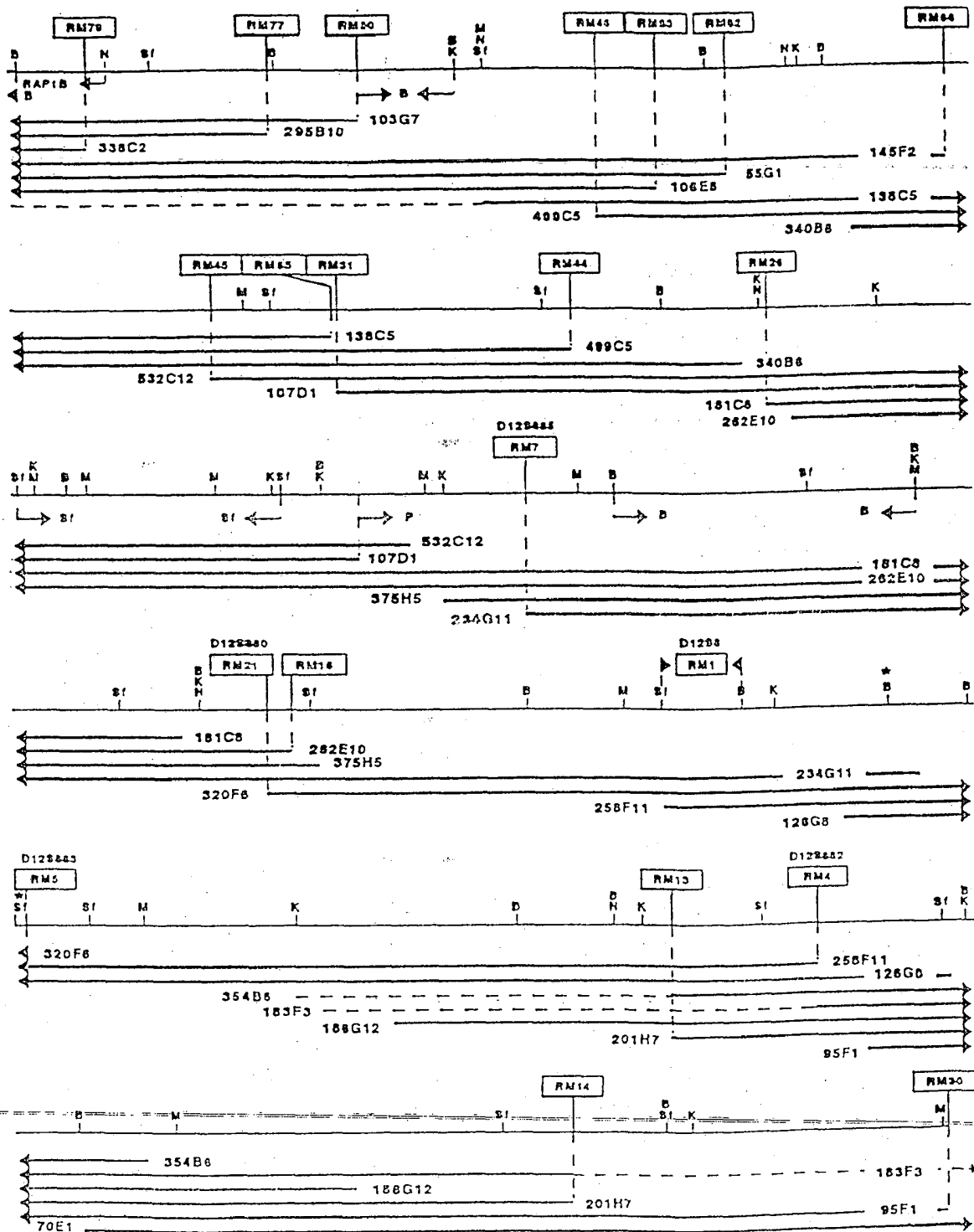
3/21



Obr. 1-3

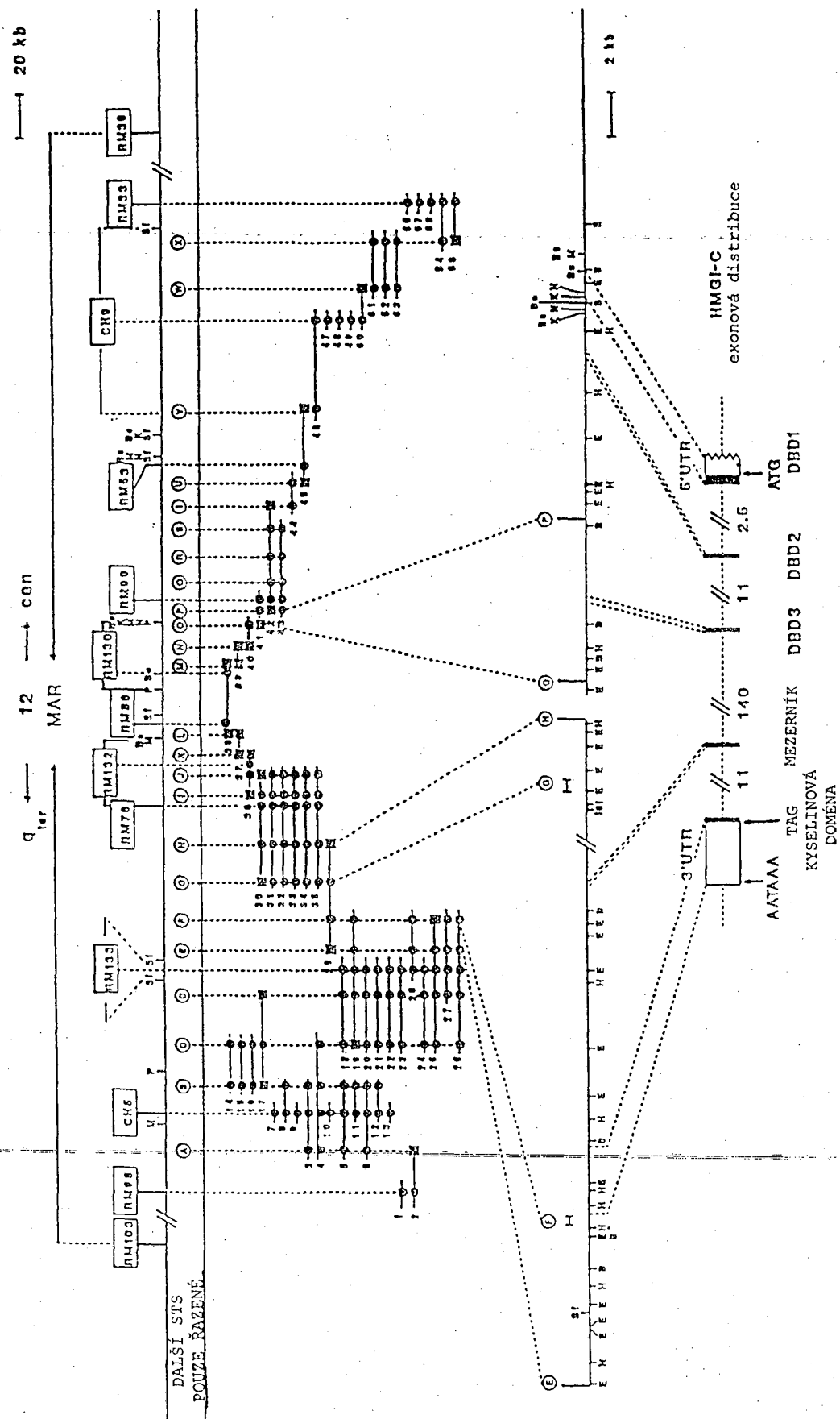
20.04.98

4/21



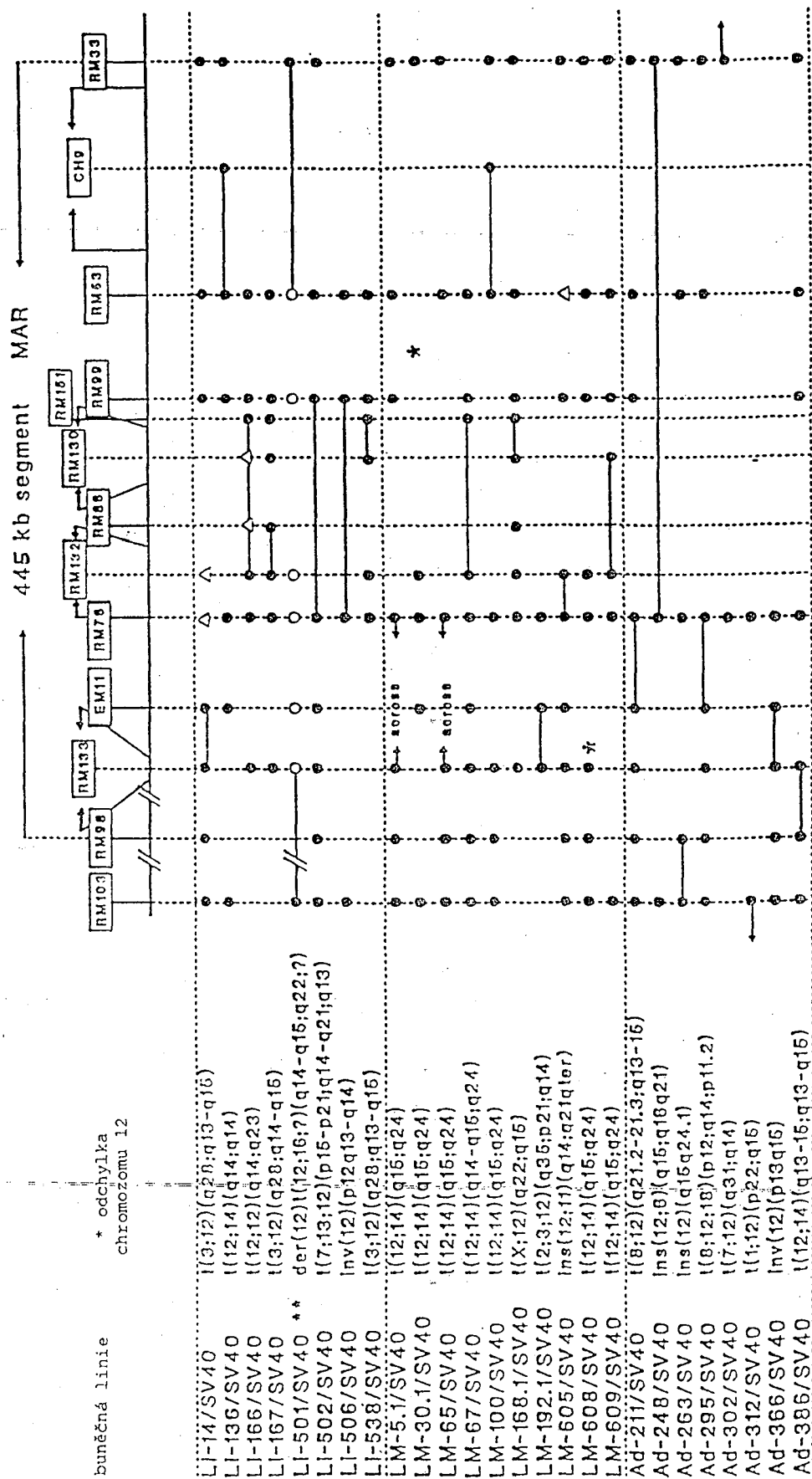
Obr. 1-4

h



2. Photo.

h



* cytogenetická poslední informace

** FISH analýza označila segment oblasti MAR, který je přítomen v cytogeneticky normálním chromozomu 3

Obr. 3

20.04.98

7/21

Obr. 4

	CG	CTT	CAG	AAG	AGA	GGA	CGC	GGC	CGC	CCC	AGG	AAG	CAG	CAG	CAA	A	45
	L	Q	K	R	G	R	G	R	P	R	K	Q	Q	Q	Q	K	
	AA	CCA	ACC	GGT	GAG	CCC	TCT	CCT	AAG	AGA	CCC	AGG	GGA	AGA	CCC	A	90
	P	T	G	E	P	S	P	K	R	P	R	G	R	P	K		
	AA	GGC	AGC	AAA	AAC	AAG	AGT	CCC	TCT	AAA	GCA	GCT	CAA	GAG	GAA	G	135
	G	S	K	N	K	S	P	S	K	A	A	Q	E	E	A		
	CA	GAA	GCC	ACT	GAA	GAA	AAA	CGG	CCA	AGG	GGC	AGA	CCT	AGG	AAA	T	180
	E	A	T	E	E	K	R	P	R	G	R	P	R	K	W		
HM5	GGT	GGT	GGC	CAT	TCA	GGG	CAA	CTG	GGG	CCT	TCG	TCA	GTT	GCC	CCT	T	225
4pp	G	G	H	S	G	Q	L	G	P	S	S	V	A	P	S		
	CA	TTC	CGC	CCA	GAG	GAT	GAG	CTT	GAG	CAC	CTG	ACC	AAA	AAG	ATG	C	270
	F	R	P	E	D	E	L	E	H	L	T	K	K	M	L		
	TG	TAT	GAC	ATG	GAA	AAT	CCA	CCT	GCT	GAC	GAA	TAC	TTT	GGC	CGC	T	315
	Y	D	M	E	N	P	P	A	D	E	Y	F	G	R	C		
	GT	GCT	CGC	TGT	GGA	GAA	AAC	GTA	GTT	GGG	GAA	GGT	ACA	GGA	TGC	A	360
	A	R	C	G	E	N	V	V	G	E	G	T	G	C	T		
	CT	GCC	ATG	GAT	CAG	GTC	TTC	CAC	GTG	GAT	TGT	TTT	ACC	TGC	ATC	A	405
	A	M	D	Q	V	F	H	V	D	C	F	T	C	I	I		
	TC	TGC	AAC	AAC	AAG	CTC	CGA	GGG	CAG	CCA	TTC	TAT	GCT	GTG	GAA	A	450
