

AMANDA GONÇALVES DOS SANTOS SILVA

**INSTABILIDADE GENÔMICA RESULTANTE DE
ALTERAÇÕES TELOMÉRICAS E CENTROMÉRICAS
DEFINE A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA DO MELANOMA EM
UM MODELO MURINO.**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AMANDA GONÇALVES DOS SANTOS SILVA

**Instabilidade genômica resultante de alterações
teloméricas e centroméricas define a evolução cariotípica
do melanoma em um modelo murino.**

Tese preparada durante o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), na Disciplina de Imunologia e apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, como requisito parcial para obtenção do título de *Doutor em Ciências*.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

São Paulo
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Amanda Gonçalves dos Santos

Instabilidade genômica resultante de alterações teloméricas e centroméricas define a evolução cariotípica do melanoma em um modelo murino. Amanda Gonçalves dos Santos Silva – São Paulo, 2009.

XVIII, 384 (f)

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês. Telomere-centromere-driven genomic instability defines karyotype evolution in mouse model of melanoma.

1. Telômero. 2. Centrômero. 3. Instabilidade genômica. 4. Transformação maligna. 5. Melanoma

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA

Chefe de Departamento: Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, em conjunto com o *Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, Winnipeg – Canadá*, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), National Cancer Institute of Canada, The Canadian Cancer Society, CancerCare Manitoa Foundation e The Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training”

Aos meus pais, Reginaldo e
Sonia, pelo amor, exemplo e
apoio. Sem vocês eu não
poderia ter chegado até aqui!

Amo vocês!

Muito Obrigada!

A minha maravilhosa irmã,
Raquel, por estar sempre ao
meu lado! Obrigada.

À doutora Miriam Galvonas
Jasiuliones pela oportunidade
e orientação.

À Dra. Sabine Mai por tudo que
me ensinou, pela grande ajuda,
e por todas as portas que esse
trabalho me abriu.

Obrigada...

Aos Professores Doutores da Disciplina de Imunologia, Mario Mariano, Ieda Maria Longo Maugéri, Célia Regina Whitaker Carneiro e Zulma Peixinho, pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Mariângela Corrêa pelo apoio, críticas e sugestões que foram muito importantes para minha formação.

Aos colegas pós-graduandos da Disciplina de Imunologia pelo carinho, apoio e amizade.

As meninas do laboratório, Adriana Taveira da Cruz, Karina Santiago, Alice S. Moraes, Mariana Toricelli, Camila Souza, Letícia Abigail, Viviane C. Cordaro, Paula Sola, Leandro S. L. Nunes pela agradável convivência, paciência e incentivo constante.

Aos funcionários do Departamento de Imunologia Aparecido Mendes, Geová dos Santos, Zélia Pereira, Creusa Marina, Ivone Mozat Eraldina do Nascimento, Gisélia Lopes e Creuza Rosa pelo auxílio constante.

Aos funcionários do Manitoba Institute of Cell Biology pelo auxílio e eficiência que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

As instituições de fomento no Canadá National Cancer Institute of Canada, The Canadian Cancer Society, CancerCare Manitoba Foundation e The Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training” pelo auxílio financeiro.

As instituições de fomento no Brasil CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

A minha querida amiga Sheila, pela amizade, e por estar sempre disposta a me ensinar e ajudar. Te adoro guria!

A minha amiga Ana Paula Suenaga, pela amizade, ajuda e companhia. Sem você tudo teria sido bem mais difícil.

A amiga de todas as horas, Tatiana Ricca, pela convivência, amizade, pelo carinho, conselhos, discussões e paciência. Tenho muita sorte em ter você do meu lado!

Aos amigos especiais Juliana Cuzzi, Mariana Maschietto, Edaise Silva, Daniel Vidal e Fabiano Ricardo, a faculdade nos uniu e nossa amizade nos mantém assim. Que vocês sempre estejam comigo!

As amigas de uma vida inteira Jamille Biondillo, Daniela Mancuso, Cristiane Beguelo, pela amizade e apoio desde sempre!

Ao querido Gustavo Correa, pela sorte...

Aos mais novos amigos Cris Toré, Clarissa Dias, Edh Tavaréz e Adriana Bertazzo, obrigada pela amizade, pelo carinho, apoio e por tudo o que passamos juntos neste pouco tempo... Agradeço todos os dias por ter vocês comigo!

Aos meus meninos, Leonardo Terra, Santiago Troyano, Kleber Borgui e Eduardo Brandão. Mais do que especiais vocês são essenciais pra mim!!!

Aos amigos "internacionais" Amanda Guffei, Elena Peyst, Alexandre Graves, Landon Wark, Zelda e Daniel Lichtensztejn, David Novak, Sherif Louis, Fabien Kutler, Andrea Caporali, Emilia Wiechec. Obrigada pela ajuda, pela recepção e pelo carinho. Foi um prazer trabalhar com todos vocês!!!!

A minha família chilena/canadense Karina, Jose e Nicole Puelles. Não tenho palavras pra agradecer todo amor que me deram!!!!

Aos amigos Dr. Rubens Bollos e André Bachi, pela ajuda, discussões e apoio.

Aos amigos Flávio Paiva, Whinter Silva, Thiago Silva, Thiago Casemiro, Fernando Aldemundo, Vanessa Tanaka, Carol Duca, Fabio Moskospki, Alex Zago, Sandra Rodackiewicz, Sydney e Luciana Mendes, Guilherme Prando, Eduardo Oliveira, Evandro Guarino, Daniel Kosher, Sueli Chicorsqui, Ricardo Leite, Rodrigo Pasin, Márcio Angelim, Ligia Borin, Bárbara Herdy, Alexandre Harris e Patrícia Silveira. A vida também é feita de diversão, e a minha seria bem menos divertida sem vocês!!!! Obrigada pelos ótimos momentos!!!

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Melanoma.....	1
2. Telômeros.....	5
2.1 Histórico.....	5
2.2 Estrutura do telômero.....	6
2.3 Encurtamento telomérico e a telomerase.....	10
2.4 Telômeros e câncer.....	12
3. Centrômeros.....	16
3.1 Origem e função.....	16
3.2 Estrutura	16
3.3 Evolução centromérica, especiação, anormalidades estruturais e câncer ...	18
3.4 Organização dos centrômeros no núcleo interfásico	19
3.4.1 Ciclo celular	19
3.4.2 Diferenciação celular	20
3.4.3 Transformação maligna	21
5. Instabilidade genética	22
6. Modelo de transformação neoplásica.....	24
OBJETIVOS	27
1. Objetivo geral.....	27
2. Objetivos específicos.....	27
MATERIAL	28
1. Comitê de Ética em Pesquisa.....	28
2. Animais.....	28
3. Anticorpos.....	28
4. Drogas e reagentes.....	29
5. Enzimas.....	30
6. Sondas.....	31
7. Linhagens celulares.....	31
8. Oligonucleotídeos	31
9. Programas	32

MÉTODOS	33
1. Modelo de estudo	33
2. Cultura primária de macrófagos	33
3. Meio de cultura celular.....	33
4. Cultura e manutenção dos estoques celulares	34
5. Tumorigênese <i>in vivo</i>	34
6. Ensaio de metástase experimental	34
7. Ensaio de proliferação celular	35
8. Extração de RNA total.....	35
9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa	37
10. RT-PCR semiquantitativo	38
11. Ensaio da telomerase (TRAP assay)	39
12. Preparação de lâminas para análise de núcleos interfásicos.....	40
13. Preparação de metáfases.....	40
14. Peptide-nuclei-acid (PNA)-FISH em núcleo interfásico.....	41
15. Aquisição de Imagem 3D.....	41
16. Análise das imagens 3D pelo software Teloview.....	42
17. PNA-FISH em metáfases.....	43
18. Spectral Karyotyping Analysis (SKY)	44
19. FISH centromérico em metáfases.....	45
RESULTADOS	48
1. Características do modelo	48
1.1 Morfologia das linhagens ao longo da transformação maligna.....	48
1.2 Análise da proliferação celular <i>in vitro</i> e tumorigenicidade <i>in vivo</i> da linhagem melan-a e suas derivadas.....	51
1.3 Análise da capacidade metastática das linhagens de melanoma obtidas a partir da linhagem melan-a	54
2. Evolução cariotípica no modelo experimental de melanoma.....	56
3. Instabilidade e fragmentação centromérica	66
4. Avaliação do perfil telomérico no modelo de transformação maligna de melanócitos.....	68
4.1 Diminuição no tamanho absoluto e variabilidade do comprimento telomérico ao longo do modelo de transformação de melanócitos.....	68

4.2 Análise da perda completa de seqüências teloméricas.....	71
5. Expressão de c-Myc é desregulada no modelo de melanoma	73
DISCUSSÃO	76
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark	5
Figura 2. A estrutura dos telômeros humanos.....	9
Figura 3. O complexo shelterin.....	10
Figura 4. Ciclos de quebra/ fusão/ ponte.....	16
Figura 5. Modelo de transformação maligna de melanócitos associado à resistência ao <i>anoikis</i>	27
Figura 6. Morfologia dos melanócitos melan-a e das linhagens obtidas após ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem.....	50
Figura 7. Proliferação celular <i>in vitro</i>	53
Figura 8: Tumorigenicidade <i>in vivo</i> das linhagens derivadas de células melan-a. ..	54
Figura 9. Ensaio de metástase experimental.....	56
Figura 10. Evolução cariotípica	59
Figura 11. Rearranjos cromossômicos.....	63
Figura 12. Fragmentação centromérica.....	68
Figura 13. Encurtamento telomérico na presença de telomerase.....	71
Figura 14. Translocações Robertsonianas e outras anormalidades centroméricas.....	73
Figura 15. Imunofluorescência indireta usando um anticorpo específico contra c-Myc.....	75
Figura 16. Mapa de ortologia do genoma: genoma humano sob o genoma de camundongo	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seqüências dos iniciadores	32
Tabela 2 – Sumário dos rearranjos encontrados no modelo de melanoma	64
Tabela 3 – Aumento no número individual de cromossomos no modelo de melanoma	65
Tabela 4 – Resumo dos cromossomos envolvidos na formação das translocações Robertsonianas nas linhagens metastáticas do modelo de melanoma.	66
Tabela 5 – Alterações estruturais freqüentes em melanomas humanos	83

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
1C	linhagem obtida após submeter células melan-a a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
2C	linhagem obtida após submeter células 1C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
3C	linhagem obtida após submeter células 2C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C	linhagem obtida após submeter células 3C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3-, 4C11-, Tm1 e Tm5	diferentes linhagens de melanoma obtidas a partir da diluição limitante de esferóides formados após submeter a linhagem 4C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3+ e 4C11+	diferentes linhagens de melanoma obtidas espontaneamente em cultura a partir das linhagens 4C3- e 4C11-, respectivamente.
ACAS	Anticorpos contra seqüência centromérica
ALT	do inglês <i>Alternative Length of Telomeres</i>
BFB	ciclos de quebra/fusão/ponte ou <i>breakage/fusion/bridge</i>
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CIN	Instabilidade cromossômica
CT	Território cromossômico
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól

EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
Fus	Fusão
ICF	Síndrome de imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	quilo base
mg	miligrama
MIN	Instabilidade de microssatélite
mL	mililitro
mM	milimolar
nM	nanomolar
pb	pares de base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Éster de forbol-miristato
PNA	do inglês <i>Peptide Nucleic Acid</i>
Q-FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente quantitativa
RGP	melanoma primário de fase de crescimento radial
RNA	ácido ribonucléico
Rob	Translocação Robertsoniana
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SKY	Cariótipo espectral

T	Translocação
UV-A	Raios ultravioleta A
UV-B	Raios ultravioleta B
VGP	melanoma primário de fase de crescimento vertical

Resumo

Aneuploidia e instabilidade cromossômica são características da maioria dos tumores sólidos. Estas alterações podem resultar da segregação inapropriada dos cromossomos durante a divisões celulares, que pode ocorrer por diversos mecanismos incluindo defeitos teloméricos, amplificação centrossômica, centrômeros não funcionais e/ou defeitos no controle dos *checkpoints* do processo de divisão. Neste trabalho, foi utilizado um modelo *in vitro* de melanoma murino, cujo fator transformante foi o bloqueio de adesão celular ao substrato, para caracterizar alterações teloméricas e centroméricas que acompanham a transformação maligna dos melanócitos. Para estudar o tempo de ocorrência do encurtamento telomérico durante a transformação maligna, o perfil do comprimento telomérico foi analisado por Q-FISH e observamos que o tamanho dos telômeros diminui gradativamente ao longo da transformação maligna. Paralelamente, foi também encontrado um aumento no número de cromossomos sem telômeros e na complexidade do cariótipo, o que incluiu o aparecimento de fusões Robertsonianas em 100% das metáfases analisadas nas células metastáticas. Estes achados estão em concordância com estudos que mostram que anormalidades no comprimento dos telômeros parecem ser uma das alterações genéticas mais precocemente adquiridas no processo de transformação maligna e que anormalidades teloméricas resultam em agregação telomérica, ciclos de quebra, ponte e fusão e instabilidade cromossômica. Outra característica importante do modelo é a grande instabilidade centromérica manifestada pela presença abundante de fragmentos centroméricos e fusões de centrômeros. Juntos, estes resultados ilustram, para este modelo de melanoma, instabilidade cromossômica com uma assinatura estrutural de quebras centroméricas e perda telomérica.

Introdução

1. Melanoma

Em 2005, o câncer foi responsável por 13% das mortes ocorridas no mundo, sendo que mais de 70% destas ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). No ano passado, foram estimados 59.940 novos casos de melanoma nos Estados Unidos, com uma expectativa de 8.110 mortes (American Cancer Society, 2007). As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2008, apontavam os tumores de pele como o tipo de câncer mais incidente na população brasileira com 120.930 casos novos, dos quais 4,9% seriam de melanoma (INCA, 2007). Mesmo sendo o tipo de câncer de pele mais raro, o melanoma é responsável pela maioria das mortes (aproximadamente 80%) relacionadas ao câncer de pele (Medic e col., 2007; Lewis e col., 2005), visto que apenas 14% dos pacientes com melanoma metastático apresentam sobrevida livre de doença em cinco anos (American Cancer Society, 2003).

Apesar da maioria dos melanomas diagnosticados em estágios precoces ser curável cirurgicamente, um número pequeno de pacientes diagnosticados em estágios avançados sobrevive, mesmo após intervenções terapêuticas agressivas (Miller & Mihm, 2006; Wascher e col., 2003). No entanto nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56% (www.inca.gov.br).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são histórico familiar, múltiplos nevos (benignos ou atípicos) e ocorrência prévia de melanoma. Fatores de risco adicionais incluem sensibilidade ao sol, exposição solar excessiva e doenças imunossupressoras (Miller & Mihm, 2006). Além disso, o melanoma é predominantemente uma doença de populações de pele clara, sendo sua incidência 5 a 20 vezes menor nas populações de pele escura. Esta sensibilidade diferencial associada à cor da pele, ou mais propriamente a reação da pele à exposição intermitente a radiações do tipo UV-A e UV-B, é um dos melhores exemplos da interação entre fatores físicos e genéticos no desenvolvimento dos tumores (Gilchrest e col., 1999).

Melanomas são neoplasias malignas de melanócitos. Os melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, região bulbar dos folículos pilosos, coróide e leptomeninges. Os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, são de origem neuroectodérmica, e migram da crista neural para a epiderme onde se diferenciam em melanócitos. Na epiderme, os melanócitos interagem especificamente com queratinócitos, definindo as unidades de pigmentação da epiderme (Schopfer *et al.*, 2007; Hsu e col., 2002; Bennett, 1993).

Baseado em características clínicas e histopatológicas foram propostas cinco fases da progressão do melanoma (Meier, 1998; Clark e col., 1984): *clusters* de melanócitos normais (nevo comum), nevo displásico, melanoma primário de fase de crescimento radial (RGP), melanoma primário de crescimento vertical (VGP) e melanoma metastático (**FIGURA 1**).

No nevo comum, há acúmulo de melanócitos na camada basal da epiderme, encontrando-se agregados de células névicas na junção dermoepidérmica. No nevo displásico, atipias na arquitetura dos nevos são observadas, incluindo traves de melanócitos presentes na derme e presença de melanócitos na camada suprabasal da epiderme. Melanomas de fase de crescimento radial caracterizam-se pela progressiva proliferação de células de melanoma predominantemente na epiderme, sendo possível a presença de células de melanoma na derme, porém estas não proliferam. Melanomas de fase de crescimento vertical caracterizam-se pela proliferação de células de melanoma na derme, extensa degradação da matriz extracelular e indução sustentada de angiogênese. O processo de angiogênese ocupa uma posição central na progressão de melanomas VGP para o melanoma metastático. Os vasos formados servem tanto para a nutrição do tumor como para o escape de células tumorais para a circulação linfática e sanguínea, dando origem a metástases (revisto em Chammas, 2004).

Alterações genéticas foram correlacionadas diretamente com o desenvolvimento do melanoma. Estas mutações são relacionadas a três categorias de genes: proto-oncogenes, genes supressores de tumor ou genes de reparo a danos de DNA (Benjamin *et al.*, 2006; Kastan e Bartek, 2004).

Em nível molecular, a progressão de um melanócito para um melanoma é acompanhada pela aquisição gradual de múltiplas alterações genéticas (Hussein, 2007) e epigenéticas (Howell *et al.*, 2009; Rothhammer & Bosserhoff, 2007) que levam a perda de genes supressores tumorais e aumentam a mutabilidade do tumor (Hussein,

2004). Os melanomas malignos apresentam os dois tipos de instabilidade genética encontrados em neoplasias; instabilidade cromossômica (CIN) e instabilidade de microssatélite (MIN) (Hussein, 2007; Hussein e col., 2004; Lengauer e col., 1998). No entanto, MIN é encontrada em níveis baixos no melanoma cutâneo (Palmieri e col., 2003; Hussein e col., 2002), enquanto CIN tem sido encontrado em praticamente todos os casos de melanoma analisados (Hussein e col., 2004; Höglund e col., 2004; Schulten e col., 2002).

Embora haja na literatura inúmeros trabalhos com diferentes modelos (tecidos, linhagens celulares e anticorpos) indicando mudanças em várias moléculas envolvidas na gênese do melanoma, as alterações responsáveis pelo desenvolvimento e a progressão do melanoma ainda não são totalmente conhecidas.

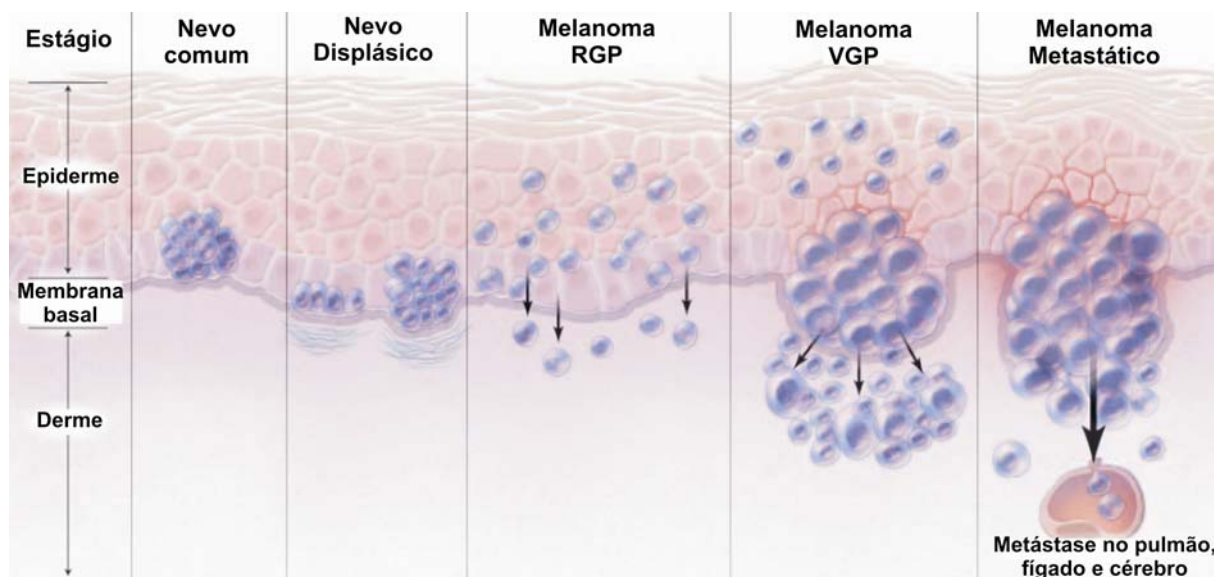


FIGURA 1. Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark. Os melanomas são classificados histologicamente de acordo com sua localização e estágio da progressão. Cinco estágios foram propostos na evolução do melanoma com base nesses critérios histológicos: nevo adquirido e congênito comum; nevo displásico com estrutura e arquitetura atípicas; melanoma primário de fase de crescimento radial (RGP), melanoma primário de crescimento vertical (VGP), e melanoma metastático (Clark e col., 1984). Figura modificada de Miller & Mihm, 2006.