	C	N	N	K	L	R	G	Q	P	F	Y	A	V	E	K		
	AG	AAA	GCA	TAC	TGC	GAG	CCC	TGC	TAC	ATT	AAT	ACT	CTG	GAG	CAG	T	495
	K	A	Y	C	E	P	C	Y	I	N	T	L	E	Q	C		
	GC	AAT	GTG	TGT	TCC	AAG	CCC	ATC	ATG	GAG	CGG	ATT	CTC	CGA	GCC	A	540
	N	V	C	S	K	P	I	M	E	R	I	L	R	A	T		
	CC	GGG	AAG	GCC	TAT	CAT	CCT	CAC	TGT	TTC	ACC	TGC	GTG	ATG	TGC	C	585
	G	K	A	Y	H	P	E	C	F	T	C	V	M	C	H		
	AC	CGC	AGC	CTG	GAT	GGG	ATC	CCA	TTC	ACT	GTG	GAT	GCT	GGC	GGG	C	630
	R	S	L	D	G	I	P	F	T	V	D	A	G	G	L		
	TC	ATT	CAC	TGC	ATT	GAG	GAC	TTC	CAC	AAG	AAA	TTT	GCC	CCG	CGG	T	675
	I	H	C	I	E	D	F	H	K	K	F	A	P	R	C		
	GT	TCT	GTG	TGC	AAG	GAG	CCT	ATT	ATG	CCA	GCC	CCG	GGC	CAG	GAG	G	720
	S	V	C	K	E	P	I	M	P	A	P	G	Q	E	E		
	AG	ACT	GTC	CGT	ATT	GTG	GCT	TTG	GAT	CGA	GAT	TTC	CAT	GTT	CAC	T	765
	T	V	R	I	V	A	L	D	R	D	F	H	V	H	C		
	GC	TAC	CGA	TGC	GAG	GAT	TGC	GGT	GGT	CTC	CTG	TCT	GAA	GGA	GAT	A	810
	Y	R	C	E	D	C	G	G	L	L	S	E	G	D	N		
	AC	CAA	GGC	TGC	TAC	CCC	TTG	GAT	GGG	CAC	ATC	CTC	TGC	AAG	ACC	T	855
	Q	G	C	Y	P	L	D	G	H	I	L	C	K	T	C		
	GC	AAC	TCT	GCC	CGC	ATC	AGG	GTG	TTG	ACC	GCC	AAG	GCG	AGC	ACT	G	900
	N	S	A	R	I	R	V	L	T	A	K	A	S	T	D		
	AC	CTT	TAG	ATT	CAG	TCA	CCT	GTT	CAG	CCG	GCA	CTG	AGA	AGA	ACG	A	945
	L	*	I	Q	S	P	V	Q	P	A	L	R	R	T	N		
	AC	ACA	AGA	AAA	AGA	TAA	GAA	ATA	CTA	GAG	TAA	AGG	CCA	TCA	AAC	T	990
	T	R	K	R	*	E	I	L	E	*	R	P	S	N	Y		
	AC	GCG	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	GAT	GTC	GAC	GGA	TCC	TT		1033	
	A	K	K	K	K	K	K	K	D	V	D	G	S	:			

4

20.04.98

Obr. 5-1

GEN3 → parciální cDNA sekvence

GTCAC TTTTA TTTGGGGGTG TGGACAGCTG CTTTCCCAGG GGAGTACTTC TTACAGTGGG 60
 ATTTCAAGAC AAGATCGGCC TGAAGAAAAA TTATATTTGT ATATTTTTTA AAAAGTGGGA 120
 ACTTTGAGGC TCAGAGACAG AGCAGAAGAC AGAACCTGGT CTTCTGATTC CCTGTGTTCT 180
 GCTTTTTTCA TTGTTCCACT GGACGCTCAT CAGAGGGAAG ATCTTTTTTC TCAATTGATT 240
 CCAAC^{TIARY}ATG^{TIARY} CTCACCCATC TTGGCTGCCA CCCAAAAGCA CTGGTGAGCC CCTCGGCCAT 300
 GTGCCTGCAC GGATGGAGAC CACCCATTCC TTTGGGAACC CCAGCATTTC AGTGTCTACA 360
 CAACAGCCAC CAAAAAGTT TGGCCCGGTA GTTGCTCCAA AACCTAAGTA CAACCCATAC 420
 AAACAACCTG GAGGTGAGGG TGATTTTCTT CCACCCCCAC CTCCACCTCT AGATGATTCC 480
 AGTGCCCTTC CATCTATCTC TGGAAACTTT CCTCCTCCAC CACCTCTTGA TGAAGAGGCT 540
 TTCAAAGTAC AGGGGAATCC CGGAGGCAAG ACACTTGAGG AGAGGCGCTC CAGCCTGGAC 600
 GCTGAGATTG ACTCCTTGAC CAGCATCTTG GCTGACCTTG AGTGCAGCTC CCCCTATAAG 660
 CCTCGGCCCTC CACAGAGCTC CACTGGTTCA ACAGCCTCTC CTCCAGTTTC GACCCAGTC 720
 ACAGGACACA AGAGAAATGGT CATCCCGAAC CAACCCCTC TAACAGCAAC CACCAAGTCT 780
 ACATTGAAAC CACAGCCTGC ACCCCAGGCT GGACCCATCC CTGTGGCTCC AATCGGAACA 840
 CTCAAACCCC AGCCTCAGCC AGTCCCAGCC TCCTACACCA CGGCCTCCAC TTCTTCAAGG 900
 CCTAUCCTTA ATGTGCAGGT GAAGTCAGCC CAGCCCAGCC CTCATTATAT GGCTGCCCT 960
 TCATCAGGAC AATTTATGG CTCAGGGCCC CAGGGCTATA AACTCAGCC AGTTCCTGTC 1020
 ACTGGGAGT GTCCACCTCC TTCAACACGG GGAGGCATGG ATTATGCTA CATTCCACCA 1080
 CCAGGACTTC AGCCCGAGCC TGGGTATGGG TATGCCCCCA ACCAGGGACG CTATTATGAA 1140
 GGCTACTATG CAGCAGGGCC AGGCTATGGG GGCAGAAATG ACTCTGACCC TACCTATGGT 1200
 CAACAAGGTC ACCCAAATAC CTGGAAACGG GAACCAGGGT AACTCCTCC TGGAGCAGGG 1260
 AACCAAGACC CTCCTGGGAT GTATCCAGTC ACTGGTCCCA AGAAGACCTA TATCACAGAT 1320
 CCTGTTTCAG CCCCCTGTGC GCCACCATG CAGCCAAAGG GTGGCCATTC AGGGCAACTG 1380
 GGGCCTTCGT CAGTTGCCCC TTCATTCCGG CCAGAGGATG AGCTTGAGCA CCTGACCAAA 1440
 AACATGCTGT ATGACATGGA AATCCACCT GCTGACGAAT ACTTTGGCCG CTGTGCTCGC 1500
 TGTGAGAAAA ACGTAGTTGG GGAAGGTACA GGATGCACTG CCATGGATCA GGTCTTCCAC 1560
 GTGGATTGTT TTACCTGCAT CATCTGCAAC AACCAAGCTCC GAGGGCAGCC ATTCTATGCT 1620