2. Telômeros

2.1 Histórico

A presença de estruturas especializadas no final dos cromossomos foi descrita por Hermann J. Muller em 1938. Em seus estudos com drosófilas, ele notou que moscas, quando irradiadas, apresentavam cromossomos com muitos tipos de quebras, trocas e fusões, mas nunca simples deleções terminais. Ele concluiu que as porções finais dos cromossomos deveriam ser protegidas por estruturas especializadas e notou também que estas regiões tinham características de heterocromatina. Muller inicialmente chamou estas estruturas de proteção de “gene terminal” e mais tarde de “telômeros” (revisto em Chuaire, 2006).

Dois anos depois, Barbara McClintock relatou que, em milho, os finais dos cromossomos quebrados tendiam a se fundir, formando cromossomos dicêntricos. Estes cromossomos formados se quebrariam novamente à medida que os dois centrômeros tentassem migrar durante a anáfase. De acordo com suas conclusões, os telômeros tinham papel crucial na integridade cromossômica, uma vez que eles previniam estes ciclos de quebra-fusão e ponte, prejudiciais à integridade celular (revisto em Madame Curie Bioscience Database, 2009).

Contudo, os estudos sobre telômeros só voltaram a ter importância 30 anos depois com a descoberta dos mecanismos de replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Nesta época, James Watson identificou que o problema da replicação terminal cromossômica consistia na incapacidade da DNA polimerase em replicar o final 3' da fita de DNA e com isso os cromossomos eram encurtados a cada divisão celular. Além disso, ele postulou que deveria existir um mecanismo de proteção pelo qual o encurtamento cromossômico seria prevenido, mas este mecanismo não seria descoberto antes de 1978 (revisto em Chuaire, 2006).

Até 1960, acreditava-se que as células eram capazes de proliferar indefinidamente. No entanto, em 1961, Leonard Hayflick demonstrou que fibroblatos humanos possuíam potencial proliferativo limitado (entre 40 a 50 divisões) e que após este período eles entravam em senescência. Com base neste e em outros estudos, conclui-se que a célula possuía um mecanismo de controle interno, capaz de estabelecer o número total de divisões celulares durante sua existência - limite de

Hayflick (Stewart & Weinberg, 2006). Atualmente é sabido que um dos determinantes do número de divisões celulares é o comprimento telomérico e que as células, ao atingirem seu limite, ativam mecanismos de parada de crescimento celular, que são irreversíveis (Katakur, 2006).

Finalmente em 1978, Elizabeth Blackburn descreveu os finais cromossômicos, ou telômeros, como sendo composto de seqüências repetitivas simples de DNA (revisto em Blackburn, 1992). Logo se tornou aparente que esta seqüência era conservada através da evolução e que um mecanismo comum deveria existir entre os eucariotos para que houvesse a manutenção dos telômeros. Em 1984, Greider e Blackburn, identificaram uma enzima, a telomerase, que adicionava repetições teloméricas nos finais dos cromossomos. Elas sugeriram que a telomerase poderia compensar a replicação incompleta dos terminais cromossômicos. Isto explicaria a manutenção do comprimento telomérico observado em organismos como o protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* e leveduras (revisto em Greider, 1996).

2.2 Estrutura do telômero

Os telômeros, do grego *telos* (finais) e *meros* (partes), são estruturas nucleoprotéicas especializadas, localizadas nos finais dos cromossomos e que tem como função principal proteger estas regiões de recombinação e degradação. A presença dos telômeros confere às células a capacidade de diferenciar quebras randômicas na dupla fita de finais naturais dos cromossomos, e impede também que genes importantes localizados em regiões próximas a eles sejam perdidos por degradação (Bailey & Murnane, 2006; McClintock, 1941).

O telômero da maioria dos eucariotos consiste em repetições curtas ricas em citosina (C) na fita 5', referida como fita C. A fita complementar é rica em guanina (G) e é denominada fita G. A fita G corre na direção 5'-3' do cromossomo e é mais longa que a fita C devido à presença de uma "cauda" que em mamíferos consiste de 50 a 500 nucleotídeos (Palm & de Lange, 2008) (**FIGURA 2**).

A primeira seqüência de DNA telomérico foi descrita no protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* em 1978, composto por repetições TTGGGG (Blackburn & Gall, 1978). Na maioria dos insetos, a região telomérica tem seqüência TTAGG e na maior parte das plantas, a seqüência TTTAGGG (Monaghan & Hausmann, 2006). O

número de nucleotídeos destas seqüências varia entre as espécies, porém na maioria dos organismos estudados, as seqüências teloméricas consistem de 5 a 8 pares de bases. Em humanos e em camundongos, a região telomérica possui seqüências repetidas e não codificadoras de hexanucleotídeos TTAGGG, e variam entre 10-15kb em humanos e 25-40kb em camundongos (Blasco, 2005; Griffith e col., 1999).

Análises por microscopia eletrônica mostraram que o DNA telomérico humano e murino formam uma estrutura altamente organizada, na qual a extremidade 3' da cauda G se insere nas regiões teloméricas de dupla fita, formando uma "alça" conhecida como *T-loop* (Griffith e col., 1999). Esta estrutura de alça é estabilizada pela ligação dos telômeros às proteínas TRF1, TRF2 e POT1. Esta forma estrutural permite que os telômeros sejam reconhecidos como as porções finais cromossômicas e não como quebras, impedindo assim que sejam processados pela maquinaria de dano do DNA (HeRobig & Sedivi, 2006). A cauda G ainda serve como substrato, no qual a telomerase adiciona repetições teloméricas, fornecendo um molde para a síntese de DNA da fita descontínua (*lagging*) (Hultdin, 2003).

Em mamíferos, as proteínas TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1 formam o complexo *shelterin*, componente constitucional do telômero (de Lange, 2005) (**FIGURA 3**). As proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se às repetições teloméricas de fita dupla formando homodímeros, enquanto que a POT1 liga-se às repetições TTAGGG da fita simples. Além disso, TRF1 e TRF2 recrutam outros quatro componentes do *shelterin* para os telômeros, TIN2, RAP1, TPP1 e Rap1 (Palm & de Lange, 2008).

O complexo *shelterin* também está envolvido no controle do comprimento telomérico. A inibição de TRF1 (van Steensel & de Lange, 1997), redução dos níveis de TIN2 (Kim e col., 1999) e RAP1 (Li & de Lange, 2003) e supressão de POT1 (Liu e col., 2004) promovem alongamento do telômero, enquanto a expressão aumentada de TRF1 e TRF2 (Houghtaling e col., 2004; Smogorzewska e col., 2000) causa o encurtamento do mesmo, sem afetar a atividade da telomerase *in vitro*. Este complexo pode também inibir a ação da telomerase pela formação do *T-loop*, impedindo assim o acesso desta enzima à fita simples telomérica (Hug & Ligner, 2006). Além disso, as proteínas associadas aos telômeros exercem funções de reparo de DNA, essenciais para a manutenção do mesmo (Stewart & Weinberg, 2006).

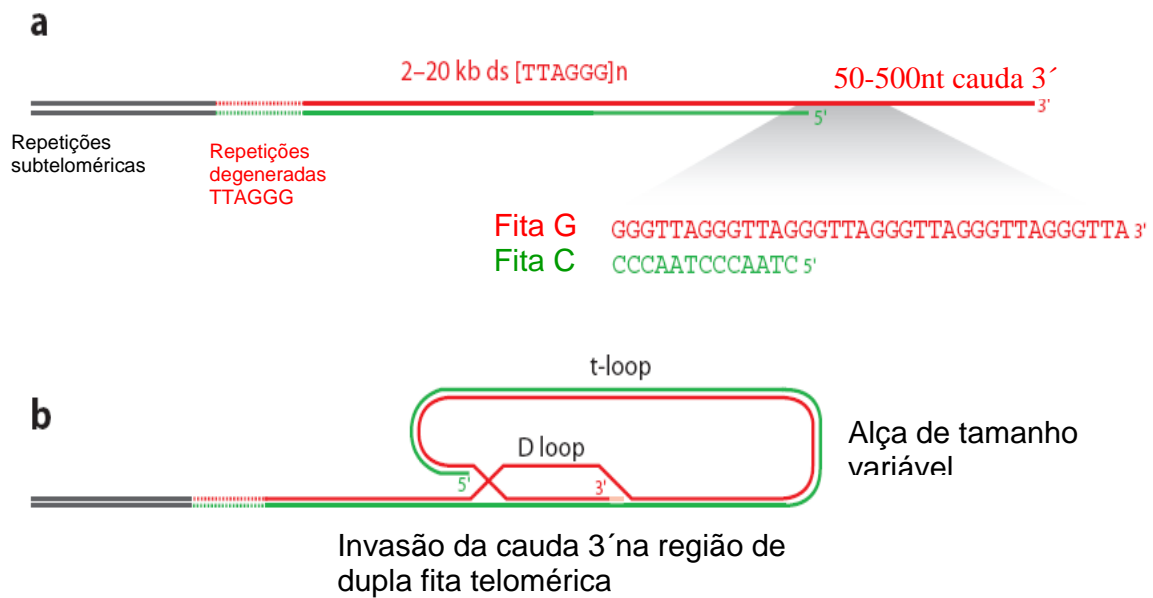


FIGURA 2 – A estrutura dos telômeros humanos. (a) Sequência terminal dos cromossomos humanos composta por repetições em tandem dos nucleotídeos TTAGGG. Próximo às repetições teloméricas localiza-se um segmento de repetições degeneradas e repetições subteloméricas. A fita 3' do terminal telomérico apresenta uma extensão que varia entre 50-500 nucleotídeos e é rica em guanina (G), enquanto a fita 5' termina sempre com a sequência de nucleotídeos ATC. (b) Representação esquemática da estrutura t-loop. O tamanho da estrutura é variável. Extraído de Palm & de Lange, 2008.

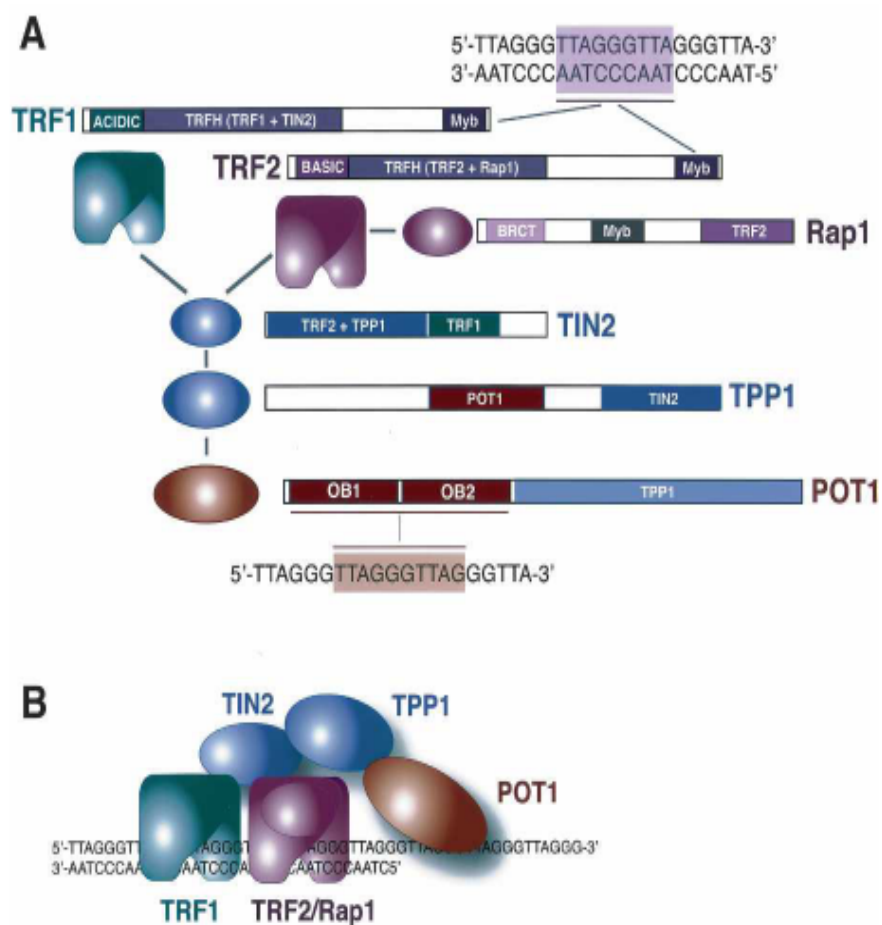


FIGURA 3 – Complexo *Shelterin*. (A) As seis subunidades do complexo *shelterin*, seus domínios estruturais, interações protéicas, e sítios de ligação ao DNA. (B) Esquema da interação do *shelterin* com o DNA telomérico. Adaptado de de Lange, 2005.

2.3 Encurtamento telomérico e a telomerase

Os telômeros diminuem gradualmente a cada divisão celular como resultado da incompleta replicação da fita *lagging* do DNA. Cada divisão celular resulta em uma perda de 50 a 200 nucleotídeos da região telomérica, de forma que o tamanho do telômero reflete a história proliferativa celular, funcionando como um “relógio mitótico” em direção a senescência (Engelhardt & Finke, 2001; Parris e col, 1999; Allsop e col, 1995).

Em diferentes espécies, o comprimento telomérico varia entre cromossomos, tecidos, indivíduos e idade. Nos vertebrados, o comprimento telomérico é similar nas células da maioria dos tecidos, mas, após o nascimento, os telômeros encurtam progressivamente nas células somáticas proliferativas. Alguns tecidos, como a mucosa intestinal e as células do sangue que tem rápida renovação e requerem elevadas taxas de proliferação celular, apresentam maior encurtamento dos telômeros. Por outro lado, tecidos com baixa taxa de proliferação, como músculo e cérebro, têm comprimento telomérico bastante estável (Monaghan & Hausmann, 2006).

Quando os cromossomos atingem um comprimento telomérico crítico, a estrutura protetora (T-loop) se perde, desencadeando o recrutamento de sensores de danos ao DNA (Herbig & Sedivy, 2006). Conseqüentemente, há ativação e estabilização de *TP53*, favorecendo a transcrição de genes como o *TP21* (Lou & Chen, 2006). Este gene inibe a atividade de quinases dependentes de ciclina, que deveriam fosforilar e conseqüentemente ativar o oncogene *RB*, resultando na ativação do mecanismo antiproliferativo denominado “estágio 1 de mortalidade” (M1). Apesar das células neste estágio permanecerem metabolicamente ativas, não progridem no ciclo celular (der-Sarkissian e col., 2004; Hathcock e col., 2003). O estágio M1 previne a propagação de erros e, por conseqüência, o desenvolvimento tumoral (Stewart & Weinberg, 2006).

Entretanto, se os genes de resposta a dano de DNA, como *TP53* e/ou *TP21*, estiveram inativos, haverá escape em direção à persistência da proliferação, além da senescência (estágio M1) (Lou & Chen, 2006; der-Sarkissian e col., 2004; Baerlocher & Lansdorp, 2003). As células continuam se dividindo e encurtando seus telômeros até que um segundo bloqueio denominado “crise” ou “estágio 2 de mortalidade” (M2) seja alcançado (shay & Wright, 2005). O estágio de crise é caracterizado por telômeros

curtos, fusões terminais, pontes de anáfase e morte celular programada (apoptose) (Stewart & Weinberg, 2006; Londoño-Vallejo, 2004).

Os telômeros também podem se tornar menores como resultado de danos oxidativos (Lotze e col, 1995) e podem ser controlados por modificações epigenéticas da cromatina telomérica. Telômeros de mamíferos apresentam modificações de histonas características de heterocromatina constitutiva, tais como di e trimetilação de H3K9 e trimetilação de H4K20, entre outras (Gonzalo e col, 2006). Estas modificações foram reconhecidas como reguladores negativos do tamanho dos telômeros (Garcia Cao e col, 2004).

O encurtamento dos telômeros tem sido considerado o “relógio mitótico” (Blasco, 2005; Parris e col, 1999; Harley, 1991) por limitar o número de vezes em que uma célula se divide, contribuindo para o fenótipo de envelhecimento, mas também promovendo um efetivo mecanismo supressor tumoral (Shay & Wright, 2006; Bailey & Murnane, 2006; Pedram e col, 2006).

Com o encurtamento gradual dos telômeros para que a divisão celular continue ocorrendo, as seqüências teloméricas perdidas devem ser repostas. A adição de novas repetições teloméricas é realizada basicamente por dois mecanismos, o mais comum depende da síntese de novas seqüências teloméricas pela ação de uma transcriptase reversa - telomerase. A outra decorre de eventos de recombinação telomérica denominados *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT) (Damle e col., 2004; Villa e col., 2004). O ALT não é um mecanismo fisiológico e foi observado em tumores humanos, como carcinomas, osteosarcomas entre outros. Acredita-se que este mecanismo auxilia a telomerase na manutenção telomérica. Entretanto, nem todas as células que perdem a expressão da telomerase apresentam ALT (Fleisig & Wong, 2006).

A telomerase é uma transcriptase reversa, codificada pelo gene *TERT*, que reconhece especificamente o grupamento OH do carbono 3 da pentose do final da alça telomérica e, usando um molde de RNA codificado pelo gene *TERC*, alonga os telômeros (Blasco, 2005; Blackburn, 2001). A telomerase é expressa em células embrionárias, imortalizadas e tumorais, no entanto em células somáticas normais não há detecção desta enzima, com exceção de células proliferativas de tecidos em regeneração. Com isso, a manutenção do comprimento dos telômeros nas células somáticas é comprometida e resulta em um encurtamento gradual que pode levar a uma parada no ciclo celular (senescência) ou à crise e a apoptose.

2.4 Telômeros e câncer

Defeitos na funcionalidade dos telômeros são associados à diversas doenças como síndromes de envelhecimento prematuro e câncer (Blasco, 2005). Os telômeros podem se tornar não funcionais à medida que seu encurtamento se torna crítico e, como demonstrado há mais de 50 anos, a perda de funcionalidade telomérica pode ser o principal mecanismo envolvido na geração de anormalidades cromossômicas (Meeker e col, 2004; McClintock, 1941).

Muitos genes estão envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica, contudo defeitos em tais genes têm sido relacionados somente a um pequeno número de neoplasias humanas e, nestes casos, resultam principalmente em alterações numéricas e não em cariótipos complexos como os encontrados na maioria dos tumores. Então, os mecanismos moleculares que levam à instabilidade cromossômica em câncer permanecem um mistério, assim como o exato momento em que a instabilidade cromossômica acontece no processo tumorigênico (Meeker e col, 2004).

A instabilidade cromossômica resultante da não funcionalidade telomérica pode ocorrer através de ciclos de quebra/fusão/ponte (breakage/fusion/bridge – BFB), exemplificados na figura 4 (McClintock, 1941). Estes ciclos são iniciados quando um cromossomo sem telômero ou com telômero não funcional sofre replicação. Neste caso, as porções finais das cromátides irmãs se fundem e formam uma ponte durante a anáfase, que se quebra à medida que os dois centrômeros são puxados em direções opostas. Devido ao fato da quebra não ocorrer necessariamente no ponto de fusão, uma das células filhas recebe um cromossomo com uma duplicação na sua ponta, enquanto a outra recebe um cromossomo com uma deleção terminal. Já que nenhum destes cromossomos apresenta telômeros, a próxima replicação levará à formação de uma nova fusão e assim sucessivamente. Estes ciclos podem continuar por muitas gerações, levando a uma extensiva replicação de DNA e uma deleção terminal progressiva, terminando somente quando um cromossomo eventualmente readquire um telômero e torna-se estável novamente (Murnane, 2006; Bailey & Murnane, 2006).

Tussel e colaboradores (2008) examinaram a participação de diferentes tipos de fusões terminais no estabelecimento de um cariótipo instável em células epiteliais de mama humanas não transformadas e propuseram uma ordem cronológica da participação destas fusões na geração da instabilidade cromossômica. A fusão intracromossômica aconteceria principalmente nos estágios iniciais da progressão,

onde a disfunção telomérica seria limitada e afetaria somente os terminais de um único cromossomo em cada célula. A ausência de um segundo substrato para a fusão conduziria a célula com o cromossomo instável a duplicar o DNA e fundir as cromátides irmãs depois da replicação. Mais tarde, visto que os telômeros encurtam progressivamente a cada ciclo de replicação, a disfunção telomérica afetaria mais terminais cromossômicos, e fusões entre pontas não funcionais de diferentes cromossomos também ocorreriam. Enquanto a fusão intercromossômica resulta em ampliações e deleções terminais nas células filhas, as fusões intracromossômicas resultam em rearranjos não balanceados.

Ao que tudo indica, somente uma célula com deficiência em *checkpoints* de ciclo celular ou apoptose escaparia da entrada na senescência e participaria de ciclos BFB. Em outras palavras, a ausência da expressão de genes de *checkpoints* para ciclo celular e apoptose, como *RB*, *TP53*, *TP21* e *TP16*, por exemplo, precederia o processo de perda telomérica (Guney & Sedivy, 2006; HeRobig & Sedivy, 2006; Bailey & Murnane, 2006; De Pinho e col, 2001).

Diversos trabalhos afirmam que um importante passo para a carcinogênese é a reativação da telomerase, uma vez que, para sobreviver à extensiva divisão celular, as células precisam prevenir a erosão e fusão de seus próprios telômeros (Shay & Bachetti, 1997; Bachetti e col, 1992). A telomerase é expressa em mais de 90% de todos os tumores humanos, e os demais apresentam um mecanismo alternativo para a manutenção dos telômeros, o ALT (alternative length of telomeres) (Neumann & Reddel, 2002; Bryan e col, 1995).

A regulação da expressão do mRNA do gene *TERT* parece ser o passo mais importante na reativação da telomerase (Flores et al, 2006). O promotor de *TERT* contém vários sítios regulatórios, incluindo dois sítios de ligação para *MYC*. Neste contexto, a expressão aumentada deste oncogene foi relacionada à reativação da telomerase por induzir a transcrição de *TERT* (Wu e col, 1999; Wang e col, 1998). A expressão constitutiva de *MYC* devido a translocações cromossômicas, mutação ou amplificação contribui para o desenvolvimento e a progressão de muitos tumores (Nesbit e col., 1999; Potter & Marku, 1997). De fato, mais de 70% de todos os cânceres humanos apresentam expressão desregulada de *MYC* colocando este gene entre os mais importantes proto-oncogenes humanos (Kutler & Mai, 2006).

O gene *MYC* é capaz de induzir rearranjos cromossômicos e agregados teloméricos através do remodelamento causado pela sua expressão constitutiva no

núcleo interfásico (Caporali e col., 2007; Mai & Garini, 2005). Alguns estudos sugerem que a expressão aberrante de MYC resulta na regulação anormal de proteínas que protegem os telômeros (Louis e col., 2005). Adicionalmente, Guffei e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão constitutiva de c-Myc pode mediar a formação de fusões Robertsonianas através do remodelamento centromérico no núcleo interfásico e subsequente promoção de fusões teloméricas em cromossomos de camundongos.

Camundongos *knockout* são importantes em estudos sobre os possíveis papéis dos telômeros e da telomerase na tumorigênese. Estes modelos têm demonstrado que telômeros curtos, na ausência de telomerase, funcionam como um potente supressor tumoral, e que isso coincide com a expressão aumentada de *Tp53*. Similarmente, a tumorigênese é reduzida também em camundongos que são simultaneamente deficientes de telomerase e supressores tumorais diferentes de *Tp53*, tais como *Tp19*, *p16* ou *APC*. Isto sustenta a idéia de que telômeros curtos suprimem a carcinogênese mesmo na ausência das principais vias supressoras de tumor. Por outro lado, em camundongos heterozigotos para *Tp53*, a deficiência de telomerase e os telômeros curtos levam a um aumento no número de tumores epiteliais com altos níveis de instabilidade cromossômica, indicando novamente que *Tp53* é um importante mediador da resposta celular ao encurtamento telomérico (revisto em Blasco, 2005).

A telomerase tem sido alvo de numerosas tentativas de terapia, algumas delas em estágios avançados de verificação, entre elas: a imunoterapia direcionada a *TERT*, terapias baseadas em oligonucleotídeos direcionados à *TERC*, terapia gênica com vírus oncolíticos e terapia combinada dos regimes terapêuticos já estabelecidos, quimioterapia e radioterapia, e as terapias inibidoras de telomerase (Shay & Wright, 2006).

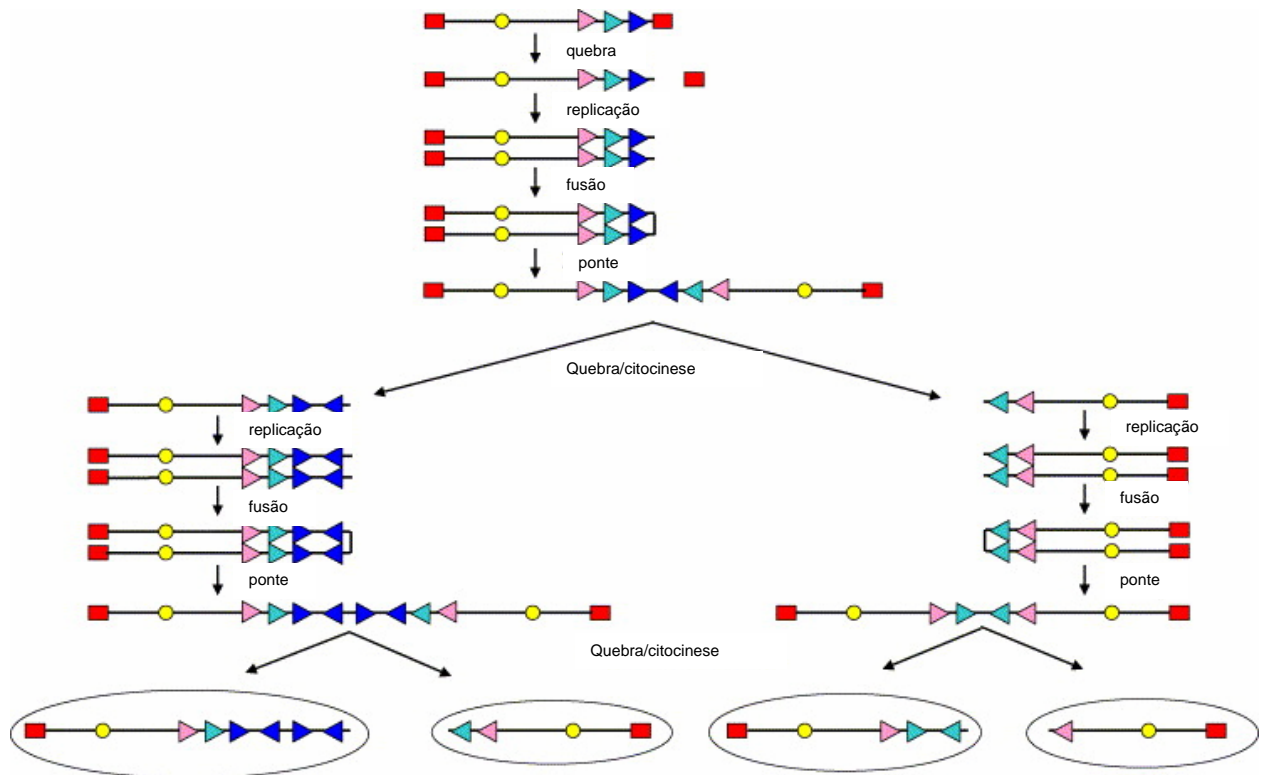


FIGURA 4. Ciclos de quebra/fusão/ponte – B/F/B (break/fusion/bridge). Representação esquemática dos ciclos de replicação que levam à instabilidade genômica causada pela perda dos telômeros. Extraído de Murnane, 2006. Os quadrados vermelhos representam os telômeros, os círculos amarelos representam os centrômeros e os triângulos coloridos a região subtelomérica.

3. Centrômero

3.1 Origem e função

O nome “centrômero” do grego kentron (centro) e meros (parte), foi dado à constricção primária do cromossomo por Darlington em 1936. O centrômero é a região cromossômica que determina a formação do cinetocoro e possibilita a coesão das cromátides irmãs durante a divisão celular. Pelo cinetocoro, o cromossomo interage com as fibras do fuso, possibilitando a segregação cromossômica correta (Villasante e col., 2007). É sabido que um cromossomo sem centrômero embora capaz de se replicar é perdido após uma ou duas divisões celulares (Wagner e col., 1993), eles são, portanto, cruciais para a estabilidade genética, e defeitos na função centromérica foram associados a doenças como câncer e outras síndromes genéticas, como por exemplo, a síndrome ICF (imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais).

Morfologicamente o centrômero divide o cromossomo em duas partes, chamadas de braços, onde o braço mais curto é denominado de “p” (*petit*) e o mais longo de “q” (subseqüente a “p”).

Quanto à posição centromérica os cromossomos podem ser classificados como telocêntricos, acrocêntricos, metacêntricos ou submetacêntricos. Nos cromossomos ditos telocêntricos os centrômeros localizam-se em uma das extremidades e não há braço curto. Nos acrocêntricos, o centrômero é localizado próximo a umas das extremidades, nos metacêntricos a localização dessas estruturas é mediana e nos submetacêntricos os centrômeros estão entre o ponto médio e as extremidades (Wagner e col., 1993).

3.2 Estrutura

A cromatina centromérica contém uma sequência única de DNA normalmente não encontrada em outras partes dos cromossomos. Nos eucariotos mais complexos em particular ela é chamada de heterocromatina e contém seqüências relativamente repetitivas de DNA como, por exemplo, GGAAT. Este tipo de DNA pode constituir uma porção significativa do DNA genômico, variando de 20 a 40% do total (Wagner e col., 1993).

Duas características distinguem os centrômeros do restante do cromossomo: a presença da variante da histona H3, CENP-A e, na maioria dos organismos, a presença de heterocromatina (Pidoux & Allshire, 2005).

Os centrômeros variam em tamanho e complexidade, podendo ser formados por uma pequena sequência (125pb) em levedura, ou por um enorme fragmento de repetições relativamente simples de 250 kb em drosófilas e 5000 kb em humanos (revisto em Choo, 1997). Estruturalmente, eles compreendem uma estrutura de cromatina diferenciada, consistindo em DNA e um complexo protéico chamado cinetocoro.

A sequência de DNA não é conservada entre os centrômeros de diferentes organismos, embora a presença de DNA satélite seja uma característica de praticamente todos os organismos eucarióticos (Pidoux & Allshire, 2005; Amor & Choo, 2002). Esta sequência consiste em repetições em tandem de 171 pares de bases (monômero), e é rica em AT (Choo, 1997). Estes monômeros são organizados em repetições que variam entre 3 e 5Mb de tamanho e apresentam uma alta similaridade nas sequências que os compõem (Alkan e col., 2007).

Em camundongos, os centrômeros são compostos por duas classes de sequências repetitivas de DNA, determinadas satélites *major* e *minor*. A sequência *major* é composta por repetições em tandem de um monômero de 234 pares de bases. Este DNA é encontrado nas regiões pericêntricas e heterocromáticas de todos os cromossomos, com exceção do Y. Além disso, a sequência de todos os monômeros parece ser conservada em todos os cromossomos, e este alto grau de conservação sugere freqüentes recombinações entre cromossomos não homólogos, que ainda parece ser facilitada pela natureza acrocêntrica dos cromossomos murinos (Choo, 1997).

Sequências *minor* são encontradas com uma freqüência 10 a 20 vezes menor que as sequências *major*. Estas sequências são compostas de unidades básicas de 120pb organizadas em repetições de aproximadamente 300Kb, ou aproximadamente 2500 cópias por cromossomo (Choo, 1997). Deste modo, parece que a sequência exata de DNA não é importante para a formação de um centrômero funcional e, cada vez mais, a atividade centromérica parece estar relacionada à organização da cromatina que seria centrômero-específica (Choo, 1998).

A cromatina centromérica pode ser dividida em *core* cromatina centromérica, que é o sítio de montagem do complexo cinetocoro, e em cromatina pericêntrica, que

está particularmente associada com a formação da “heterocromatina”, e que é vital para a integridade estrutural do centrômero (Amor e col, 2004). Também tem sido proposto que a heterocromatina pericêntrica pode prover uma barreira física entre os centrômeros e os braços eucromáticos dos cromossomos, e assim suprimir a recombinação meiótica. No entanto, a função da heterocromatina que parece mais essencial para a função centromérica é sua habilidade intrínseca de recrutar o complexo coesivo para as regiões centroméricas. A presença da heterocromatina nos centrômeros capacita o enriquecimento da coesão nestes sítios e sua manutenção até a separação das cromátides irmãs (Amor e col, 2004; Pidoux & Allshire, 2000)

A região de heterocromatina centromérica é também uma região de silenciamento transcricional. Genes localizados nesta região estão silenciados. Este fenômeno foi inicialmente descrito em drosófilas, e tem sido identificado em diversos organismos, de leveduras a humanos (Pidoux & Allshire, 2005).

3.3 Evolução centromérica, especiação, anormalidades estruturais e câncer.

O centrômero contribui para a especiação. Em camundongos, a especiação é comumente alcançada pela presença de cromossomos telocêntricos que apresentam uma alta taxa de homogenização. Existe uma identidade maior que 99% entre as seqüências telocêntricas de todos os cromossomos de camundongos, o que leva a freqüentes recombinações e a uma manutenção evolucionária estável. Esta similaridade genética, contudo, também possibilita a formação de translocações Robertsonianas (Rob) (Kalitsis e col., 2006; Garagna e col., 2001). Este tipo de translocação foi primeiro descrito em 1916 em gafanhotos por W. R. B. Robertson (revisto em Gardner & Sutherland, 2004). Camundongos com translocações Rob existem na natureza (Gazave e col., 2003; Nachman & Searle, 1995) e estas translocações são também comuns em camundongos de laboratório. Na natureza, os camundongos que carregam cromossomos com translocações Rob apresentam fertilidade reduzida (Merico e col., 2003; Bidau e col., 2001).

Fusões terminais de cromossomos humanos acrocêntricos geram translocações Robertsonianas. Estas translocações constituem a mais comum anormalidade genética em fetos abortados e recém nascidos (Kim and Shaffer, 2002; Nielsen and Wohler,

1991; Jacobs, 1981). Contudo, translocações Rob também têm sido encontradas em lesões genéticas adquiridas ou constitutivas como cânceres hematológicos (Welborn, 2004; Qian e col., 2002), tumores sólidos (Bayani e col., 2003; Padilla-Nash e col., 2001), em leucemia mielóide aguda (Shimokawa e col., 2004)

A posição espacial dos centrômeros no núcleo interfásico pode ser um fator que aumenta a propensão ao rearranjo (Guffei e col. 2007, Louis e col., 2005). Além disso, a homologia entre as seqüências centroméricas dos diferentes cromossomos pode também ter um papel na freqüência elevada de translocações nestas regiões (Bayani e col., 2006). Rearranjos estruturais em osteosarcomas mostram que quase 30% dos pontos de quebra acontecem nas regiões pericentroméricas (Bayani, 2003). Da mesma maneira, estudos em tumores de próstata mostram uma alta freqüência de quebras em regiões centroméricas e pericentroméricas (Vukovic e col., 2007; Beheshti e col., 2000). O freqüente envolvimento de regiões centroméricas na instabilidade genômica em câncer é também discutida por Bayanni e colaboradores em uma revisão recente (2007).

As células tumorais parecem seguir princípios evolucionários durante o processo de transformação maligna. Portanto, não é surpreendente que regiões pericentroméricas sejam *hotspots* tanto para recombinação durante a evolução (Yue e col., 2005) quanto ao longo da transformação maligna (Jamet e col., 2005; Shaw and Lupski, 2004).

3.4 Organização nuclear dos centrômeros no núcleo interfásico.

3.4.1 – Ciclo celular

A organização tridimensional (3D) dos centrômeros no núcleo interfásico tem sido estudada no contexto da diferenciação celular, ciclo celular, desenvolvimento embrionário e transformação celular. Estudando fibroblastos diplóides humanos, Bartholdi (1991) descreveu que a posição dos centrômeros varia durante o ciclo celular. Em G1, os centrômeros estariam associados com o nucléolo ou fusionados em cromocentros, com poucos centrômeros sozinhos. Na fase S, os centrômeros fusionados se dispersariam e formariam padrões distintos (anéis ou linhas). Na prófase, os centrômeros estariam condensados em pontos duplos distintos.

A análise de linfócitos humanos (Weimer e col., 1992) também indica uma organização ciclo celular-específica dos centrômeros no núcleo interfásico. Usando anticorpos contra sequências centroméricas (ACAS) de pacientes com síndrome de CREST, estes autores descreveram um posicionamento periférico dos centrômeros em G0 e G1. Em G2, as células apresentavam uma distribuição randômica dos centrômeros.

Sarkar e colaboradores (2007) descreveram a organização 3D de centrômeros em linfócitos de camundongos durante o ciclo celular. Eles também mostraram que a localização centromérica no núcleo é dependente do ciclo celular. Os centrômeros foram encontrados principalmente nas regiões periféricas nas fases G1 e G2 e uma distribuição mais dispersa no núcleo foi encontrada durante o crescimento logarítmico.

Os dados apresentados acima sugerem que os centrômeros são distribuídos no núcleo de forma dependente de ciclo celular em todas as células humanas e murinas examinadas até agora.

3.4.2 – *Diferenciação celular*

Beil e colaboradores (2005 e 2002) estudaram a organização dos centrômeros durante a diferenciação da linhagem celular de leucemia NB4. A indução da diferenciação por ácido retinóico em células NB4 induziu uma distribuição nuclear alternativa de centrômeros quando comparado com células não diferenciadas. As células diferenciadas apresentaram diminuição no número de *clusters* centroméricos (cromocentros) e a distância entre eles aumentou de 350 para 800nm.

Células T murinas diferenciadas apresentam organização centromérica diferenciada quando comparadas a células não diferenciadas (Kim e col., 2004). Enquanto as células indiferenciadas tinham seus centrômeros localizados no interior nuclear, as células diferenciadas (CD4+ e CD8+) tinham seus centrômeros posicionados mais periféricamente. Similarmente, células tronco embrionárias humanas têm uma pequena porção de seus centrômeros localizados na periferia nuclear quando comparadas com as células já diferenciadas (Wiblin e col., 2005).

Desta forma, é possível que a diferenciação celular necessite de alterações das posições centroméricas no núcleo e que estas estejam relacionadas ao remodelamento global das funções nucleares durante este processo, tais como, mudanças na transcrição gênica e parada da replicação. A periferia nuclear parece ser a região

preferencial dos centrômeros quando as células se diferenciam e é também a posição preferida dos centrômeros em G0 e G1.

3.4.3 – *Transformação maligna*

O reposicionamento centromérico no núcleo interfásico contribui também para o remodelamento do núcleo na transformação maligna. Há um significativo remodelamento das posições centroméricas no núcleo de linfócitos transformados quando comparados aos normais (Sarkar e col., 2007). Enquanto os centrômeros dos linfócitos normais de camundongo assumem uma posição periférica no núcleo interfásico, os das células tumorais se redistribuem em uma posição nuclear mais central (Guffei e col., 2007). O remodelamento das posições centroméricas permite também o desenvolvimento de translocações Robertsonianas nos núcleos das células murinas depois da ativação condicional de *c-Myc* (Guffei e col., 2007). O mesmo rearranjo é também observado em células com expressão constitutiva de *c-Myc* (Guffei e col., 2007; McCormack e col., 1998).

Os centrômeros e suas regiões pericêntricas são evolucionariamente dinâmicas. Estas características reforçam a hipótese de que centrômeros reposicionados espacialmente podem então interagir entre eles permitindo aumento de eventos de recombinação quebra e fusão. Portanto, o remodelamento dos centrômeros durante a transformação celular pode permitir a ocorrência de rearranjos cromossômicos e favorecer a expressão de novos genes e novos padrões de replicação, uma vez que estes estão mais freqüentemente localizados no interior nuclear, região associada tanto com replicação quanto transcrição (Lanctôt e col., 2007; Casolari e col., 2005).

5. Instabilidade genética

A instabilidade genética é uma característica comum à maioria dos tumores. Muitas células tumorais apresentam cariótipos anormais, com rearranjos numéricos ou cromossômicos (revisto em Mitelman, 2000).

A instabilidade genética é geralmente classificada em dois tipos: instabilidade de microssatélites (MIN) e instabilidade cromossômica (CIN) (Rajagopalan e col., 2003). O microssatélite consiste de unidades de cerca de um a quatro nucleotídeos, repetidas em *tandem* e que estão espalhados pelo genoma, preferencialmente em regiões não codificadoras. A instabilidade de microssatélites é definida como qualquer mudança no tamanho destas seqüências por inserções ou deleções devido a defeitos no sistema de reparo de DNA (Modrich, 1997; Kolodner e col., 1995). A instabilidade cromossômica é caracterizada por cariótipos apresentando muitas anormalidades, tanto numéricas quanto estruturais. Erros na segregação cromossômica durante a mitose levam ao fenótipo CIN, que é causado em parte por defeitos no metabolismo telomérico, ampliações e disfunções centroméricas, e por defeitos nos *checkpoints* celulares (Lengauer e col, 1997).

Nos últimos anos, diversos grupos têm associado síndromes de câncer com a instabilidade cromossômica, e alguns deles apontam a aneuploidia como um evento precoce (Michor e col., 2005; Hanks e col., 2004; Rajagopalan e col., 2003; Komarova e col., 2002) e outros, como eventos mais tardios (Hernando e col., 2004). Independentemente de quando esse evento acontece, os investigadores parecem concordar que a aneuploidia deve ser reconhecida como um dos principais eventos no processo de transformação maligna (Hede, 2005).

A idéia da aneuploidia como causa da transformação maligna não é nova, ela foi primeiramente proposta por Theodor Boveri em 1902 e era conhecida como hipótese da aneuploidia. No final dos anos 70, com a descoberta dos oncogenes e dos supressores tumorais uma nova hipótese foi relacionada ao processo de malignização celular (Weaver & Cleveland, 2007).

Diversos genes estão envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica e representam alvos mutacionais que levariam à desestabilização dos cromossomos, como por exemplo, os genes *APC*, *DNMT3B*, *MAD2*, entre outros. Entretanto, defeitos em tais genes têm sido associados somente a um pequeno grupo de tumores

humanos, e estes afetam primeiramente o número de cromossomos (Meeker e col., 2004).

Outro mecanismo associado à instabilidade genômica é a deficiência funcional do telômero. O encurtamento telomérico pode conduzir à fusão das cromátides irmãs e aos ciclos de ruptura/fusão/ponte (BFB), levando à amplificação extensiva do DNA e às grandes deleções terminais (revisto em Bailey & Murnane, 2006).