16

9/21

20.04.98

Obr. 5-2

GTGGAAGA	AAGCATACTG	CGAGCCCTGC	TACATTAATA	CTCTGGAGCA	GTGCAATGTG	1680
TGTTCCAAGC	CCATCATGGA	GCGGATTCTC	CGAGCCACCG	GGAAGGCCTA	TCATCCTCAC	1740
TGTTTCACCT	CGTGATGTG	CCACCGCAGC	CTGGATGGGA	TCCCATTAC	TGTGGATGCT	1800
GGCGGGCTCA	TTCATGTCAT	TGAGGACTTC	CACAAGAAAT	TTGCCCCGCG	GTGTTCTGTG	1860
TGCAAGGAGC	CTATTATGCC	AGUCCCCGGC	CAGGAGGAGA	CTGTCCGTAT	TGTGGCTTTG	1920
GATCGAGATT	TCCATGTTCA	CTGCTACCGA	TGCGAGGATT	GCGGTGGTCT	CCTGTCTGAA	1980
GGAGATAACC	AAGGCTGCTA	CCCCTTGGAT	GGGCACATCC	TCTGCAAGAC	CTGCAACTCT	2040
GCCCCGATCA	GGGTGTTGAC	CGCCAAGGCG	AGCACTGACC	^{30P} TTTAGATTCA	GTCACTGTG	2100
CAGCCGGCAC	TGAGAAGAAC	GAACACAAGA	AAAAGATAAG	AAATACTAGA	GTAAAGGCCA	2160
TCAAACCTACG	CGATAGTCTC	TGTTCTTCAT	CTGCTATTAA	CCTTGCCCTA	GAAACACATA	2220
AATTATGAGA	TTTTTTTTTA	AAAGTTGTTA	CCAAATACAC	ATTTACATT	GAATCATGTA	2280
GGATCTTGAT	GGCCCTTTGT	TCCCAAGGAC	TTCCACATTT	TTGCACAGAT	TATGCTCCAT	2340
CCCTTCACTT	CTGCATTCC	GTAACTTTTA	ATCCCTATGT	TTGTCTCACT	TTTCATCTGG	2400
TTGAATGGCT	TTTCTTAGTG	TGGTATTTGC	TGTCACATAG	TTTTTTCCTG	GCTGAGTCTG	2460
CCAACCTACA	GGTGCTTTTA	GGCTTGAAAT	UTCCATCCTA	TCATTTCCGT	TTTGCCCTGTG	2520
ACTGTAAAGA	GTAGCCATTC	TTTTCCCATG	TATTGAAGAG	GATATTCTTC	TCTTGCTTTA	2580
TACTACTCAC	GTCCTTGGGG	AGGGAAATGC	ACAATTTTTT	TTTGTTAGGC	TGTAAAGAAT	2640
TTAAGCTGTA	AATTACATAA	GTTAGAACAA	GCCCCAATTT	AATTTGCAAC	CATCAGAATT	2700
CAGAATCTAT	AGTGACCACT	GATCAAGGCT	AATTGGAAAA	GAGTTATCGG	CCCATAGCTA	2760
ATAAGTAGTG	ACAGACAACC	AAGCTTCAAT	ATTTTTCTAA	AGAAATTACA	GCTGGGATAT	2820
GCTAGAAAAG	GCATTTTGGG	GTTATGTTTA	AAAAAACATT	ATTGTCCCACT	AATATTACCT	2880
TAAGATTTTT	CTTTTCCGCA	CTACCTGAAC	ATTGTAATAC	AGACAAACTT	GATTTCTTCT	2940
AGAAGATAAC	ATTTTCAATA	CTGTCCCACT	TCTCATCTTA	AAAATATTGT	CATGTTTATT	3000
CTAATATCCA	ACGCAACTAT	CANAATTGCC	TTTTTCTCTA	GAGGATGAAG	GCTGTGAAAA	3060
AACCGTTCAA	ATTCTCTTCT	TTTTCTTTTT	TATTACCAGG	TCCATTTTGC	CTGACAATTG	3120
CAAATCAGAG	CATACAAAAT	AAAACCTGTC	AGTTTGTGTT	GGTTTACTTT	CAAAAGAGTA	3180
GAAAGCTTGA	AAAGATTCTG	AAACCACAGT	TTCAATTATC	TCATAATCCT	TCTGCAACTG	3240
AAATTACATA	TTGCAGGAGA	CATTTTCATA	TCATCAATGT	GACATTTACA	CCACACTTTC	3300
AAAGACAATC	ACTGAAACAA	AAATTGTCTT	TATGAGCTAA	AAATATGCAG	AATCTCTGCC	3360

14

10/21

20.04.98

Obr. 5-3

TAGAATCTTT	ATTCAAACCTT	TTATTAGCCA	GTGAAACACT	TGCTTGCCAA	CTGCCAAGCC	3420
ATACTTATTA	AGTTCGAACA	TGTTTCACCTT	AAGGAGAGAC	ACCTAGCTTA	GTCATGGCAA	3480
CTTGCCATTT	TGTAAACTAA	GGATTTTGGA	CTGAGATTTT	TTAAATCTTT	CTTCAAATCT	3540
CCCACAAGTA	TATACTTTTA	AATTATGGAG	TATTTTAAGT	CTACAAAAAG	GTATAAATAA	3600
TAATATAATG	AATTCCTATA	TACCTAATAC	CCAGTTTAAG	ACACCAAATA	TAACAAGTAT	3660
AATTACATCC	TCCAATGTAC	CGTTTCCTTA	TTCCACAGAT	ATCTTTTTCA	TTATTGTGAA	3720
GTGATGTTCA	GATTTCTAGT	TTTTTTTTCT	AGTTTTTAAT	TTTAACATCA	GAAGTGAAAT	3780
AAAAAATTAT	GGATACGTGT	TTTGAATTGC	AAACTATTCC	TCAGGAATTC	CAATTAAATT	3840
TATTTTACTT	GAATAGGAAT	GATCATAAAA	GTGATTCCTT	TTTTGTGACT	AGAAATTCCT	3900
AAGCCGATGG	TCACATATAG	TCAATCCTTA	TGTATGGCTC	ATTTGCTTTT	GTCACTAAAC	3960
GGTTTTGTGT	TAGAACCACC	AAATTTATAG	CTTTTAAGAG	CTTCCTTTGA	CCACTGTCTT	4020
TTTCTTACCC	TACTTCTCTT	ATCTTTGATC	GTATATTCTT	CATAATGTGA	AATATGATGA	4080
GATTCACCTA	GGGGCAGCAT	GTTAGTTTTG	GGAGGCAATG	TCAACTGTGT	CTCTGAATTC	4140
CTGTCTTCCA	AATTGAAGCC	AGACCATGCT	GATGACCTCA	AGTAGCACTG	ACTATTTGAC	4200
AATAGGGCTG	ATAATGTAAT	CGGCCTGAAT	TTTGACTTAG	TAACCTTTTA	TGTAATACTT	4260
TGGGAGAAAT	TCTCTTTAGG	ACAAAGCAGA	GACTCCAAAT	TATTGAGGGA	TAGATTGTAT	4320
CTC						4323

64

20.04.98

11/21

Obr. 6

MSHPSWLPPKSTGEPLGHVPARMETTHSFGNPSISVSTQOPPRTAPVVPKPKY
NPKQPGGEGDFLPPPPPLDDSSALPSISGNFPPPPPLDEEAFKVQGNPGGKTL
EERRSSLD AEIDSLTSLADLECSSPYKFRPPQSSSTGSTASPPVSTPVTGHKRMV
IPNQPLTATKKSTLKQPAPQAGPIPVAPIGTLKQPQPVPASYYTASTSSRPT
FNVQVKS AQPSPHYMAAPSSGQIYGSGPQGYNTQPVFVSGQCPPPSTRGGMDYAY
IPPPGLQPEPGYGYAPNQGRYYEGYAAAGPGYGGGRNDSPTYGQOQHPNTWKREP
GYTPPGAGNQNP PGMPVTGPKKTYITDPVSAPCAPPLQPKGGHSGQLGPSSVAP
SERPEDELEHLTKKMLYDMENPPADEYF GRCARCGENVVGEGTGCTAMDQVFHVD
LIM 1
CFTCLICNNKLRGQPFYAVEKKAYCEPCYINTLEQCNVCSKPIMERILRATGKAY
LIM 2
HPHCFTCV MCHRSLDGIPFTVDAGGLIHCIEDFRTKFA PRCSVCKEPIMPAPGOE
LIM 3
ETVRIVALDERDFHVHCYRCEDCGGLLSEGDNOGCYPLDGHILCKTCNSARIRVLT
AKASTDL*