Do mesmo modo, as anomalias do centrômero parecem ter igualmente um papel na aneuploidia. Diversos grupos têm mostrado aumento de rearranjos cromossômicos em regiões centroméricas hipometiladas (Rodriguez e col., 2006; Dobrar-Muller e col., 2000; Sawyer e col., 1995). Além disso, em humanos a translocação Robertsoniana (Rob) é o rearranjo cromossômico mais comumente observado em fetos abortados (Dobrar-Muller e col., 2000).

Portanto, o mecanismo molecular que conduz à instabilidade cromossômica, assim como quando este processo se inicia, permanece um mistério (Meeker e col., 2004). Nesse contexto, as translocações cromossômicas podem ser apenas uma consequência da transformação maligna, mas podem atuar igualmente como a causa deste processo pela formação de genes fusionados que conduzem a uma proteína oncogênica ou a uma alteração gênica com potencial oncogênico (Meaburn e col., 2007).

A formação de translocações parece estar associada ao arranjo espacial dos cromossomos envolvidos, já que exige a interação física dos mesmos. A proximidade espacial tornou-se criticamente relevante para a compreensão de como a instabilidade genômica e as aberrações cromossômicas ocorrem. É cada vez mais evidente que o genoma está organizado espacialmente de maneira não randômica dentro do núcleo interfásico e que esta organização está ligada à correta expressão do genoma (Meaburn e col., 2007). Em eucariotos, os cromossomos estão organizados de maneira não randômica dentro de discretos territórios tridimensionais ou domínios (CT). Este posicionamento parece ser influenciado pelo tamanho do cromossomo e por sua densidade gênica, sendo os cromossomos “ricos” em genes localizados no interior nuclear e os cromossomos “mais pobres” na sua periferia (Murata e col., 2007; Khalil e col., 2007; Meaburn e col., 2007). Estudos mostram que mudanças no posicionamento nuclear dos CTs induzidos pela presença de cópias cromossômicas extras podem contribuir para o desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer (Petrova e col., 2007; Murata e col., 2007; Sarkar e col., 2007).

6. Modelo de transformação neoplásica

Foi desenvolvido em nosso laboratório um modelo murino de carcinogênese *in vitro* a partir da restrição da adesão ao substrato da linhagem não tumorigênica de melanócitos, melan-a (Oba-Shinjo e col, 2006; Correa e col., 2005). Nele, a condição de impedimento seqüencial de ancoragem foi suficiente para o estabelecimento tanto de linhagens celulares não tumorigênicas, correspondentes às etapas que levam à transformação dos melanócitos melan-a, como de linhagens de melanoma com diferentes níveis de agressividade (**FIGURA 5**).

Melan-a é uma linhagem de melanócitos pigmentados imortalizados espontaneamente a partir de melanoblastos epidérmicos normais de embriões de camundongos C57BL6 (Bennett e col., 1987). Estas células proliferam em condições semelhantes àquelas requeridas pelos melanócitos e melanoblastos de camundongos normais não estabelecidos, como a dependência de forbol miristato acetato (PMA) e o pH extracelular baixo. Elas não formam tumores em camundongos singenéticos ou *nude*, mesmo quando inoculadas em quantidade elevada (2×10^7 células por animal), e retêm todas as características de melanócitos normais testadas, exceto pela resposta proliferativa à toxina da cólera na presença de PMA e pela senescência (Bennett e col., 1987).

Células melan-a (10^5 células/ml) foram mantidas em suspensão por 96 horas – tempo que corresponde a um ciclo impedimento de ancoragem. Apesar de não serem tumorigênicas, as células melan-a formaram pequenos esferóides em uma baixa proporção de aproximadamente 0,1%. Esses esferóides foram transferidos para uma placa de cultura, cultivados em condições normais de adesão e expandidos, dando origem a uma nova linhagem, denominada 1C (linhagem obtida após um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato). Essa sublinhagem de melan-a foi submetida a um novo ciclo de impedimento de ancoragem e, após 96 horas, células sobreviventes foram resgatadas e foi obtida a sublinhagem 2C (dois ciclos de bloqueio de adesão ao substrato).

Estes ciclos seqüenciais de impedimento de ancoragem por 96 horas, seguidos pelo cultivo em adesão e expansão das células sobreviventes, foram repetidos dando origem às linhagens 3C e 4C (três e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente). As linhagens 1C, 2C, 3C e 4C, como a parental, não são capazes de

formar tumores *in vivo*, mas já apresentam crescimento independente de PMA (Oba-Shinjo e col., 2006).

Esferóides formados após submeter à linhagem 4C a um ciclo de bloqueio de adesão ao substrato foram sujeitos à diluição limitante originando diferentes linhagens de melanoma (4C3, 4C11, Tm1 e Tm5, entre outras). Uma transformação espontânea em cultura ocorreu com as linhagens celulares 4C3 e 4C11, que então passaram a ser denominadas 4C3- e 4C11- e suas descendentes 4C3+ e 4C11+, respectivamente.

Esses clones também apresentaram capacidade de crescimento independente de PMA, uma característica de células de melanoma em cultura (Mufson e col., 1979), e foram testados quanto a sua tumorigenicidade, sendo transplantados subcutaneamente (5×10^5 células/animal) no dorso de camundongos C57BL/6 singênicos. Surpreendentemente, todos os clones analisados derivados dos esferóides da linhagem 4C mostraram-se tumorigênicos, com períodos de latência para o aparecimento do tumor variando de 12 a 30 dias. Posteriormente, estes clones foram avaliados quanto à capacidade de formação de esferóides e mostraram-se capazes de formar esferóides em uma proporção 20 a 320 vezes maior que as células parentais. Além disso, estas células apresentam diferenças fenotípicas como pigmentação, velocidade de crescimento em cultura, agregação e capacidade metastática (Oba-Shinjo e col., 2006).

Assim, este modelo confere uma vantagem excepcional para elucidar quais mecanismos estão envolvidos no início da tumorigênese e quais deles são responsáveis pela sua progressão. Isso porque foram estabelecidas tanto linhagens celulares não tumorigênicas, correspondentes às etapas que levam à transformação dos melanócitos melan-a, como linhagens de melanoma com diferentes níveis de agressividade, sendo que todas elas, bem como a linhagem parental melan-a, têm uma origem genética comum.

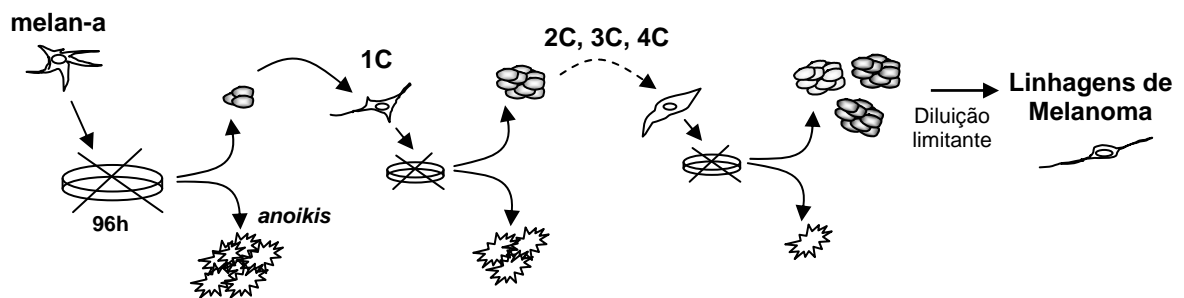


Figura 7. Modelo de transformação maligna de melanócitos associado à resistência ao anoikis.

Representação esquemática do protocolo experimental que resulta na transformação dos melanócitos melan-a. Melanócitos não tumorigênicos da linhagem melan-a foram submetidos a ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem. Após submeter estas células ao 5º ciclo de bloqueio de ancoragem, os esferóides foram clonados e todos os clones, selecionados aleatoriamente, foram tumorigênicos quando inoculados subcutaneamente em camundongos singenéticos. Desta forma, diferentes linhagens de melanoma foram obtidas, apresentando diferentes taxas de proliferação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de diferentes padrões de pigmentação. 1C, 2C, 3C e 4C: células melan-a submetidas, respectivamente, a 1, 2, 3 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem; 96h: tempo de cultivo em condição de bloqueio de ancoragem em horas.

Objetivos

Objetivo geral:

- Analisar a evolução cariotípica ao longo da transformação maligna de melanócitos melan-a induzida pelo bloqueio de adesão ao substrato e avaliar o papel da instabilidade telomérica e centromérica neste contexto.

Objetivos específicos:

- Verificar o tamanho telomérico ao longo do modelo, identificar aberrações envolvendo essas estruturas e sua possível relação com o processo de transformação maligna de melanócitos murinos.
- Avaliar a contribuição centromérica na formação dos rearranjos estruturais observados ao longo da transformação maligna.

Material

1. Comitê de Ética em Pesquisa

O desenvolvimento deste projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, sob o processo de número 0738/07.

2. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, do sexo feminino, com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura e iluminação (ciclo 12/12 horas claro/escuro), sem restrição alimentar. A manipulação e manutenção dos animais estiveram de acordo com procedimentos padrão definidos no Guia Internacional de Princípios para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (CIOMS, Genebra, 1985).

3. Anticorpos

- Anticorpo primário policlonal produzido em coelho, direcionado à seqüência de aminoácidos 1 a 262 do gene *MYC* humano, reativo para amostras de camundongo, rato e humano, procedente da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (*San Diego, CA, USA*);

- Anticorpo secundário policlonal produzido em cabra, direcionado à IgG de coelho, conjugado com Alexa 488, procedente da Molecular Probes (*Eugene, OR, USA*).

4. Drogas e reagentes

- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), formamida deionizada, *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), *polyoxyethylenesorbitan monolaurate* (Tween 20), procedentes da Amresco (*Solon, Ohio, USA*);

- *4'-6-Diamidino-2-phenylindole* (DAPI), Corante tetrazólico amarelo solúvel *3-(4,5,-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT), procedentes da Calbiochem (*Darmstadt, Germany*);

- Ácido acético glacial, ácido clorídrico 37% (HCl), azul de bromofenol, azul de Toluidina, cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol absoluto, extran, formaldeído 37%, fosfato de potássio (K_2HPO_4), isopropanol, metanol, xilol e xileno cyanol, procedentes da Merck (*Darmstadt, Germany*);

- Ácido bórico, bicarbonato de sódio, meio de cultura RPMI 1640, penicilina-estreptomicina, soro fetal bovino, procedentes da Gibco (*Carlsbad, CA, USA*);

- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES), brometo de etídeo, *diethylpyrocarbonate* (DEPC), *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), *phorbol 12-myristate13-acetate* (PMA), procedentes da Sigma-Aldrich Co. (*St. Louis, MO, USA*);

- agarose (*DNA typing grade*), dNTP Mix, fenol saturado em Tris-HCl *UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol*, *tris[hydroxymethyl]aminomethane* (Tris base), *tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride* (Tris-HCl), *TRIzol®*, procedentes da Invitrogen (*Carlsbad, CA, USA*);

- Criotubos, filtros com membrana de 0,2 μm para meio de cultura celular Filtropur, placas de cultura celular de 100 mm e de 60 mm de diâmetro, placas plásticas de cultura celular contendo 6, 24 e 96 poços, ponteiras de micropipetas com capacidade de volume máximo de 0,1, 0,2 e 1 mL, tubos para microcentrífuga com capacidade de volume máximo de 0,2, 0,5, 1,5 e 2,0

mL e tubos para centrífuga com capacidade de volume máximo de 15 e 50 mL, procedentes da Sarstedt AG & Co. (*Nümbrecht, Germany*);

- Marcadores de peso molecular para DNA, procedentes da Fermentas International Inc (*Ontario, Canada*);

- Solução de tripsina 0,25%/EDTA 0,5mM, procedente do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil);

- Kit de detecção de atividade da telomerase: *TRAPeze® Telomerase Detection Kit – S7700 – Chemicon (Billerica, MA, USA)*;

- Formaldeído para reações de FISH e pepsina procedentes da *Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada)*;

- Etanol e metanol para reações de FISH e SKY procedentes da *Fluka Analytical (Oakville, Ontario, Canada)*;

- *Rubber Cement* procedente da *Elmer's (Columbus, Ohio, USA)*;

- *Anti-fade Vectashield* procedente da *Vector Laboratories (Burlington, ON, Canada)*;

- *Kit* de SKY para camundongo procedente da *Applied Spectral Imaging, (Vista, CA, USA)*.

5. Enzimas

- DNA polimerase *BioTools DNA Polymerase—Recombinant from Thermus thermophilus* procedente da *BioTools (Madrid, Spain)*;

- DNase I (*Amplification Grade*), Ribonuclease A (RNase A), RNaseOUT™, *Superscript™ III*, procedentes da *Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)*;

- *Taq* DNA polimerase recombinante, procedente da *Fermentas International Inc. (Ontario, Canada)*.

6. Sondas

- Sonda pan-centromérica murina conjugada com FITC procedente da *Cambio (Dry Drayton, Cambridge, England)*;
- Sonda telomérica PNA procedente da DAKO (*Glostrup, Germany*);
- Sonda centromérica humana PNA procedente da Applied Biosystems, (Foster City, CA, USA).

7. Linhagens celulares

A linhagem de melanócitos melan-a (Bennett *et al.*, 1987) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Rabinovitch da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As demais linhagens (2C, 4C, 4C3, 4C11, Tm1 e Tm5) foram estabelecidas em nosso laboratório.

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi gentilmente cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, São Paulo.

8. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com base em seqüências publicadas no *Genbank* através do site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), e estão descritos abaixo.

Tabela 1 – Seqüências dos iniciadores:

<i>Tert</i> sense	5' CAT GGG TGC CAA GTC CTG CTC 3'
<i>Tert</i> antisense	5' CTG TGC AGG CGG AGC AAA TCC 3'
β - <i>actina</i> sense	5' CGA GGC CCA GAG CAA GAG AG 3'
β - <i>actina</i> antisense	5' AGG AAG AGG ATG CGG CAG TGG 3'

Tert sense, *Tert* antisense, β -actina sense e β -actina antisense, procedentes da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

9. Programas

Para a quantificação da intensidade dos pixels presentes na imagem das bandas geradas por eletroforese em gel de agarose 1%, foi utilizado o programa *Image Processing and Analysis in Java, ImageJ 1.38b* (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>);

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 4.00 para *Windows* (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Métodos

1. Modelo de estudo

Neste trabalho utilizamos um modelo de transformação maligna de melanócitos murinos (Oba-Shinjo e col, 2006; Campos e col, 2007) que consiste de diferentes linhagens de melanoma (4C3-, 4C11-, Tm1 e Tm5) estabelecidas após submeter à linhagem não tumorigênica de melanócitos murinos, melan-a (Bennett e col, 1987), a ciclos seqüenciais de impedimento da adesão ao substrato. Sublinhagens não tumorigênicas de melanócitos melan-a submetidos a 2, 3 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem (2C, 3C e 4C, respectivamente) também foram estabelecidas e representam fases distintas da progressão tumoral.

As linhagens 4C3+ e 4C11+ surgiram espontaneamente em cultura a partir das linhagens 4C3- e 4C11-, respectivamente.

2. Cultura primária de macrófagos

Macrófagos (MØs) residentes foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 por lavagem da mesma com 5 ml de meio RPMI 1640 gelado, estéril e isento de soro e antibiótico. As células do lavado foram dispostas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) contendo lamínulas circulares de vidro ou em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro.

Os MØs foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as culturas foram lavadas três vezes com PBS, a fim de remover células não aderentes.

3. Meios de cultura celular

A linhagem de melanócitos melan-a e as linhagens obtidas após os ciclos de bloqueio de ancoragem foram cultivadas em meio RPMI 1640 pH 6,9 suplementado com 5% de soro fetal bovino, acrescido de 10 mM de ácido N-2-hiroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES), 24 mM de bicarbonato de

sódio e 10 ml/L de penicilina – estreptomicina (meio R5). Para a linhagem melan-a, 200 nM do éster de forbol (PMA) foi adicionado ao meio.

Macrófagos extraídos do peritônio de camundongos C57BL/6 e células de melanoma da linhagem B16F10 foram cultivados em meio RPMI pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio R10).

4. Cultura e manutenção dos estoques celulares

Todas as linhagens utilizadas foram cultivadas em monocamadas, em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro, em meio RPMI (5% ou 10% de soro fetal bovino), até atingirem subconfluência.

As células foram mantidas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C. Estoques celulares foram armazenados em criotubos, congelados em meio de congelamento (10% de dimetilsulfóxido em soro fetal bovino) e mantidos em nitrogênio líquido.

5. Tumorigênese *in vivo*

Camundongos singenéticos C57BL/6 foram inoculados subcutaneamente no flanco esquerdo com 2×10^5 células em 100 µl de PBS. Cada grupo experimental consistiu de 5 animais.

Os tumores foram mensurados diariamente com o auxílio de paquímetro.

O volume foi calculado pela fórmula descrita a seguir:

$$\text{Volume em mm}^3 = \frac{(\text{diâmetro menor})^2 \times \text{diâmetro maior}}{2}$$

6. Ensaio de metástase experimental

Camundongos singenéticos C57BL/6 foram inoculados na veia lateral da cauda com $2,5 \times 10^5$ células (linhagens 4C3- e 4C3+) em 100 µl de PBS.

Foram utilizados 5 animais no grupo experimental da linhagem 4C3+ e 20 no grupo experimental da linhagem 4C3-.

Após 20, 40, 60 e 80 dias, grupos de cinco animais tiveram seus pulmões removidos cirurgicamente para a verificação da presença ou ausência de focos metastáticos.

7. Ensaio de proliferação celular

Para estudos de proliferação celular, as linhagens celulares foram dispostas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço/100 μ l de meio R5) e cultivadas por 24 horas em meio completo. Após diferentes tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas), o número de células viáveis foi estimado através do método colorimétrico baseado na redução metabólica do corante tetrazólico amarelo solúvel – MTT ($C_{18}H_{16}N_5SBr$), em formazan púrpura insolúvel, pela ação da succinil-desidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983).

8. Extração de RNA total

O RNA total das linhagens foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol®, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para a extração, as células foram cultivadas conforme descrito acima, lavadas em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,03 mM e K_2HPO_4 1,46 mM, pH 7,2 – 7,4), removidas da placa de cultura pelo tratamento com solução de tripsina 0,25%/ EDTA 0,5 mM, lavadas em meio R10 e mais uma vez em PBS. Ao final das lavagens, as células foram homogeneizadas em 500 μ l de TRIzol® e a suspensão, transferida para tubos de microcentrífuga. Para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, as amostras homogeneizadas foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 100 μ l de clorofórmio, os tubos agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, o que resultou na separação da solução em três fases distintas – a fase superior aquosa, contendo o RNA, foi transferida para tubos novos. O RNA foi precipitado com 250 μ l de isopropanol durante 10

minutos a temperatura ambiente e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 1 ml de etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Os tubos ficaram abertos à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse. O RNA foi então ressuspensão em água tratada com 1% de DEPC (dietilpirocarbonato) e imediatamente congelado a 80°C negativos.

Para a quantificação do RNA extraído, 2 µl da amostra foram utilizados. A concentração foi determinada por um espectrofotômetro (ND-1000 – *Thermo Fisher Scientific*, EUA) pela da leitura da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 260 nm, obedecendo à proporção de 40 µg de RNA/ml por absorvância de 1 (Sambrook e col, 1989). Também foram efetuadas medidas a 280 nm para avaliar a pureza do RNA. A relação dos valores obtidos a 260 e 280 nm (razão DO260/DO280) deveria estar em torno de 1,8 para que o material fosse considerado puro o bastante para análise. Caso este valor não fosse atingido, o material era descartado e procedia-se nova extração de RNA.

A integridade do RNA total extraído das diferentes linhagens celulares foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo 16% de formaldeído. Para 50 ml de gel, 0,75 g de agarose foi acrescentado a 37 ml de água DEPC e 5 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 (Na_2HPO_4 77,4 mM e NaH_2PO_4 22,6 mM). Após o aquecimento da solução para completa dissolução da agarose, 8 ml de formaldeído foram adicionados. Utilizou-se 5 µg de RNA total de cada amostra solubilizados em 3 vezes seu volume de tampão de amostra para RNA (750 µl de formamida, 90 µl de formaldeído, 150 µl de tampão fosfato 100 mM, 0,1 mg de azul de bromofenol e 135 µl de água DEPC) e 1 µl de brometo de etídio 1 mg/ml. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos, resfriadas em gelo e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mM a 60 volts por 2 horas. A cada 20 minutos, o tampão era recirculado para equilibrar o pH. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado a uma câmera e sua imagem, digitalizada por um sistema *Kodak* de imagens (ambos equipamentos procedentes da *Kodak digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*).

9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa

Para excluir a possibilidade de contaminação por DNA genômico, 4 µg de RNA total foram tratados com a enzima *DNase I*, seguindo as instruções do fabricante. O volume da solução de RNA foi ajustado para 21 µl com água DEPC. Foram acrescentadas 1 unidade da enzima *DNase I* e 20 unidades do inibidor de ribonuclease, *RNaseOUT™*, em uma solução contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi inativada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8,0), seguida de incubação a 65°C por 10 minutos. O volume final da reação foi de 25 µl.

Aproximadamente 1 µg do RNA total tratado com *DNase I* (6,25 µl) foi incubado a 65°C por 5 minutos em solução contendo 500 ng de Oligo (dT) Iniciador e 1,5 mM de *dNTP Mix* em um volume de 6,5 µl, e imediatamente em gelo por 2 minutos. Depois que a reação chegou à temperatura ambiente, foram acrescentados 7 µl de uma solução contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 40 unidades de *RNaseOut™* e 200 unidades da transcriptase reversa *Superscript™ III* e a reação realizada a uma temperatura de 25°C por 5 minutos, seguidos de 60 minutos a 50°C e mais 60 minutos a 55°C, finalizando com 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram estocados a 20°C negativos.

Para a verificação da síntese e integridade da primeira fita do cDNA, o produto sintetizado por RT-PCR foi amplificado com iniciadores específicos para o gene da *β-actina* (**Tabela 1**). Nesta reação, adicionou-se 1 µl do cDNA sintetizado, tampão contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,36 mM de *dNTP Mix* (0,36 mM de cada dinucleotídeo), 0,36 mM de cada iniciador, e 1 unidade de Taq DNA polimerase (marca). A reação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão de 72°C por 10 minutos. As amostras de RNA total, antes e depois de serem tratadas com *DNase I*, também foram submetidas a esta reação para descartar a hipótese da amplificação do gene ser decorrente de uma contaminação por DNA genômico. Este controle positivo sempre era feito quando se utilizava um cDNA pela primeira vez e quando nova

alíquota do mesmo era feita a partir do estoque. Além deste controle, em todas as PCRs realizadas, utilizamos como controle negativo, reações sem a adição de cDNA, para garantir que os reagentes utilizados estavam livres de contaminação.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts, em tampão TBE, até que as amostras alcançassem 2/3 da extensão total do gel. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado a uma câmera e sua imagem, digitalizada por um sistema *Kodak* de imagens (ambos equipamentos procedentes da *Kodak digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*).

10. RT-PCR semiquantitativo

Diversas ciclagens foram utilizadas para a amplificação do gene *Tert* e da β -actina (controle interno da reação). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, utilizando-se 1 μ L da primeira fita de cDNA, tampão contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 20 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,36 mM de *dNTP Mix*, 0,36 mM de cada oligonucleotídeo, e 1 unidade de DNA polimerase. Todas as reações foram realizadas em termociclador *Personal Eppendorf (Hamburg, Germany)*. Para análise semiquantitativa da expressão de *Tert*, foram realizadas três reações para cada amostra tendo apenas o número de ciclos diferentes entre elas. As condições de ciclagem utilizadas foram iniciadas com desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguida de 29, 32 e 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão de 72°C por 10 minutos. Para o gene da β -actina foi utilizada ciclagem iniciada pela desnaturação a 94°C por 5 minutos, 19, 22 e 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e preparado em tampão TBE. O gel foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e a imagem, capturada por um sistema automático *Kodak* (ambos equipamentos procedentes da *Kodak*

digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120). A intensidade emitida pelas bandas foi quantificada através do programa *ImageJ1.38b*. Os resultados foram normalizados por meio da relação dos valores obtidos na amplificação dos dois genes (razão da expressão de Tert/ β -actina).

11. Ensaio da Telomerase (TRAP assay)

A atividade da enzima telomerase foi analisada utilizando-se o kit TRAPeze® S7700. Aproximadamente 10^6 células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, o pellet foi então lavado em 1xPBS e após nova centrifugação o pellet foi ressuspenso em 200 μ l de tampão de lise CHAPS contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidina, 5 mM β -mercaptoetanol, 0.5% CHAPS e 10% Glicerol. As amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos, e precipitadas por centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então recuperado e transferido para tubos novos. A concentração protéica foi determinada através do reagente *Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate*, em leitor de ELISA em comprimento de onda de 570 nm. e a mesma quantidade protéica (0.1 μ g do extrato protéico total) de cada amostra foi utilizada no ensaio.

A metodologia utilizada neste *kit* é baseada no método descrito por Kim e colaboradores (1994) e consiste em um sistema de duas enzimas e um tampão que utiliza a tecnologia de PCR. Em um primeiro momento, a telomerase presente nos extratos celulares adiciona certo número de repetições teloméricas (GGTTAG) na ponta 3' de um oligonucleotídeo (TS) oferecido como substrato. Após incubação por 30 minutos a 30°C, os diferentes produtos criados pela extensão deste substrato são amplificados através da reação de PCR usando os iniciadores TS e RP (iniciador reverso), gerando uma escala crescente de produtos com 6 bases de diferença, começando em 50 nucleotídeos (50, 56, 62, 68, etc).

Para a análise das amostras, 5 μ l de tampão de amostra foram adicionados a cada 25 μ l de reação, e os produtos foram então separados em

gel de poliacrilamida 12%, a 200 V por 2 horas em 0.5 x TBE. Como controles negativos foram utilizadas a mesma quantidade de extrato (0.1 µg) de cada amostra aquecida por 10 minutos a 85°C (inativando a telomerase) e uma reação sem adição de extrato celular.

As imagens foram capturadas usando uma câmera digital *FinePix S9000* (Fujifilm, Minato, Tokio, Japan).

12. Preparação de lâminas para análise de núcleos interfásicos

Todas as linhagens foram cultivadas em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro, em meio R5, até atingirem subconfluência. As células então foram tripsinizadas e 2×10^5 células de cada linhagem foram ressuspensas em 500 µl de meio R5 e dispostas sob uma lâmina de vidro em uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro. As placas foram então incubadas por 4 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, 10 ml de meio R5 foram adicionados a cada uma das placas e estas foram mantidas na estufa até atingirem subconfluência.

13. Preparação de metáfases

Culturas subconfluentes foram tripsinizadas e divididas em 2 placas 24 horas antes de serem utilizadas para a preparação dos cromossomos em metáfase. As células foram removidas das placas, lavadas em $1 \times$ PBS, ressuspensas em 5 ml de solução hipotônica (0,075 M KCl) em um tubo cônico de 15 ml e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

A suspensão de células foi centrifugada a 800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e, a cada dois minutos, 5 gotas de uma solução fixadora (3:1 metanol/ácido acético) foi adicionada ao *pellet* celular. Este procedimento foi repetido até que o volume da solução atingisse 5 ml. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspenso na própria solução fixadora com a ajuda de uma pipeta Pasteur, as células foram centrifugadas sob as mesmas condições descritas acima e o sobrenadante, descartado. Cinco ml de fixador

foram então adicionados, o *pellet* foi ressuspensão e a solução, incubada a temperatura ambiente por 10, 20 e 30 minutos. Após nova centrifugação, 2 a 5 ml de fixador foram adicionados e as lâminas foram montadas.

14. Peptide-nuclei-acid (PNA)-FISH (hibridação *in situ* fluorescente) em núcleo interfásico

As lâminas foram retiradas das placas de cultura e imediatamente incubadas em uma solução de 3,7% formaldeído/ 1 × PBS por 20 minutos para que as células fossem fixadas. As lâminas foram então lavadas em 1 × PBS e incubadas por 10 minutos em 0.01 N HCl/ 50 µg/ml pepsina a 37°C. Em seguida, foram lavadas com 1 × PBS e mais uma vez fixadas em solução de 3,7% formaldeído por 10 minutos a temperatura ambiente.

Uma nova lavagem em 1 × PBS foi realizada para remover traços de formaldeído e uma série de soluções de etanol (70%, 90% e 100%) foi utilizada para a desidratação dos espécimes.

Em cada lâmina foram aplicados 5 µl da sonda PNA e uma lamínula de 15 × 15 mm foi colocada sobre ela e selada com *Rubber Cement*. As lâminas foram colocadas no sistema *Hybrite™* (*Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL*), onde sofreram desnaturação por 3 minutos a 80°C, e subsequente hibridização por 2 horas a 30°C. O *Rubber Cement* e as lamínulas foram delicadamente removidos, e as lâminas foram lavadas 2 vezes por 15 minutos em uma solução de 70% formamida/ 2 × SSC, seguida de uma lavagem em 2 × SSC/ 0.05% Tween 20 por 5 minutos a 55°C, antes da aplicação de 50 µl de DAPI (0.1 µg/ml). Finalmente, foi aplicada uma gota de *anti-fade* Vectashield e novas lamínulas foram adicionados às lâminas, que foram então estocadas a -20°C por 12 horas para evitar mudanças nas condições da imagem.

15. Aquisição de Imagem 3D

Foram adquiridas imagens de 30 núcleos interfásicos por linhagem celular, usando o microscópio Axiomager Z1 e a câmera Zeiss Axio Cam HRm.

As imagens foram capturadas com o auxílio de uma objetiva de 63×/1.4 oil (todos os equipamentos procedentes da Carl Zeiss Inc. Canadá) e o tempo de exposição para Cy3 (telômero) foi de 100 ms e de 15-45 ms para DAPI (núcleo).

Para cada núcleo, 100 planos foram adquiridos a uma distância xy:107nm e z: 200nm. O *software Axiovision 4.6* e o algoritmo *constrained iterative* (Schaefer e col., 2001) foram usados para a deconvolução das imagens.

Os sinais teloméricos a uma distância de 200 nm são detectados como um único sinal (Vermolen e col, 2005).

16. Análise das imagens 3D pelo *software Teloview*

As imagens *Z-stack* foram convertidas para arquivos tif e então lidas pelo *software TELOVIEW*. Cada imagem foi processada de acordo com o descrito anteriormente por Louis e colaboradores (2005) e Vermolen e colaboradores (2005). A medida dos telômeros foi obtida utilizando-se o *software TELOVIEW*. Após a escolha de um *threshold* para os telômeros, uma imagem binária é produzida. Baseado nisso, o centro de gravidade das intensidades é calculado para cada objeto, resultando em uma série de coordenadas (x, y, z) que define a posição das cruzes que aparecem na tela. A intensidade integrada de cada telômero é então calculada, já que ela é proporcional ao comprimento do telômero. A região de integração é determinada através do crescimento de uma esfera no topo da coordenada encontrada. Depois de cada etapa de crescimento (*iteration*), a soma deste volume (o telômero) é subtraída pela soma das regiões ao redor dele (*background*). Quando o processo de crescimento da esfera não contribui para um aumento integrado de intensidade, o algoritmo pára, uma correção automática de *background* é obtida e a nova intensidade integrada do telômero é calculada.

Uma vez que todas as análises foram concluídas, os dados foram transferidos para um arquivo Excel e foram construídos gráficos para

demonstrar a distribuição da intensidade dos telômeros em cada linhagem celular.

17. PNA-FISH em metáfases

PNA-FISH foi realizado em metáfases 2D derivadas das diferentes linhagens celulares. Sonda centroméricas humanas PNA foram sintetizadas com as seqüências listadas abaixo.

Seqüência 1: (N-terminal)Flu-OEE-ATTCGTTGGAAACGGGA-EE(C-terminal)

Seqüência 2: (N-terminal)Flu-OEE-CACAAAGAAGTTTCTGAG-EE(C-terminal)

Seqüência 3: (N-terminal)Flu-OEE-CAGACAGAAGCATTCTCA-EE(C-terminal)

Seqüência 4: (N-terminal)Flu-OEE-TGCATTCAACTCACAGAG-EE(C-terminal)

Este coquetel de sondas hibrida em todos os centrômeros de camundongo como já demonstrado por Guffei e colaboradores (2007). As sondas centroméricas foram desnaturadas a 55°C por 10 minutos e então adicionadas nas lâminas em conjunto com a sonda PNA telomérica. As lâminas foram desnaturadas a 80°C por 3 minutos, subsequenciamente hibridadas por duas horas a 30°C em câmara *HybriteTM* (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), e então lavadas em 70% formamida/ 2 × SSC.

Por fim, foi aplicada uma solução de DAPI (0.1 mg/ml), e o *anti-fade Vectashield* foi adicionado à lâmina. Todas as imagens foram capturadas imediatamente ao final do experimento para evitar mudanças nos parâmetros de obtenção das mesmas. Foram adquiridas imagens de, no mínimo, 20 metáfases por linhagem celular (melan-a, 4C3- e 4C3+), usando o microscópio *Axioplan 2* e a câmera Zeiss Axio Cam HRm. As imagens foram capturadas com o auxílio de uma objetiva de 63×/1.4 *oil* (todos os equipamentos procedentes da *Carl Zeiss Inc. Canadá*).

18. *Spectral Karyotyping Analysis (SKY)*

SKY foi realizado usando o *kit* para camundongo da ASI (dados da marca), como descrito abaixo.

As lâminas contendo preparações cromossômicas foram incubadas em 2 x SSC por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 100 µl de uma solução 100 µg/ml de RNAase A em 2 x SSC foram aplicados sobre a lâmina, essas foram então cobertas por uma lamínula e incubadas por 1 hora a 37°C em estufa umidificada. Após incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução 2 x SSC sob agitação a temperatura ambiente e então incubadas por 12 minutos a 37°C em uma solução 0.01 M de HCl pré-aquecida contendo 50 µg/ml de pepsina.

Um volume igual a 5 µl por lâmina da solução contendo as sondas cromossômicas (tubo 1) foi transferido para um tubo e então desnaturado a 85°C por 5 minutos e depois incubado por uma hora a 37°C. Durante essa incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 1 x PBS por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação, e depois mais uma vez em 1 x PBS/ 50mM MgCl₂. As lâminas foram então fixadas por 10 minutos a temperatura ambiente em uma solução de 1% formaldeído/ 1 x PBS/ 50 mM MgCl₂ recém preparada. Posteriormente, foram lavadas em 1 x PBS e desidratadas através da incubação por 3 minutos em uma série de diluições de etanol (70%, 90% e 100%).

As lâminas foram então pré-aquecidas por 5 minutos a 70°C no forno de hibridação e imediatamente transferidas para uma solução já aquecida (70°C) de 70% formamida em 2 x SSC pH 7.0 e incubadas por 2 minutos a 70°C. Após essa incubação, foram imediatamente transferidas para uma nova série de diluições de etanol gelado (-20°C), e deixadas secar por 5 minutos em temperatura ambiente.

Em cada lâmina, foi adicionado 5 µl da solução do tubo 1 (após denaturação), uma lamínula de 22 x 22 mm foi colocada sobre ela e selada com *Rubber Cement* e, então, as lâminas foram incubadas em uma estufa umidificada por 36 horas a 37°C.

Após a incubação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas, lavadas três vezes, sob agitação, por cinco minutos em uma solução pré-aquecida (45°C) de 50% formamida em 2 × SSC e posteriormente lavadas por mais duas vezes em 1 x SSC sob as mesmas condições.

O reagente de bloqueio (80 µl) (tubo 2) foi aplicado sobre a lâmina, uma lamínula de 22 × 22 mm foi colocada sobre a mesma e as lâminas, incubadas por mais 30 minutos a 37°C em estufa umidificada. Após a incubação, 80 µl de anti-Digoxigenina (tubo 3) foram adicionados às lâminas, novas lamínulas foram colocadas sobre elas e as lâminas, novamente incubadas por 45 minutos sob as mesmas condições anteriores.

Terminada a incubação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes de cinco minutos em uma solução de 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 a 45°C, sob agitação. Oitenta microlitros de Cy5 e Cy5.5 (tubo 4) foram adicionados por lâmina, uma lamínula colocada sobre ela e estas incubadas por mais 45 minutos a 37°C em estufa umidificada. Novas lavagens com 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 foram feitas sob as mesmas condições acima descritas. Finalmente, 20 µl de uma solução de DAPI/*Antibleach* (tubo 5) foram adicionados às lâminas e lamínulas de 22 × 22 mm foram colocadas sobre as mesmas.

Para a análise, foi utilizado o *Spectra Cube* (ASI) no microscópio *Axioplan 2* (*Carl Zeiss, Inc. Canadá*) com uma objetiva 63×/1.4 *oil* e o *Case Data Manager 4.0 software* (ASI) para PC. Pelo menos 40 metáfases foram capturadas, sendo 20 examinadas para cada linhagem celular.

A média e o número de cada cromossomo foi observado e comparado entre as diferentes linhagens através da análise de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

Além disso, análises estatísticas utilizando os mesmos testes citados acima foram realizadas para a ocorrência de translocações, quebras e fusões de cromossomos. Valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significantes.

19. FISH centromérico em metáfases

Depois das imagens decorrentes da técnica de SKY serem capturadas e analisadas, as mesmas lâminas foram lavadas três vezes, por cinco minutos,

em 1xPBS sob agitação a temperatura ambiente, para remoção da marcação anterior e posterior hibridação com uma nova sonda. Neste experimento, foi utilizada uma sonda pan-centromérica murina conjugada com FITC para marcação dos centrômeros.

Após retirada a marcação do SKY, as lâminas foram lavadas a temperatura ambiente sob agitação em 1 × PBS/ 50mM MgCl₂ e então fixadas por 10 minutos a temperatura ambiente em uma solução recém preparada de 1% formaldeído/ 1 × PBS/ 50 mM MgCl₂. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em 1 × PBS e desidratadas através da incubação por 3 minutos em uma série de diluições de etanol (70%, 90% e 100%) e secas em temperatura ambiente.

As lâminas foram aquecidas a 70°C por 5 minutos no forno de hibridação e transferidas imediatamente para uma solução contendo 70% formamida/ 2 x SSC pH7.0 a 70°C e incubadas por dois minutos. Posteriormente, foram transferidas para uma nova série de diluições de etanol gelado (-20°C), e secas por 5 minutos em temperatura ambiente.

A sonda centromérica foi denaturada por 5 minutos a 95°C e depois mantida no gelo até que fosse utilizada. A sonda (20 µl) foi então aplicada às lâminas secas, lamínulas de 22 × 22 mm foram colocadas sobre as mesmas e seladas com *Rubber Cement*. As lâminas foram levadas à estufa umidificada e mantidas a 37°C por 16 horas.

Após a incubação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas, lavadas três vezes, sob agitação, por cinco minutos em uma solução pré-aquecida (45°C) de 50% formamida em 2 × SSC e, em seguida, lavadas por mais 3 vezes de cinco minutos em uma solução de 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 a 45°C, sob agitação.

Finalmente, foram adicionados 50 µl de uma solução 0.1 µg/ml de DAPI, o volume coberto por uma lâminula de 24 × 60 mm e as lâminas, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água deionizada, antifade foi aplicado à lâmina, novas lamínulas de 22 × 22 mm foram colocadas sobre a área de interesse as lâminas, levadas para captura e análise das imagens.

As imagens foram capturadas em um microscópio *Axioplan 2 (Carl Zeiss, Inc. Canadá)* com uma objetiva de 63×/1.4 *oil* e as mesmas metáfases

capturadas para a análise de SKY foram adquiridas para análise comparativa dos fragmentos encontrados. O intuito desse experimento foi confirmar que os cromossomos marcadores observados pela técnica de SKY eram cêntricos.

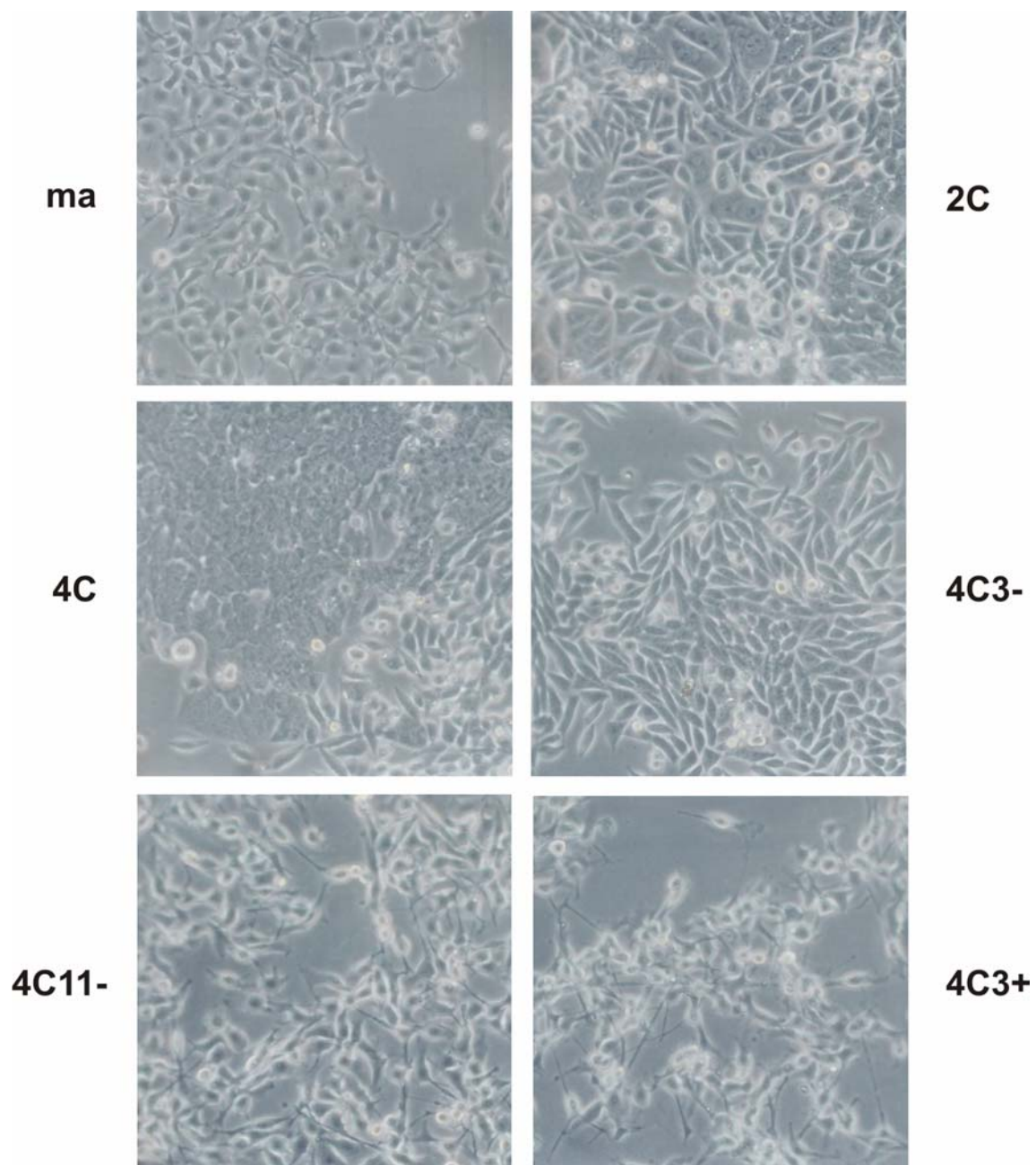
Resultados

1. Características do modelo

As linhagens celulares obtidas após os ciclos seqüenciais de impedimento de ancoragem da linhagem de melanócitos, melan-a, foram analisadas simultaneamente quanto à morfologia, taxa de proliferação *in vitro*, capacidade de formar tumores *in vivo* e capacidade metastática.