20.04.98

Obr. 7-1

12/21

původní 1119 a 988 c 791 g 1169 t
počet báží

```

1 ettgaattettl ggggcaggaa ctoagaaaaac ttccagcoog pyragogegc gtttgggtgaa
61 agaotoagga gctagoageo cgtocccctc cgaotctccg gtgoogcgcc tgcctgctoo
121 ogooacccca gggggggggg tgoaacccac tnetctgtcc tctgcectgg ctccgtgoco
101 gaoootatcc ogggggagtc looccatcct corllgcttt ccgaactgcc aaggoacttt
241 caatotoaat ctctctcttc lcletctctc tctctctgtc tctctctctc tctctctcto
301 teteluteto gcagggttgg ggggaagagga ggaggaaatc ttcccccgc taaactttca
361 agggaaacaa ttoactocaa gtotcttccc lllccaaagcc gcttoogaag tgetnooggt
421 goooogaaci cclgatooca accogogaga ggagcctctg cgaactocaa cctctcttto
481 etctctccctc gtttccctcc tootcttggc acotccactc ccacggccac ctroootcc
541 ggcaccccaa oacogccgoc gccgcacccg gcagcgctc ctctctctct cctctctcto
601 cctctctctc ttttgggag ccgctggagc tccggtgttg atggtggcag cgggggcagc
661 ctangcaaa gacgcccctg cagcccgcca gctcggctc gccccgcggc cgtocccagc
721 cctatuooot catctecoga aagglgctgg gcagotccgg ggcggtcgag ggaaggggg
781 tgcagggggc glagggggc cgggagggc gatgagggc cggggtgag gggggggc
841 googtoact tonggccagg gaaacccctg cggcccgagc cctcagaga gaggagggc
901 cogooooagg aaycayagc aagaacaaac cggtagagoo tctctnaga gacccaggg
961 aagacccaaa ggaagaaan acaagagloc ctctaaagca gctcaaaa gacagagagc
1021 oactggagaa aaagggocaa gaggcagac laggaaatgg oacacaaag ttttctaga
1081 gaagootgct oagggagaa ctgaagagac atootoacaa gagtctggc agagggacta
1141 gggggggcga cgttggmllt ctacotcagc agcagttgga tcttttga ggaagagca
1201 ctgcagtgac cactlattct gtattggcat ggtctttcoa ctltctctg ggttggggg
1261 ggggtgggtg ggggaggggg ggggtgggtg gggagaaatc acataacott aaaaaggact
1321 atatttaata ootctcttct aateccctca cagtccagc tttagtga aactggtgt
1381 aaacaggggg acaagclta acatgcaac ttttaattac tttttctt tttcttaac
1441 tnotantagt ttgttgaat ctatagcaag agtggggggc tgagaaaaa cgaattgggt
1501 ttagtcaatc aclycaotgc algcaaaaca gaacgtgtc aaactttg cgtcgggoat
1561 tcatatagga agaacggggt gtgttaoact gttaoact oaaataoac coaacccac
1621 tccctgtagt gactccclg lttagaaao caagatag gactagata tactttctct
1681 ttttggata atcttglaya cacttaactg atgattttta actttttat tctaaatgag
1741 acgaantgct gttgtatcct ttcattcagc taacaaacta gaaaaggltt ttttontttt
1801 tcaaaaaggc agtaagcaa auaantattg ocaactcttc tattttgga tatcacat
1861 atcaggggga gtaataaati taotbaagc acttgttttc aggaacaaac ttoattttca
1921 ggaantctac ttcctacaga gcoaaatgc catttagca taataaacac ttgtcaguct
1981 oagagaaatt aaggaancta gaagagtaaa attatcctct ttgttaatta algaanaaggt
2041 auaacagaa atgtcattgat gaactaoct aattatgagg tgggaggag gaactctaaa
2101 tttcttttgg tttatgttola oactaattta aapagcaaaa aaaaaaggc gggggcaato
2161 tctctctgtg tctttctctc tctctctctc tctccctctc tctttctatg tgiatcagtt
2221 tctatgaaag aactgaatac cactlaoutc aattlaagca tatgtgttac ttcagttat
2281 acgttttgac alaaagtgtg tgacnaaggt gcttttcttc qctttagtt caccatctct
2341 tcattoaaac tgcactttta gccagagatg cantatatcc cactactca atactacotc
2401 tgaatgttac aacgaatttc cagtctagta ctattacal gctgctatg acaagcaatg
2461 aaagaaan acttaotggc taggtgattc taatcatotg cgtttcttt tgtacactta
2521 attaaagtta aagaagcaat ctcttactg tgttongca lgaactatga tttttctatg
2581 ltttttaaa taanaatttt taanaactt gtttcagct otctgola tttctacatt
2641 aaultgaaaa ttttttaacc aaytgcctcc taggttctta aggaataatt tectcaatca
2701 cactaoaat caoncaagat ttgactgtaa tatttaata ttacctcca agtctgtacc
2761 toaantgat totttaagga yatggactaa ttgacttga aagacctacc tccagactto
2821 aaaaaggatg aacttgttac ltcagcatt catttgttt ttcantgtt gaatagtto
2881 aaatgagc taaocclagt caaactatt tttgtaaaag acatttga gaaaggaaca
2941 cgttttttaa taacttttga aataagtaa atantaata aataaagcc aacutcaaa
3001 gaacttgaag ctttgtaggt gagatgcac aagccctgt tttgontant gaactcaaaa
3061 atatgtgttt ttaagattag liguatata gaaatgctt gaacatatt lcatgtatt
3121 ttacaaant gtagttttt taalaigtct caacagatt tattttaac coltctatg
3181 ttaggttttt atgcctttot ctctagtga gtgtgctgac tttttaacat gglattatca
3241 actggggcag gaggtagtt ctcalgncgg ctttgtcag tatggcttt agtactgaag
3301 ccaantgaan ctcaaaacca tctctcttcc agctgcttca gggaggtagt ttoaaagggc
3361 aactacctct ctgagaotgg cagatgclo actgttgtga atoaccag gagctatgaa
3421 gagaattaaa actcaaat actgttaot gtggttaaa taagcaata aaoagtggt
3481 aataaanta aaytgcgat tncatattt tggatgggc ttttagaac ctacttggcc
3541 agctoataaa atggaagaa ttgotcatgt tggooaaaca tgggtgocgg agtgaattoo
3601 atctctgta aggttacact tttatttct platgttga caatcaaaac acactacac
3661 ctotaaagtc caagtatacc tcaillitaa taotgaaaaa aanaagctgt ccccaatgga