1.1 Morfologia das linhagens ao longo da transformação maligna.

Como observado na Figura 4, as linhagens 2C e 4C já apresentam modificações marcantes em sua morfologia, tendo um aspecto fusiforme, diferente da linhagem parental melan-a, que apresenta morfologia mais dendrítica. Essa morfologia apresentada pelas linhagens derivadas de melan-a muito se assemelha a das linhagens de melanoma 4C3- e 4C11-, a qual muda drasticamente quando comparada àquela apresentada pelas linhagens de melanoma 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5, de aspecto dendrítico e com menos pontos de adesão ao substrato, semelhante à apresentada pela linhagem de melanoma B16F10 (**Figura 6**).



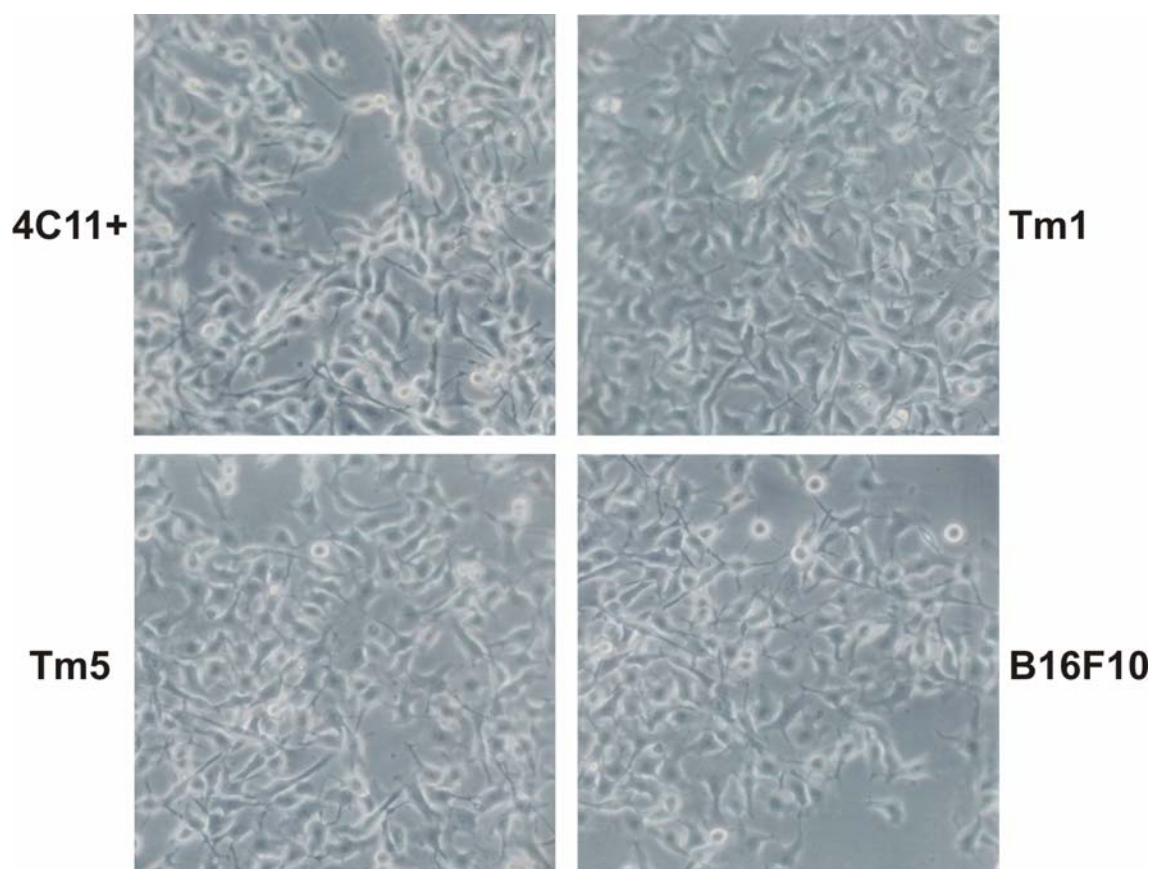


FIGURA 6. Morfologia dos melanócitos melan-a e das linhagens obtidas após ciclos sequenciais de bloqueio de ancoragem. As diferentes linhagens celulares foram cultivadas em placas plásticas de cultura em meio completo e fotomicrografadas utilizando microscópio invertido (Zeiss). As fotomicrografias foram obtidas em aumento de 20X. Três padrões morfológicos distintos são observados nestas linhagens: 1) melanócitos melan-a: padrão dendrítico com corpo celular bem espalhado na superfície da placa; 2) linhagens não tumorigênicas 2C e 4C e linhagens de melanoma de crescimento lento, 4C3- e 4C11-: padrão fibroblastóide com aspecto fusiforme e corpo celular bem espalhado na superfície da placa; 3) linhagens de melanoma de crescimento rápido, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: padrão dendrítico com corpo celular pouco aderido à superfície da placa. ma: melanócitos melan-a; 2C e 4C: melanócitos melan-a submetidos a 2 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem, respectivamente; 4C3- e 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma metastático; B16F10: linhagem estabelecida de melanoma metastático.

1.2 Análise da proliferação celular *in vitro* e tumorigenicidade *in vivo* da linhagem melan-a e suas derivadas.

Para avaliar o índice de proliferação das diferentes linhagens celulares do modelo, foi utilizado o método colorimétrico baseado na redução metabólica do corante tetrazólico amarelo solúvel (MTT). A linhagem de melanócitos melan-a não apresentou diferenças significativas em relação às linhagens 2C e 4C, em nenhum dos tempos estudados (24, 48, 72 e 96 horas), da mesma maneira que não houve diferença entre as taxas proliferativas das linhagens 2C e 4C. As linhagens de melanoma 4C3- e 4C11- apresentaram menor taxa de proliferação *in vitro* quando comparadas às linhagens 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 ($p < 0.05$). No entanto, a maior diferença foi encontrada quando comparamos as linhagens melan-a, 2C e 4C às linhagens 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 ($p < 0.001$) (**Figura 7**).

Além disso, ensaios de tumorigenicidade confirmaram que as linhagens melan-a, 2C e 4C não foram capazes de formar tumores, enquanto que as linhagens que apresentaram menor velocidade de proliferação *in vitro*, 4C3- e 4C11-, foram capazes de formar melanomas de crescimento lento após longos períodos de latência para seu aparecimento. Por outro lado, a inoculação das linhagens que apresentaram maior velocidade de proliferação *in vitro*, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5, resultou em tumores de crescimento bastante rápido, palpáveis após curto tempo de latência (**Figura 8**).

Estes dados mostraram que as linhagens tumorigênicas neste modelo murino de melanoma podem ser classificadas basicamente em dois grupos, onde as células 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 apresentam características de um fenótipo agressivo *in vivo*, enquanto que as células 4C3- e 4C11- se comportam como linhagens de melanomas indolentes.

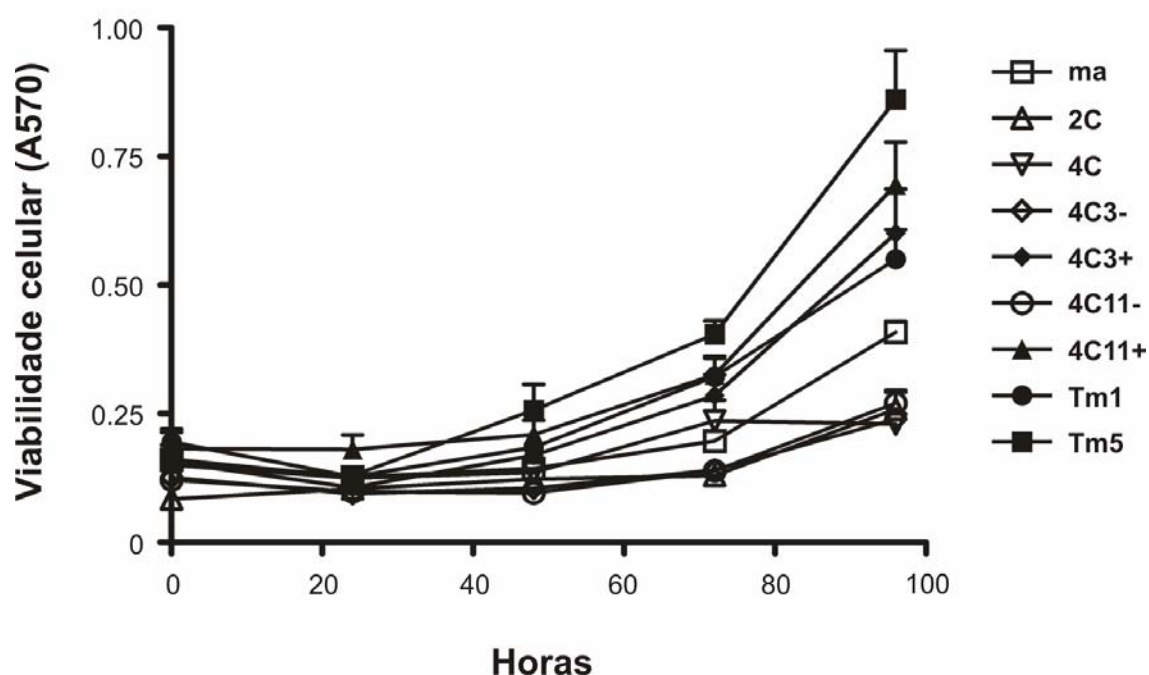


FIGURA 7. Proliferação celular *in vitro*. A taxa de proliferação das diferentes linhagens celulares utilizadas neste trabalho foi avaliada por ensaio de MTT. As linhagens celulares foram inicialmente cultivadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço/200 μ L de meio R5), sendo o número de células estimado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido (símbolos pretos). Os valores representam a média \pm o desvio padrão dos valores obtidos de sextuplicatas.

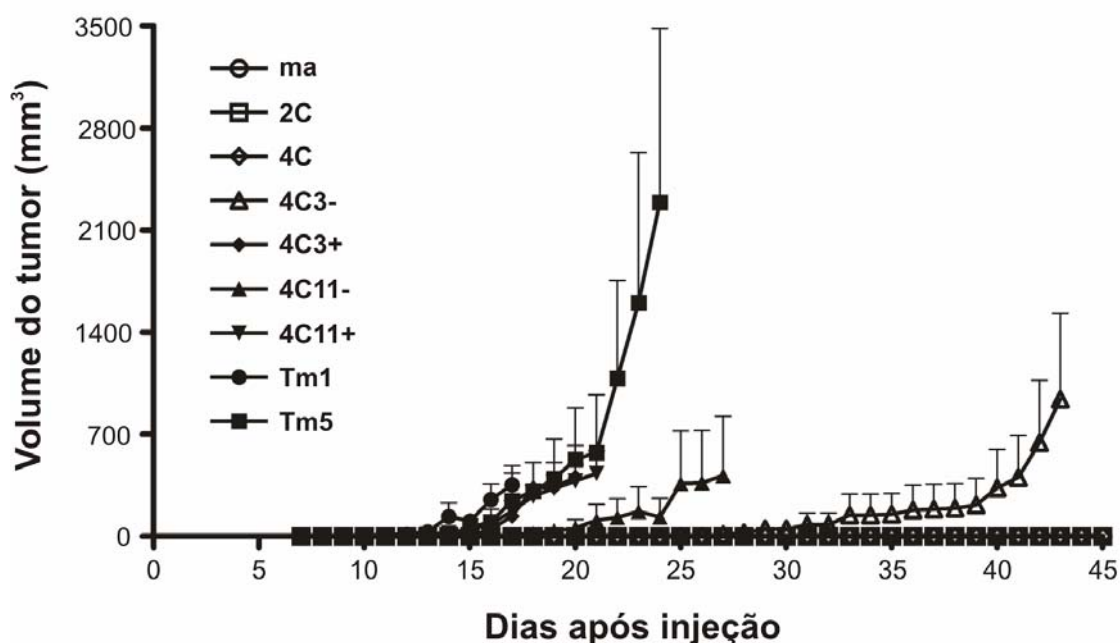


FIGURA 8. Tumorigenicidade *in vivo* das linhagens derivadas dos melanócitos melan-a. A capacidade das diferentes linhagens celulares derivadas de melan-a de formar tumores *in vivo* foi avaliada pela inoculação de 10^6 células no tecido subcutâneo do dorso direito de camundongos fêmeas singenéticos C57BL/6. Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de tumores palpáveis. O volume dos tumores foi calculado pela fórmula $[(\text{menor diâmetro})^2 \times \text{maior diâmetro}]/2$. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido. Os valores representam a média \pm o desvio padrão dos valores obtidos de um grupo de cinco animais.

1.3 Análise da capacidade metastática das linhagens de melanoma obtidas a partir da linhagem de melan-a.

As diferenças nos tempos de latência e velocidade de crescimento tumoral encontradas entre as diferentes linhagens de melanoma do modelo nos levaram a investigar a capacidade metastática dessas células. Para isso, 2×10^5 células das linhagens 4C3- e 4C3+ foram inoculadas por via intravenosa em camundongos C57Bl6. Cada grupo experimental consistiu de cinco animais. Após 20 dias, os pulmões dos camundongos inoculados foram retirados para verificar a existência de focos metastáticos. Todos os animais inoculados com 4C3+ apresentaram focos metastáticos em seus pulmões e pericárdios (**Figura 7A**). No entanto, nenhum animal inoculado com a linhagem 4C3- apresentou focos metastáticos durante após este período. Em seguida, outros quatro grupos experimentais foram inoculados novamente com a linhagem 4C3-. Os animais desses grupos foram sacrificados após 20, 40, 60 e 80 dias para verificar a possibilidade de uma metastatização mais tardia dessa linhagem, mas mesmo após 80 dias da inoculação, nenhum animal apresentou focos metastáticos em seus pulmões (**Figura 9B, C e D**).

Experimentos anteriores mostravam dados similares para as demais linhagens do modelo, onde as linhagens que apresentavam crescimento tumoral mais rápido *in vivo* apresentavam capacidade de metastatizar (4C11+, Tm1 e Tm5), enquanto que aquela que apresentava uma velocidade mais lenta não (4C11-).

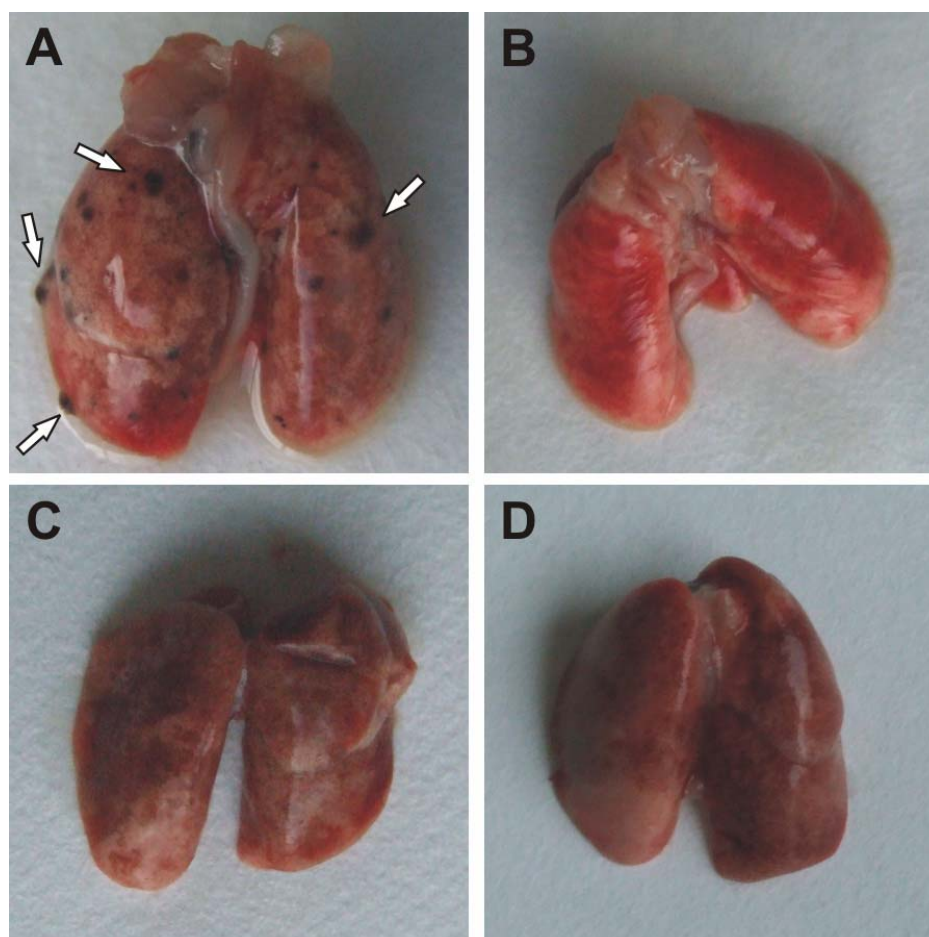


FIGURA 9 - Ensaio de metástase experimental. Inóculos de 2×10^5 células 4C3+ (A) e 4C3- (B, C e D) foram injetados via veia da cauda em camundongos fêmeas C57Bl6. Os animais foram sacrificados 20 (A and B), 40 (C) e 80 (D) dias depois da inoculação. Os pulmões foram removidos e focos metastáticos foram identificados – alguns estão indicados por setas brancas no painel.

2. Evolução cariotípica no modelo experimental de melanoma

Com base nas mudanças fenotípicas e no aumento da agressividade encontrada ao longo do modelo de transformação de melanócitos, decidimos avaliar o cariótipo destas linhagens e verificar possíveis alterações cromossômicas relacionadas às características fenotípicas já encontradas. A técnica de cariótipo espectral (SKY) foi então realizada para melan-a e todas suas sublinhagens (**Figura 10**).

Os tipos e frequências de aberrações cromossômicas espontâneas foram examinados em pelo menos 20 metáfases e estão descritos na **Tabela 2**. A mediana da ploidia de todas as linhagens celulares também está descrita na **Tabela 2**. Um aumento no número individual de cromossomos foi observado durante a transformação maligna e está mostrado na **Tabela 3**.

A célula parental melan-a está próxima a triploidia com uma média de 54 cromossomos por núcleo celular, o que provavelmente foi consequência do tempo em cultura (passagem 60), uma vez que esta linhagem celular foi descrita pela primeira vez como apresentando cariótipo normal diplóide (Bennett et al, 1987). É importante ressaltar que a linhagem de melanócitos melan-a, apesar de não apresentar cariótipo diplóide normal nesta análise, também não apresentou nenhum tipo de alteração cromossômica estrutural.

Todas as demais linhagens, mesmo as não tumorigênicas, apresentaram alterações estruturais, como mostrado nas **Figuras 10, 11A e Tabela 2**.

Correlações entre as mudanças no cariótipo e o fenótipo foram observadas. Determinados rearranjos são mantidos entre as linhagens celulares não tumorigênicas (2C e 4C) e os melanomas não metastáticos (4C3- e 4C11-) como, por exemplo, T(8;14), T(14;8) e Fus(8,6). O fenótipo tumorigênico coincide com o surgimento da translocação T(X,15), comum entre as linhagens 4C3- e 4C11-.