```

START

STOP

11

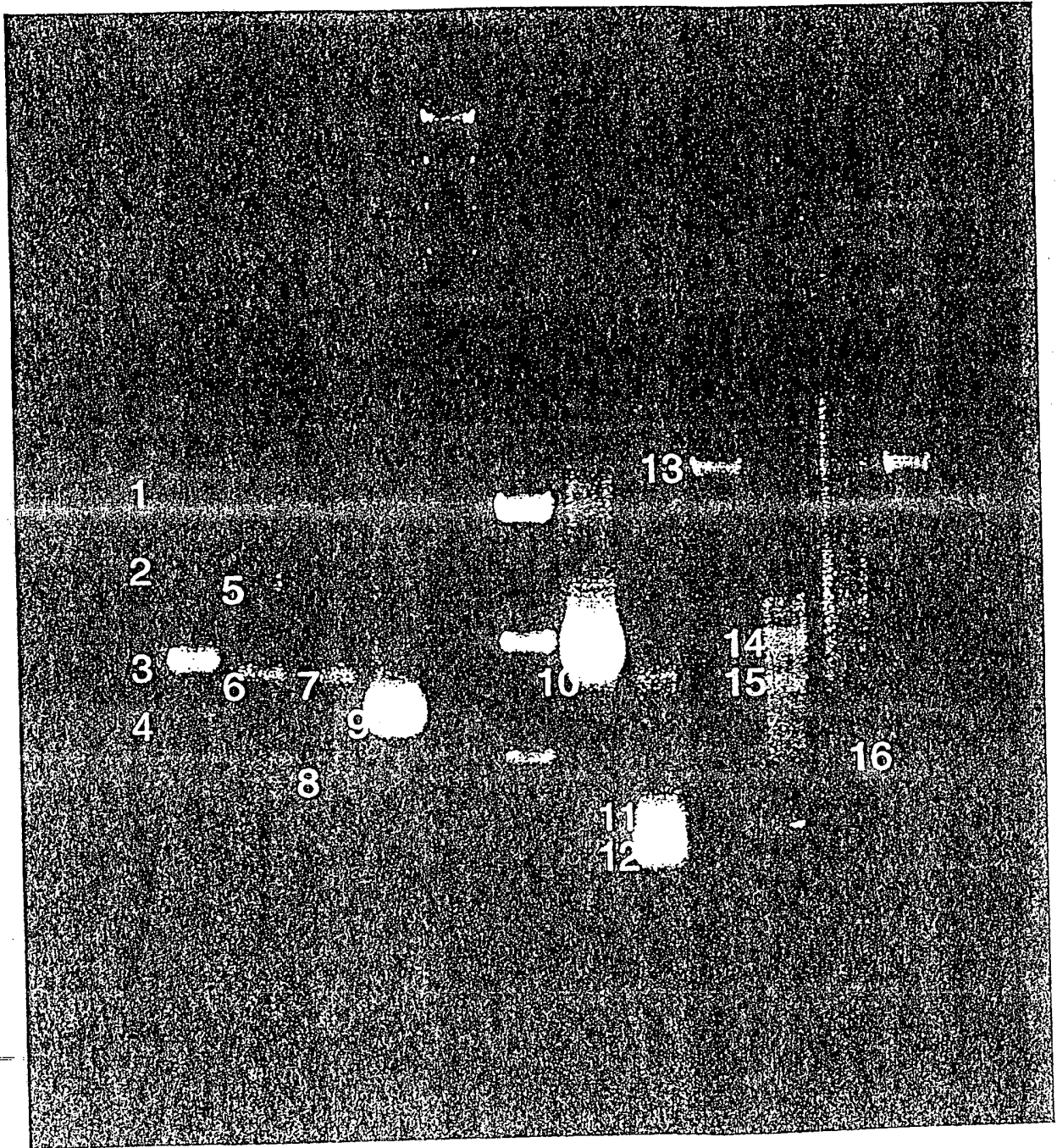
Obr. 7-2

3721 acagtaagaa ualcalaaaa tttttatata tatagtttat ttttgtggga gataantttt
3781 ataggaotgt totttgolg lgttgggtcga agctacataa gactggnoat ttaacttttc
3841 taocatttct gcaagttagy latgtttgca ggagaaaagt atcaagacgt ttaactgcag
3901 ttgaotttct cactgttctt ttgagtgtct tctaaottta ttctttgtto ttatglaga
3961 attgctgtct atgattgtac ttggaatgc ttgcttgttg aaaatatto tctegtgtat
4021 tatcaotgtc tttctgcac aataaacata acagcctctg tgatooo