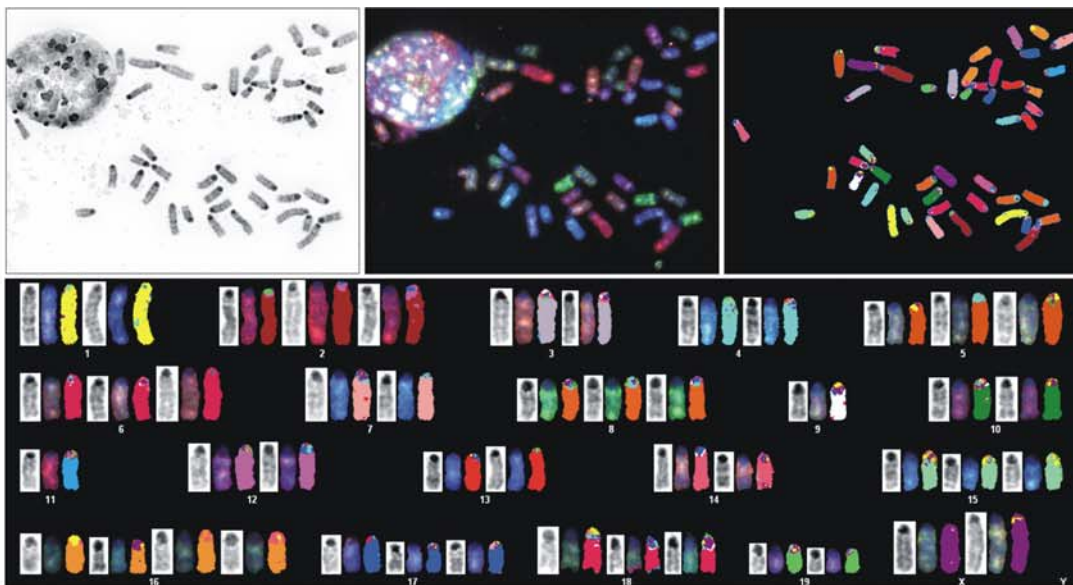
A manutenção de determinados rearranjos ao longo da transformação também acontece entre os melanomas metastáticos (4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5), mesmo com cariótipos mais complexos, indicativo de que uma maior instabilidade ocorre nessas células. Estas linhagens ainda apresentam

determinados rearranjos em comum, entre eles translocações Robertsonianas envolvendo os cromossomos 8 e 12 (**Tabela 2 e 4 e Figura 11B**). Além do aumento significativo no número de aberrações estruturais, um aumento significativo da ploidia celular foi também observado nas linhagens de melanoma metastático ($p < 0,001$) (**Figura 11C**).

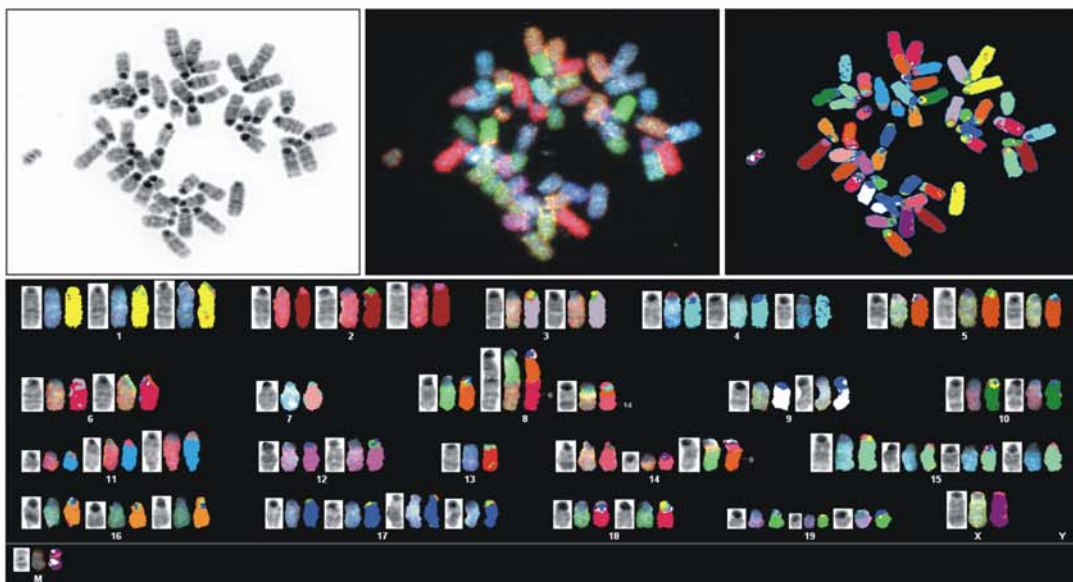
Diferenças nos tipos de aberrações estruturais também foram notadas ao longo da progressão. Enquanto nas linhagens não tumorigênicas e nos melanomas indolentes prevaleciam translocações recíprocas e fusões, nas linhagens metastáticas as translocações robertsonianas caracterizaram o fenótipo (**Tabela 2**).

Além de alterações cromossômicas como translocações e fusões, a presença constante de estruturas marcadoras entre as linhagens. Estas estruturas estavam presentes em todas as linhagens, sendo mais numerosas nas linhagens de melanoma indolentes e quase desaparecendo nas linhagens tumorigênicas (**Tabela 2**), além disso, quando analisadas por banda G reversa apresentavam características de heterocromatina, sugerindo uma origem centromérica que mais tarde foi confirmada por FISH (**Figura 12**).

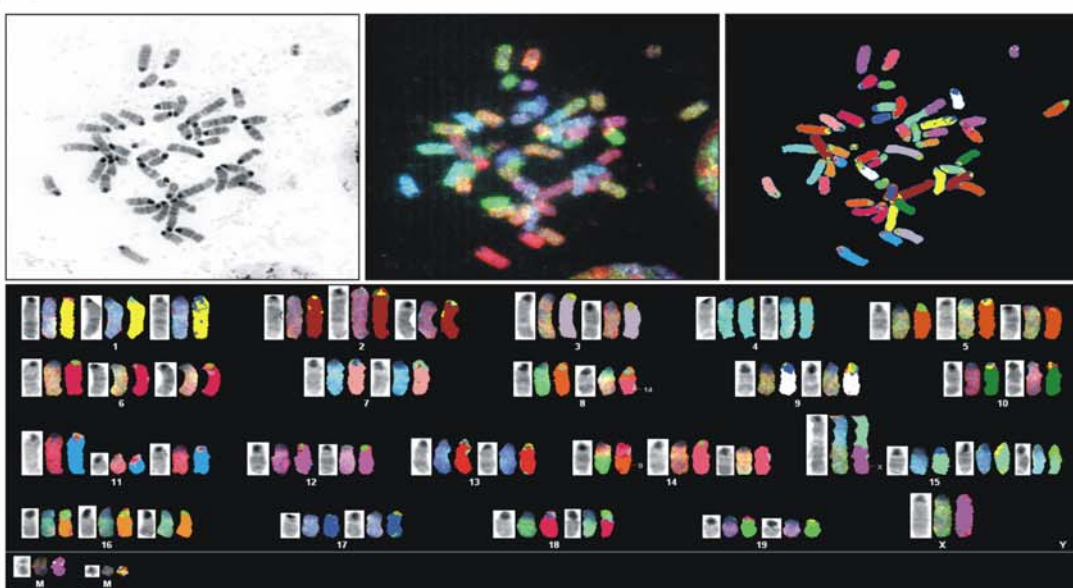
melan-a



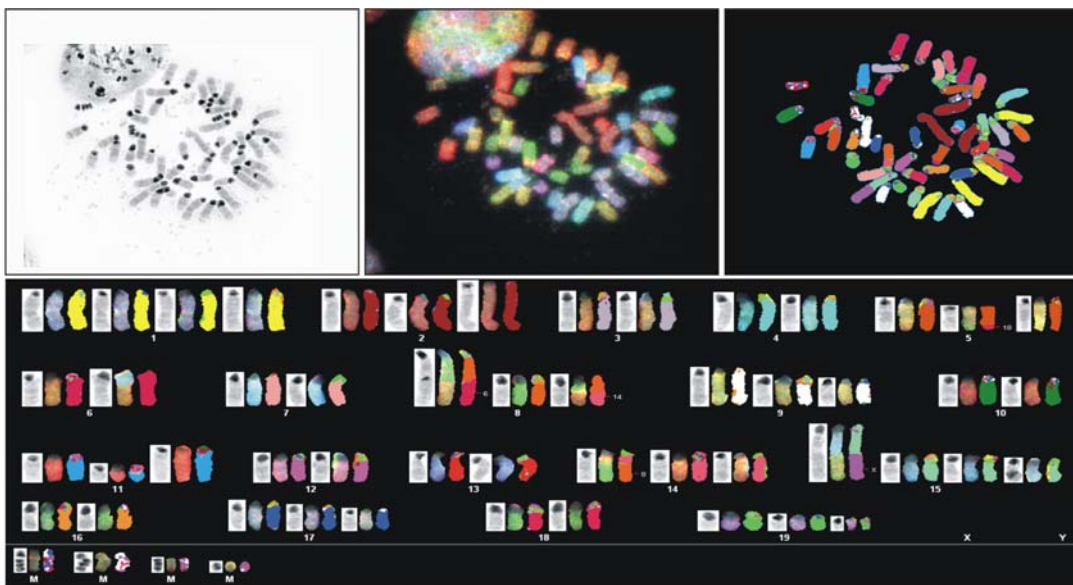
2C



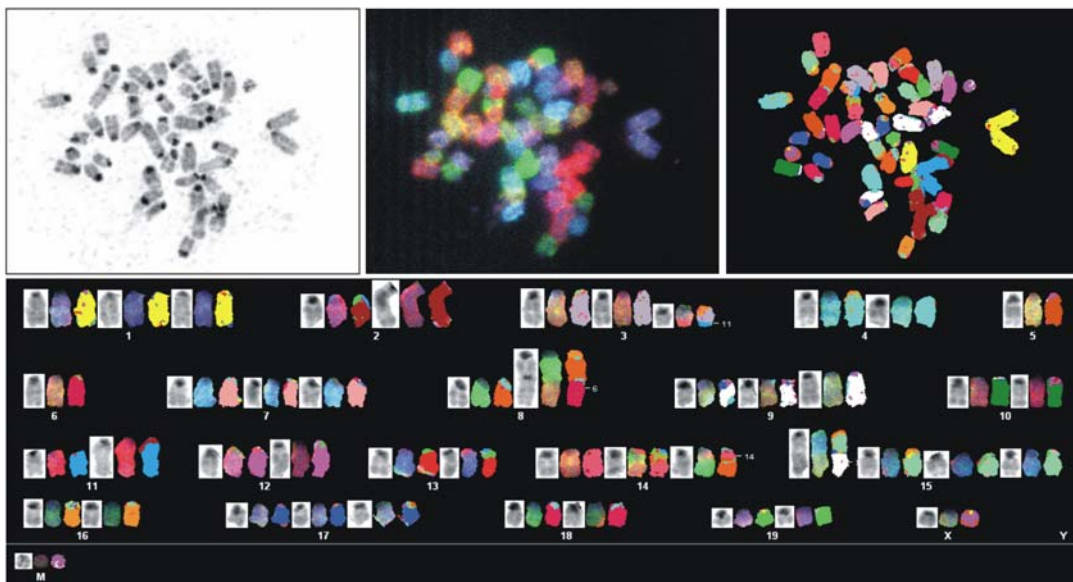
4C



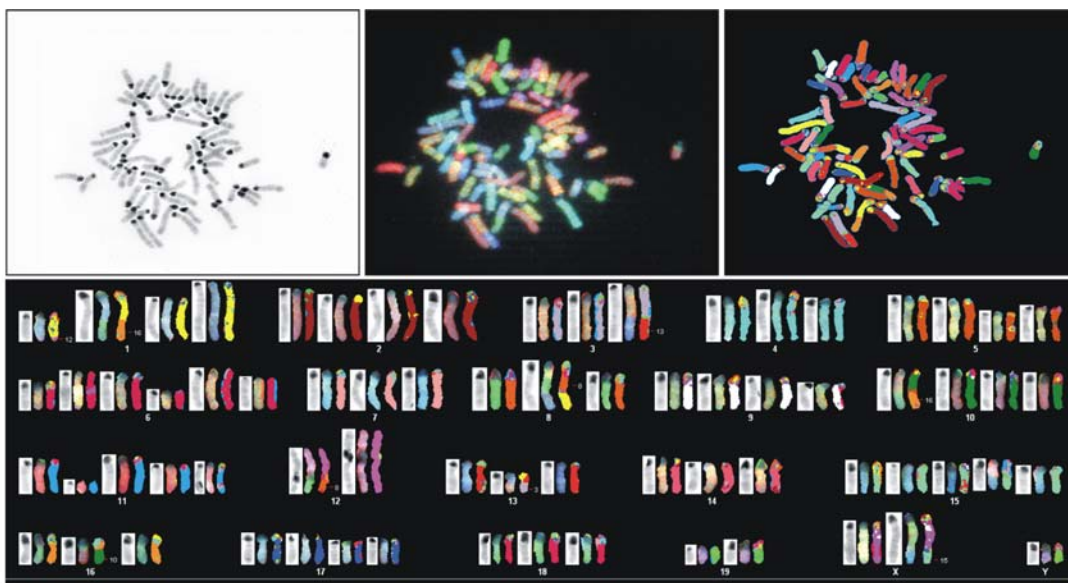
4C3-



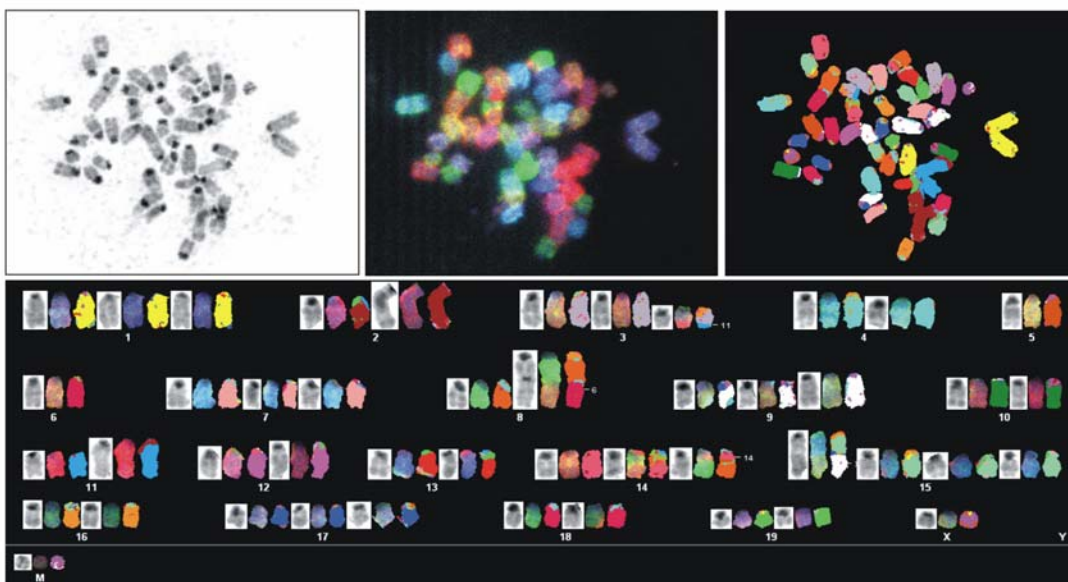
4C11-



4C3+



4C11+



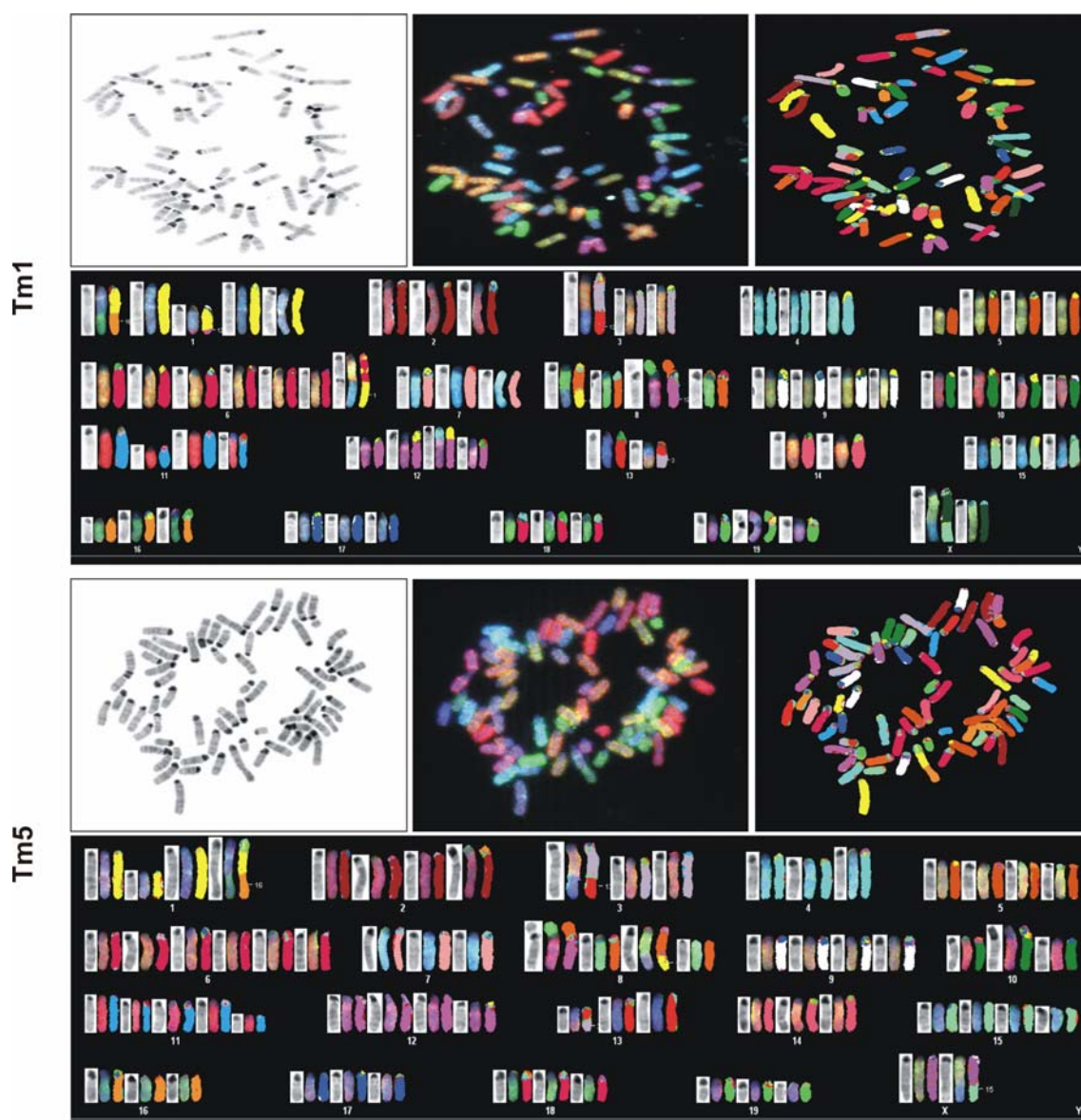


FIGURA 10 – Evolução cariotípica – Imagens representativas da técnica de SKY para cada uma das linhagens celulares do modelo. Note o aumento no número de anormalidades cromossômicas durante a progressão tumoral no modelo e o aumento no número de cromossomos a partir da linhagem 4C3+. Painel esquerdo: banda DAPI invertida; painel central: imagem espectral; painel direito: imagem com cores classificatórias determinadas pelo software de análise SKYView e painel maior: cariótipo espectral. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

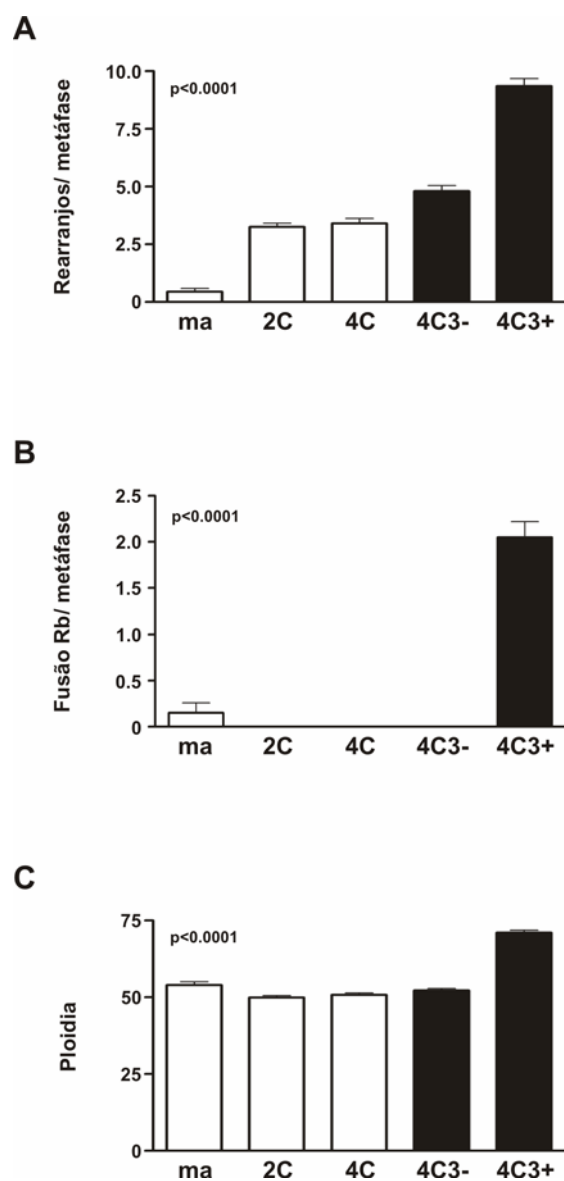


FIGURA 11 – Rearranjos cromossômicos. Um total de 20 metáfases foi examinado para cada linhagem celular. A: Número de rearranjos encontrados em cada linhagem celular por metáfase; B: Número de translocações Robertsonianas encontrados por metáfase do modelo de melanoma; C: Variação na ploidia encontrada durante a progressão tumoral no modelo. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma de crescimento rápido.