14

20.04.98

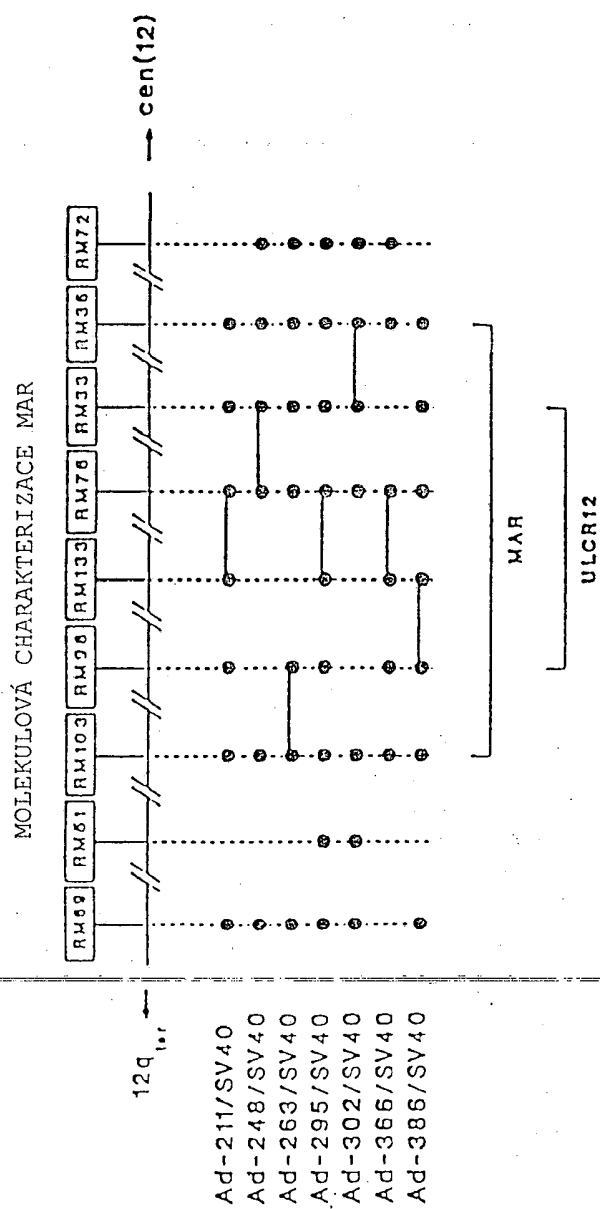
14/21



Obr. 8

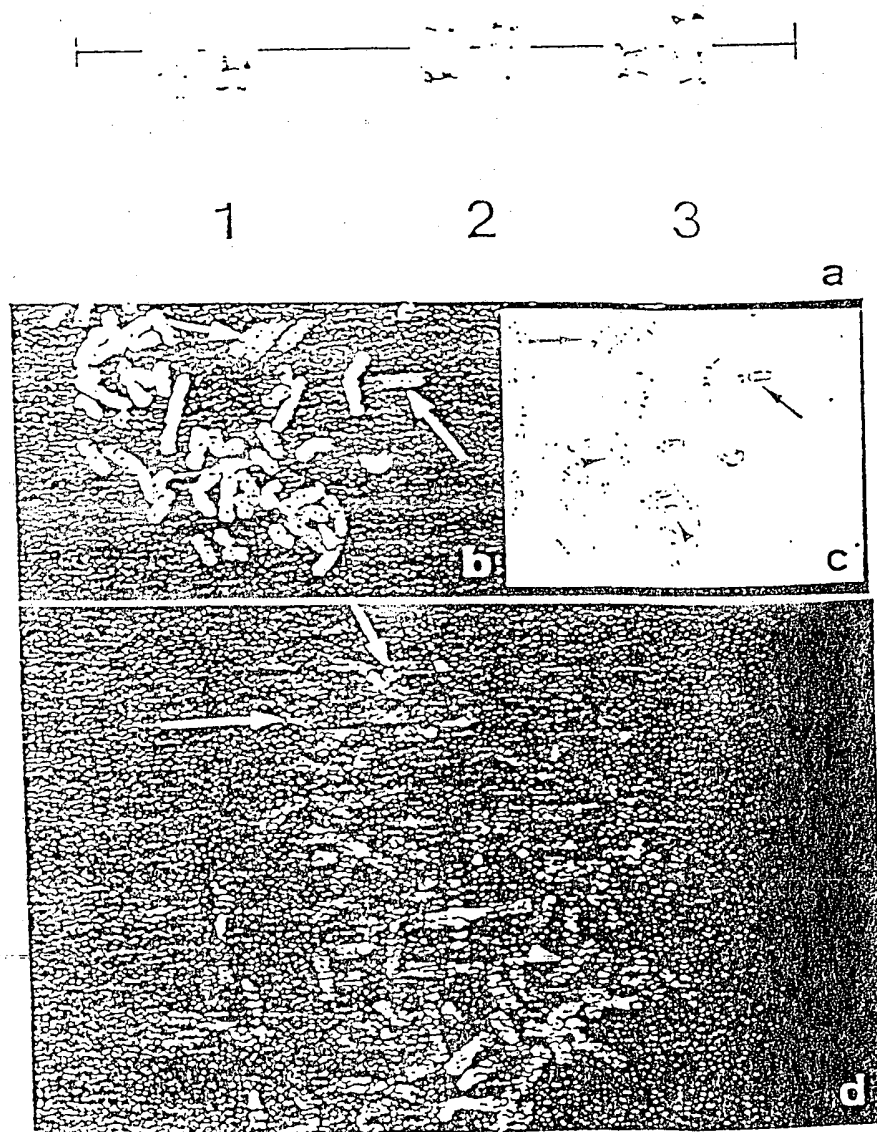
14

Obrázek 1 k dodatku 1



Th

Obrázek 2 k dodatku 1

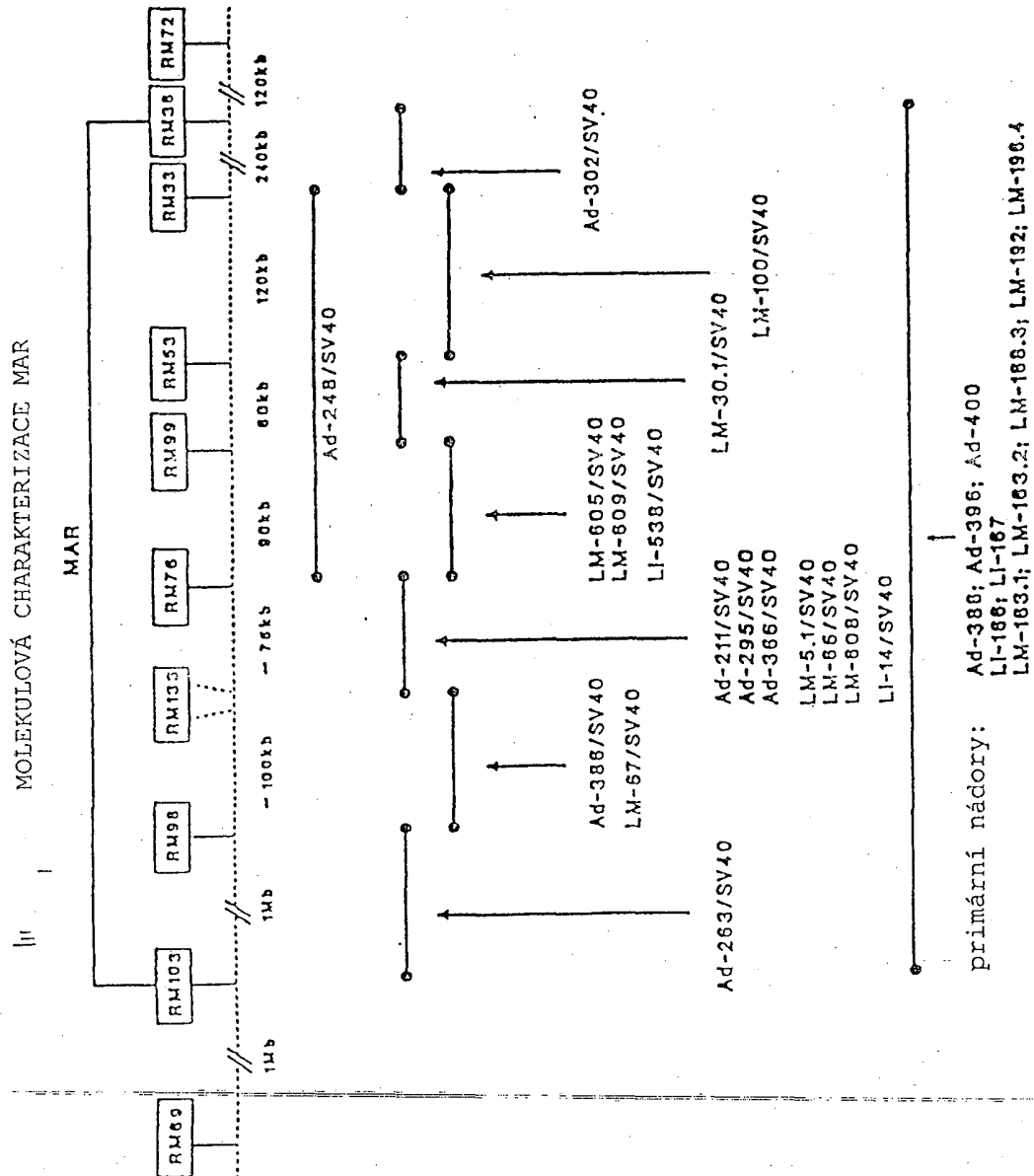


11

20.04.98

17/21

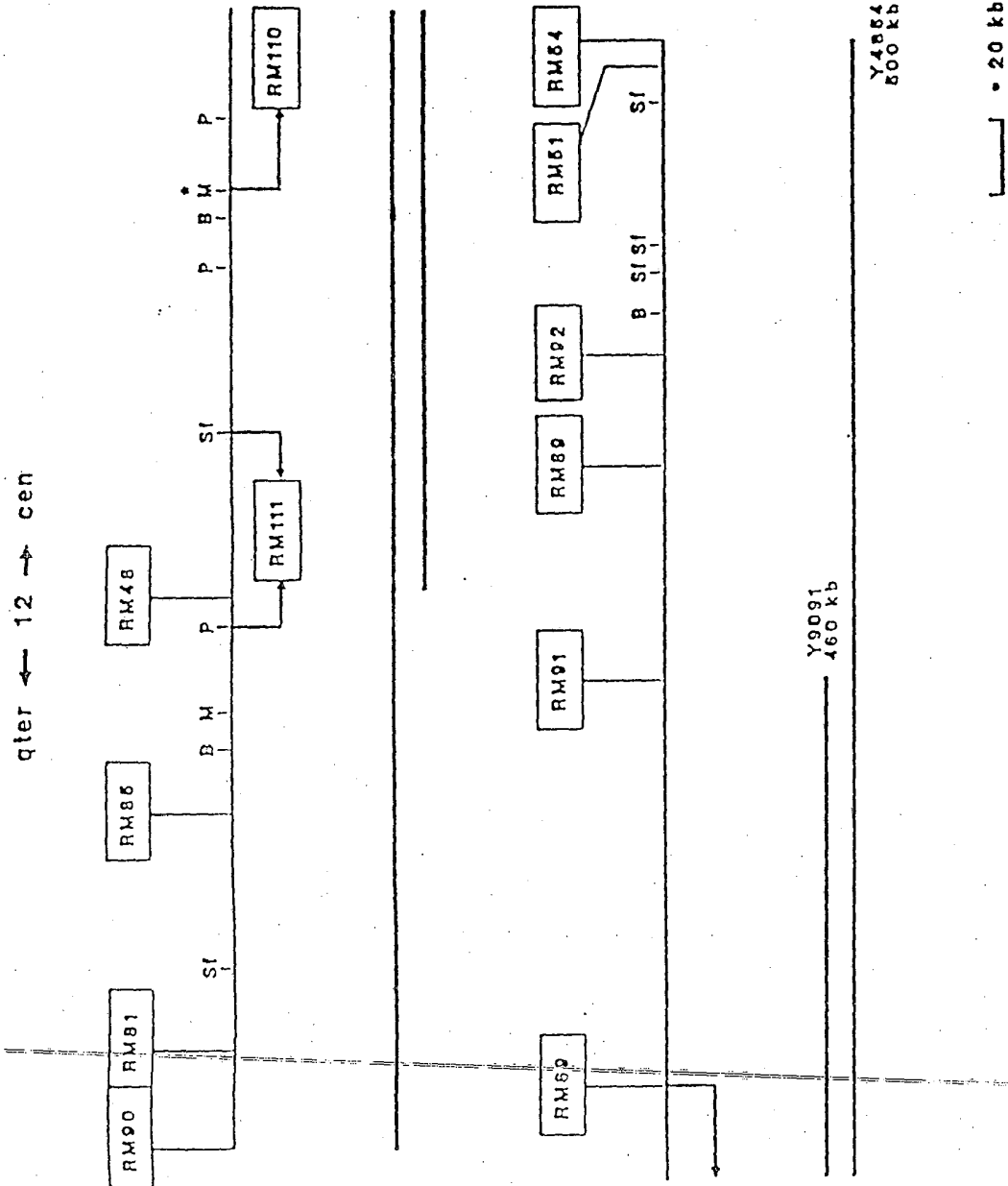
Obrázek 3 k dodatku 1



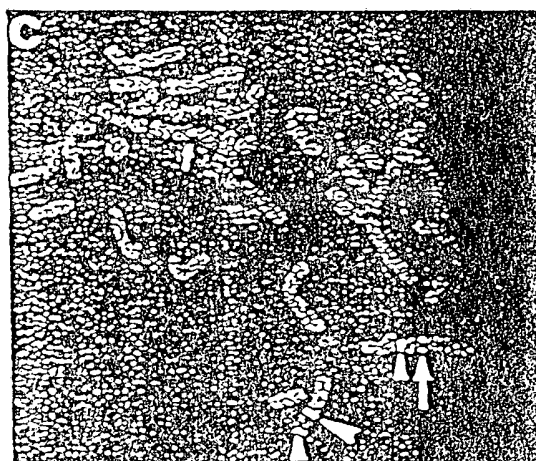
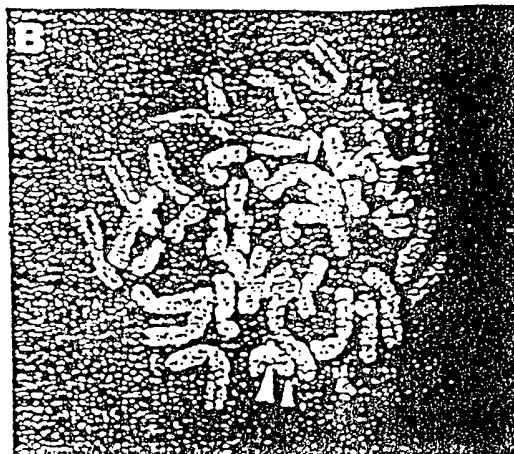
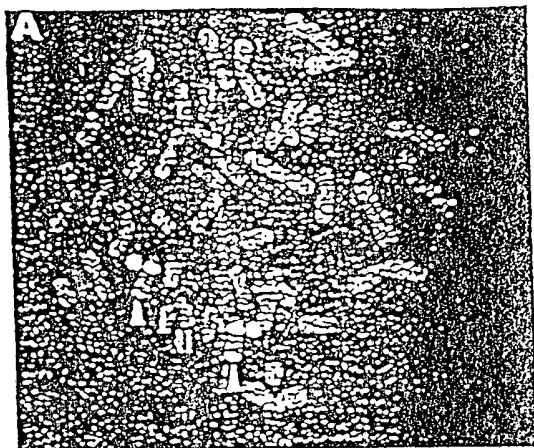
20.04.98

18/21

Obrázek 1 k dodatku 2

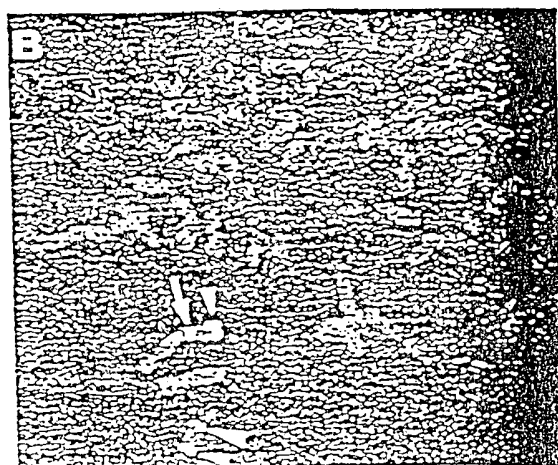
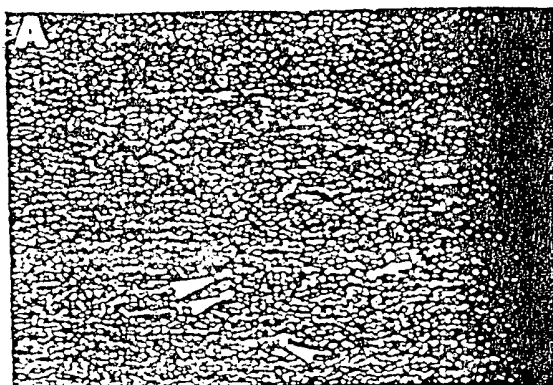


Obrázek 2 k dodatku 2



lk

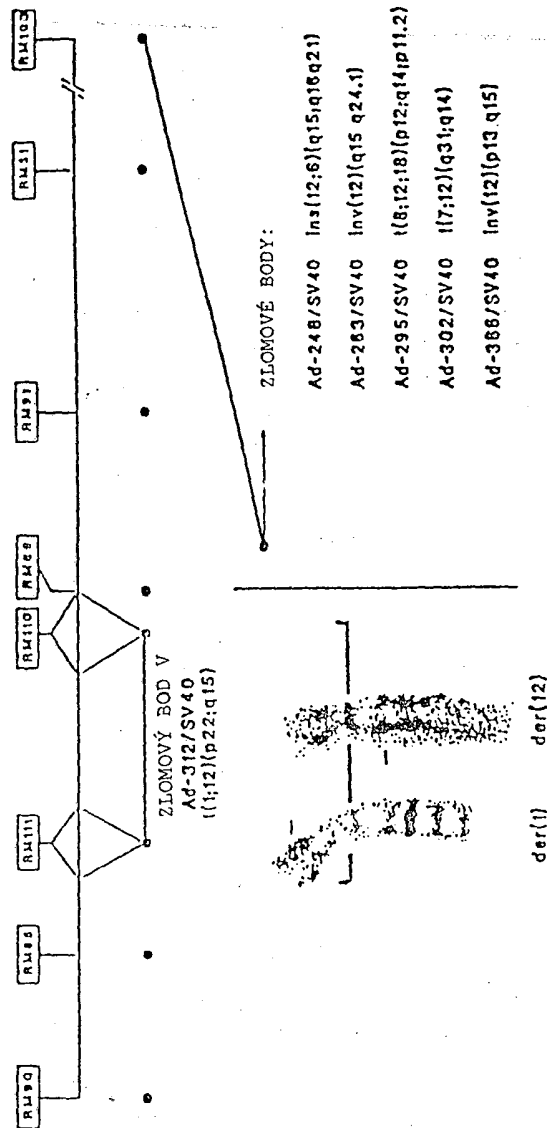
Obrázek 3 k dodatku 2



Ch

20.04.98

Obrázek 4 k dodatku 2



16