Tabela 2. Sumário dos rearranjos encontrados no modelo de melanoma.

Linhagem celular	Número de cromossomos*	Fragmentos centroméricos**	Aberrações estruturais
melan-a	54	sim [21]	nenhuma
2C	51	sim [24]	T(8;14)[13] / T(14;8)[20] / F(8;6)[19] / Del(11)[18]
4C	51	sim [31]	T(8;14)[19] / T(14;8)[21] / T(15;X)[18] / F(8;6)[4] / Del(11)[18]
4C3-	53	sim [51]	T(8;14)[18] / T(14;8)[21] / T(5;18)[9] / T(15;X)[18] / F(8;6)[15] / Del(11)[17]
4C11-	51	sim [31]	T(8;14)[13] / T(14;8)[14] / T(7;X)[6] / T(15;X)[11] / F(8;6)[19] / Del(11)[16]
4C3+	72	sim [8]	T(1;16)[18] / T(8;1)[17] / T(1;12)[15] / T(3;13)[20] / T(13;3)[20] / T(X;15)[19] / T(10;16)[16] / Rob(8.12)[15] / Rob(12.12)[26] / Del(1)[18] / Del(6)[12] / Del(11)[20]
4C11+	70	sim [5]	T(1;16)[19] / T(8;1)[20] / T(1;12)[10] / T(3;13)[19] / T(13;3)[15] / T(X;15)[15] / Rob(8.12)[14] / Rob(12.12)[30] / Del(1)[18] / Del(11)[16]
Tm1	71	não	T(1;16)[19] / T(8;1)[18] / T(1;12)[14] / T(3;13)[19] / T(13;3)[18] / T(X;15)[16] / F(6;15)[14] / Rob(8.12)[13] / Rob(12.12)[18] / Rob(19.19)[16] / Del(1)[18] / Del(11)[17] / Del(8)[6] / Del(6)[6]
Tm5	69	sim [3]	T(1;16)[14] / T(8;1)[17] / T(1;12)[7] / T(3;13)[19] / T(13;3)[17] / T(X;15)[15] / Rob(8.12)[13] / Rob(12.12)[30] / Del(1)[18] / Del(11)[16]

Os dados acima são derivados da análise de 20 metáfases. Os colchetes indicam o número de vezes que determinado rearranjo foi visto no total de 20 metáfases. Somente rearranjos encontrados mais de duas vezes estão descritos na tabela. * Média do número de cromossomos de 20 metáfases. ** Ausência ou presença de fragmentos centroméricos nas metáfases. Os colchetes indicam o número de fragmentos encontrados na análise. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

Tabela 3. Aumento do número individual de cromossomos no modelo de melanoma

Cromossomo	Ma	2C	4C	4C3-	4C11-	4C3+	4C11+	Tm1	Tm5
1	2	3	4	4	4	5	4	5	5
2	3	3	3	3	3	4	4	3	3
3	2	2	2	2	2	3	3	3	3
4	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	4	4	4	4
6	4	3	3	3	2	6	6	7	6
7	2	2	2	2	3	3	3	3	3
8	3	3	2	3	3	4	4	4	4
9	2	2	2	2	2	4	4	4	4
10	2	2	2	2	2	4	4	4	4
11	2	3	3	3	3	5	5	5	5
12	2	2	2	2	2	5	4	4	4
13	2	2	2	2	2	3	3	3	3
14	3	3	3	3	3	3	3	3	4
15	3	4	4	4	4	4	4	3	4
16	4	3	3	2	2	3	3	3	3
17	3	3	3	3	3	4	4	4	4
18	3	2	2	2	2	3	3	3	3
19	4	2	2	3	3	3	3	3	3
X	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os números apresentados correspondem à mediana da análise de 20 metáfases. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

Tabela 4 – Resumo dos cromossomos envolvidos na formação translocações Robertsonianas nas linhagens metastáticas do modelo de melanoma.

Linhagem celular	cromossomo	Número de vezes envolvidos em		P
		cromossomos Rob		
4C3+	8	15	<0.01	
	12	67	<0.001	
4C11+	8	14	<0.01	
	12	74	<0.001	
Tm1	8	13	<0.01	
	12	49	<0.001	
	19	32	<0.001	
Tm5	8	13	<0.01	
	12	73	<0.001	

Os números apresentados são derivados da análise de 20 metáfases. Toda as metáfases carregavam pelo menos uma translocação Robertsoniana. O envolvimento de cada cromossomo na formação de translocações Robertsonianas é indicado, assim como sua respectiva significância. 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

3. Instabilidade e fragmentação centromérica

Para confirmar a origem dos marcadores observados por SKY, uma sonda centromérica específica para camundongo foi utilizada sob as mesmas lâminas utilizadas anteriormente na análise de SKY. Desta maneira, foi possível obter imagens das mesmas metáfases capturadas anteriormente e então confirmar como centroméricos os marcadores cromossômicos.

A linhagem 4C3- foi escolhida para este experimento por apresentar o maior número de fragmentos centroméricos por metáfase. A figura 9 mostra o resultado do FISH centromérico. É possível visualizar o marcador sob a fluorescência DAPI (**Figura 12A**), e a marcação centromérica sob a fluorescência FITC (**Figura 12B**).

Apesar de presente em praticamente todas as linhagens (com exceção da linhagem Tm1), o número de fragmentos centroméricos aumentava ao longo da transformação maligna, das linhagens não tumorigênicas aos melanomas indolentes, tornando-se insignificante nos melanomas metastáticos ($p < 0,0001$) (**Figura 12C**).

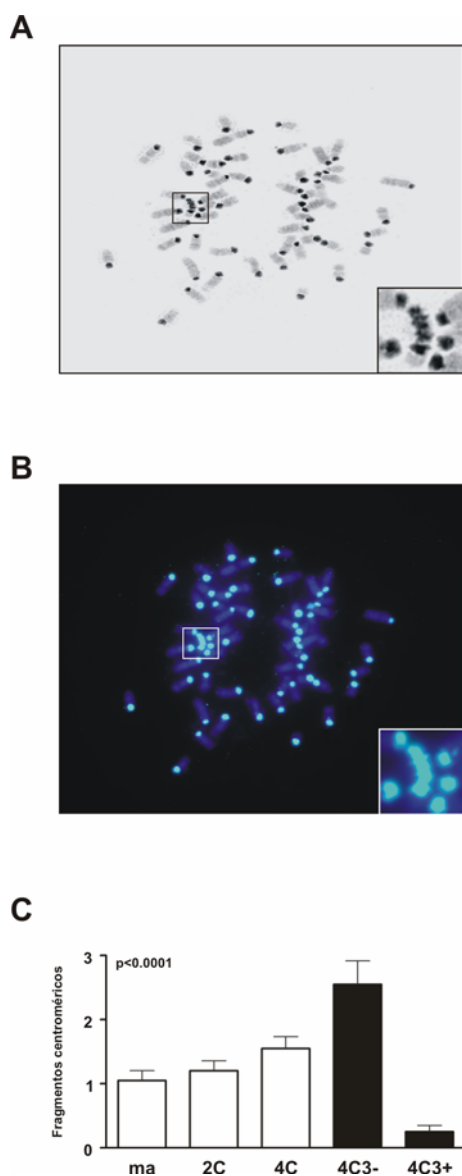


FIGURA 12 – Fragmentação centromérica – Cromossomos multicêntricos e fragmentos centroméricos identificados por FISH. Metáfases da linhagem celular 4C3- foram hibridadas usando uma sonda pan-centromérica específica para camundongo conjugada com FITC (verde) (Cambio, UK). A: DAPI invertido; B: sonda centromérica. Os quadrados brancos mostram os fragmentos centroméricos. C: número de fragmentos centroméricos encontrados nas diferentes linhagens celulares. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma de crescimento rápido.

4. Avaliação do perfil telomérico no modelo de transformação maligna de melanócitos

O encurtamento telomérico crítico, assim como defeitos na funcionalidade destas estruturas podem gerar instabilidade genética através dos ciclos de quebra, fusão e ponte cromossômico. Estes ciclos iniciam-se com a fusão terminal das cromátides irmãs, que formam uma ponte e posteriormente se fragmentam com a separação dos centrômeros. Desta forma, uma das células filhas adquire um cromossomo com duplicação final, enquanto a outra fica com uma deleção terminal. Em decorrência da falta de telômeros, nas próximas divisões as cromátides continuam se fundindo e se fragmentando, a não ser que as cromátides adquiram novos telômeros, tornando-se novamente estáveis (Murnane, 2006). Sendo assim, decidimos avaliar o status telomérico das linhagens celulares estudadas e verificar o papel dos telômeros na evolução cariotípica identificada durante a progressão tumoral em nosso modelo. Foram analisados o tamanho telomérico, a atividade da enzima telomerase e a expressão do gene *Tert* na linhagem parental melan-a e suas linhagens derivadas. Somente as linhagens melan-a, 2C, 4C, 4C3- e 4C3+ foram avaliadas.

4.1 Diminuição no tamanho absoluto e variabilidade do comprimento telomérico ao longo do modelo de transformação maligna de melanócitos.

Para analisar o status telomérico das diferentes linhagens no nosso modelo de melanoma, foi utilizada a técnica de hibridação fluorescente *in situ* quantitativa (Q-FISH). Um total de 30 núcleos interfásicos, fixados de maneira a preservar sua integridade estrutural, foram analisados para cada linhagem celular.

Foi observada progressiva redução do tamanho telomérico cada vez que ciclos de impedimento de ancoragem ao substrato eram realizados. Ou seja, à medida que as células avançavam em direção a um fenótipo maligno, seus telômeros eram encurtados (**Figura 13A**). A linhagem celular imortalizada,

melan-a, e as linhagens celulares não tumorigênicas (2C, 4C) mostraram grande variação no tamanho telomérico e um tamanho absoluto maior em comparação às linhagens tumorigênicas (4C3- e 4C3+), onde a variação assim como o tamanho absoluto eram menores. Em comparação com a linhagem parental (melan-a), a variação no comprimento telomérico foi significativa quando comparado às linhagens 2C ($P < 0,0005$), 4C ($P < 0,009$), 4C3- e 4C3+ ($P < 0,0001$). Em todos os casos, as diferenças no comprimento telomérico em relação à linhagem celular de melanoma metastático (4C3+) foram altamente significativas ($P < 0,0001$).

Considerando que existiam diferenças entre as linhagens quanto ao comprimento telomérico, decidimos avaliar a atividade da enzima telomerase no modelo. Todas as linhagens celulares apresentaram atividade da telomerase, como mostrado pelo ensaio TRAP (**Figura 13B**). Devido à má resolução deste ensaio, utilizamos a quantificação do gene *Tert* por RT-PCR para avaliar possíveis diferenças nos níveis de expressão da telomerase no modelo. Embora indireta, a quantificação da subunidade *Tert* tem sido sugerida como um indicador da atividade da telomerase, uma vez que a transcrição deste gene parece ser o principal fator limitante da atividade desta enzima.

O nível de expressão do gene *Tert* foi quantificado para todas as linhagens celulares envolvidas neste estudo e nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as linhagens (**Figura 13C**).

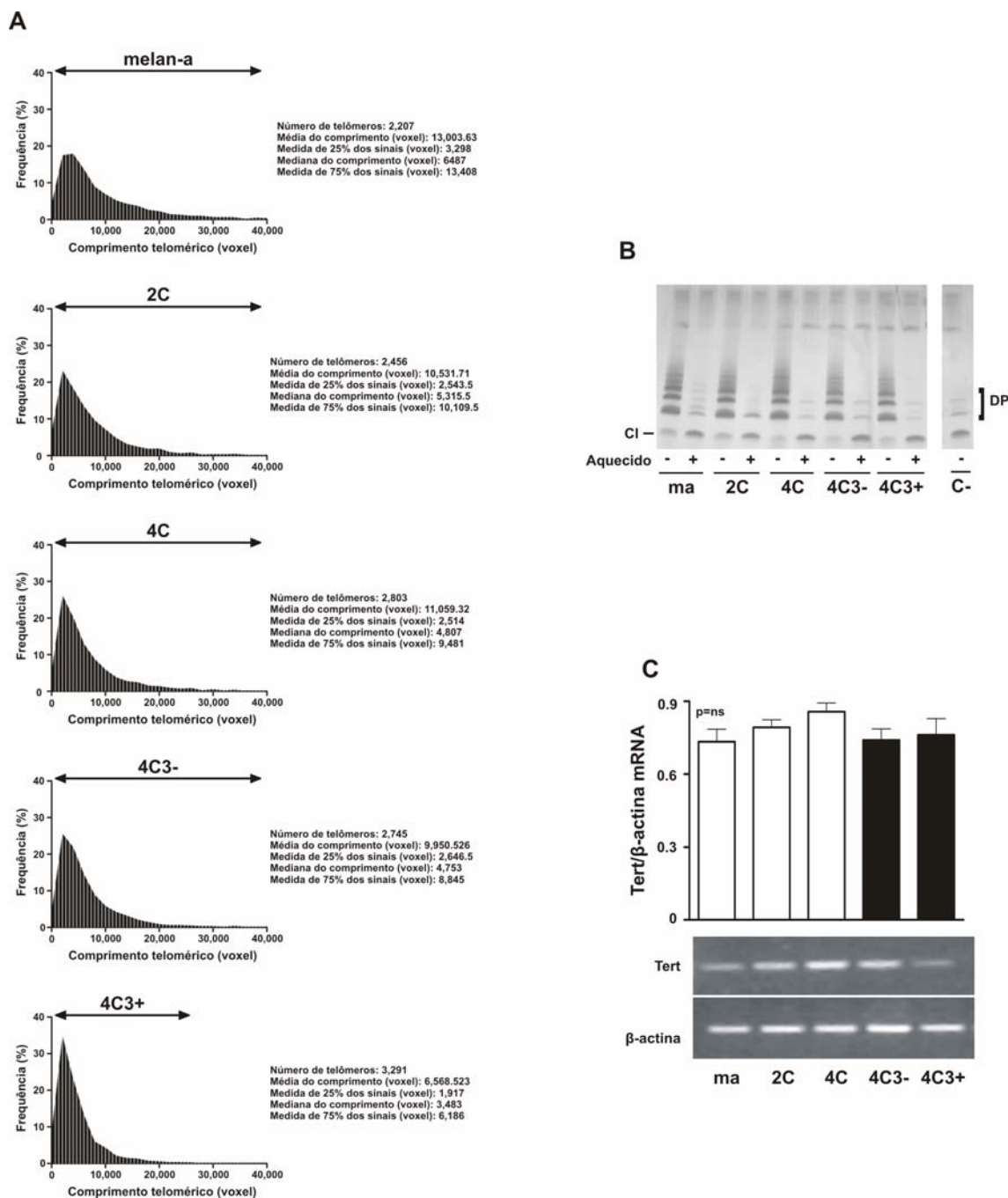


FIGURA 13 – Encurtamento telomérico na presença de telomerase – A: Distribuição dos tamanhos dos telômeros nas diferentes linhagens do modelo determinada por Q-FISH. As linhas verticais e as setas indicam diminuição da heterogeneidade dos comprimentos teloméricos através do modelo de transformação de melanócitos. B: Atividade da telomerase no modelo determinada pelo ensaio TRAP. (-) extrato celular não aquecido, (+) extrato celular aquecido, CI: controle interno da PCR, C-: controle negativo e DP: dímeros de primer. C: Expressão de Tert analisada em melan-a e suas linhagens derivadas por RT-PCR, a expressão da β -actina foi usada como controle de normalização. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a 2 e 4 ciclos de bloqueio de adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática.

4.2 Análise da perda completa de seqüências teloméricas.

Além do encurtamento telomérico, outra característica de células com disfunção telomérica é a perda completa das seqüências dos telômeros. A fim de analisar possíveis perdas teloméricas durante o modelo de progressão, foi realizada a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), utilizando uma sonda telomérica em lâminas preparadas com células em metáfase. Como controle normal, utilizamos fibroblastos de rato T38Ha procedentes de cultura primária onde praticamente 100% dos cromossomos analisados apresentavam quatro sinais distintos em suas extremidades. O experimento foi realizado também nas células melan-a e nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+ (**Figura 14**).

Todas as linhagens tumorigênicas exibiram acentuada perda de sinais teloméricos, quando comparados ao controle normal ($p < 0,0001$). O maior número de extremidades livres de sinal foi observado na linhagem 4C3+, onde mais de 30% das extremidades não apresentava sinal telomérico detectável ($p < 0,001$). A linhagem tumorigênica 4C3-, por sua vez, mostrou perda de sinais em 15% ($p < 0,001$) de todas as extremidades e a linhagem parental melan-a mostrou extremidades livres de sinais em 9% dos potenciais sítios teloméricos ($p < 0,05$).

Os fragmentos centroméricos identificados anteriormente por FISH e SKY são também visíveis por esta técnica e alguns deles aparecem como mini cromossomos contendo quatro sinais teloméricos nas pontas (**Figura 14 G, H, I**) e são provavelmente resultado de fusão e quebra de centrômeros de cromossomos distintos. Por outro lado, nenhum sinal telomérico foi observado sob o ponto de fusão cêntrico das translocações Robertsonianas (Rob) (**Figura 14 J, K, L**).

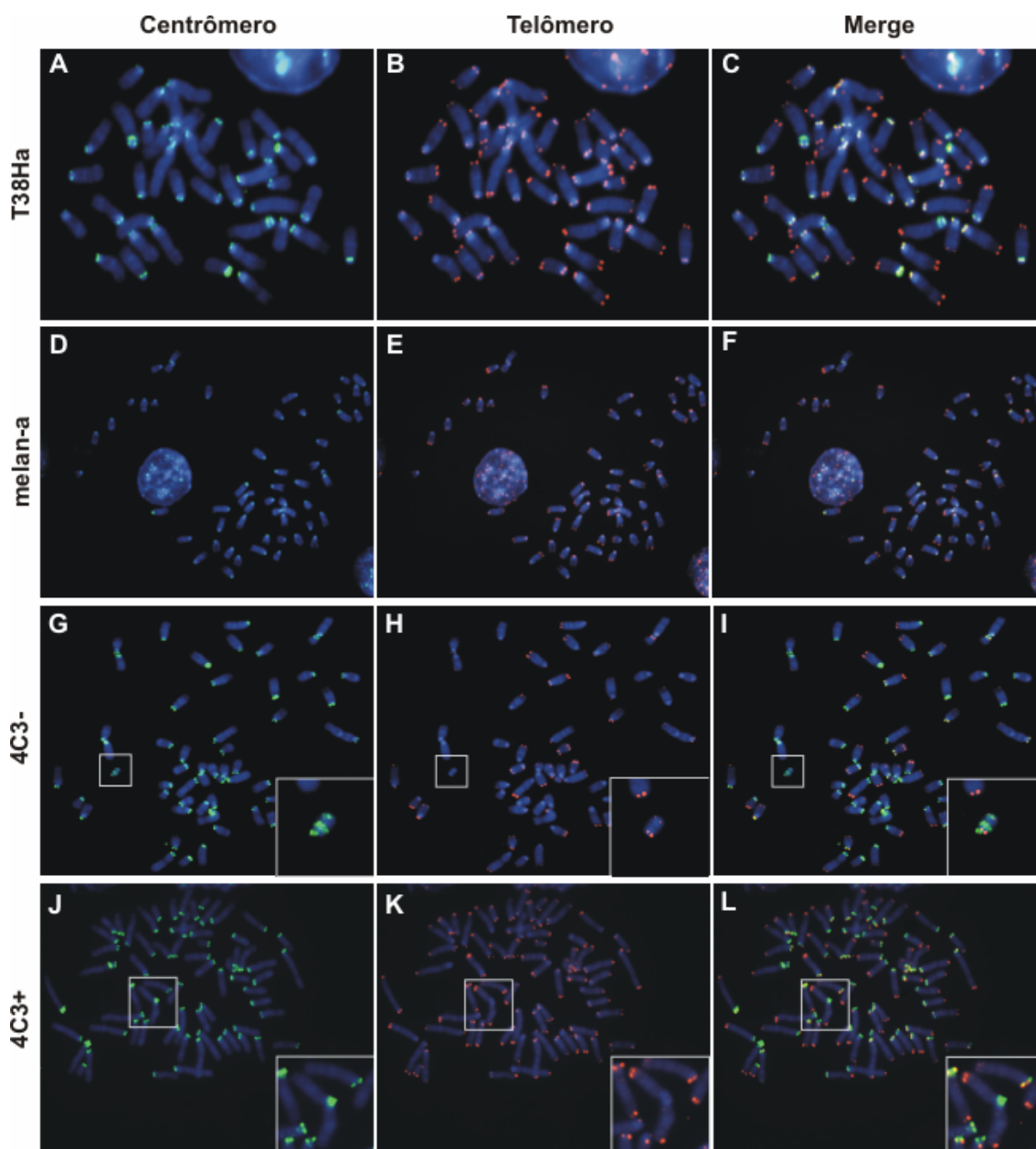


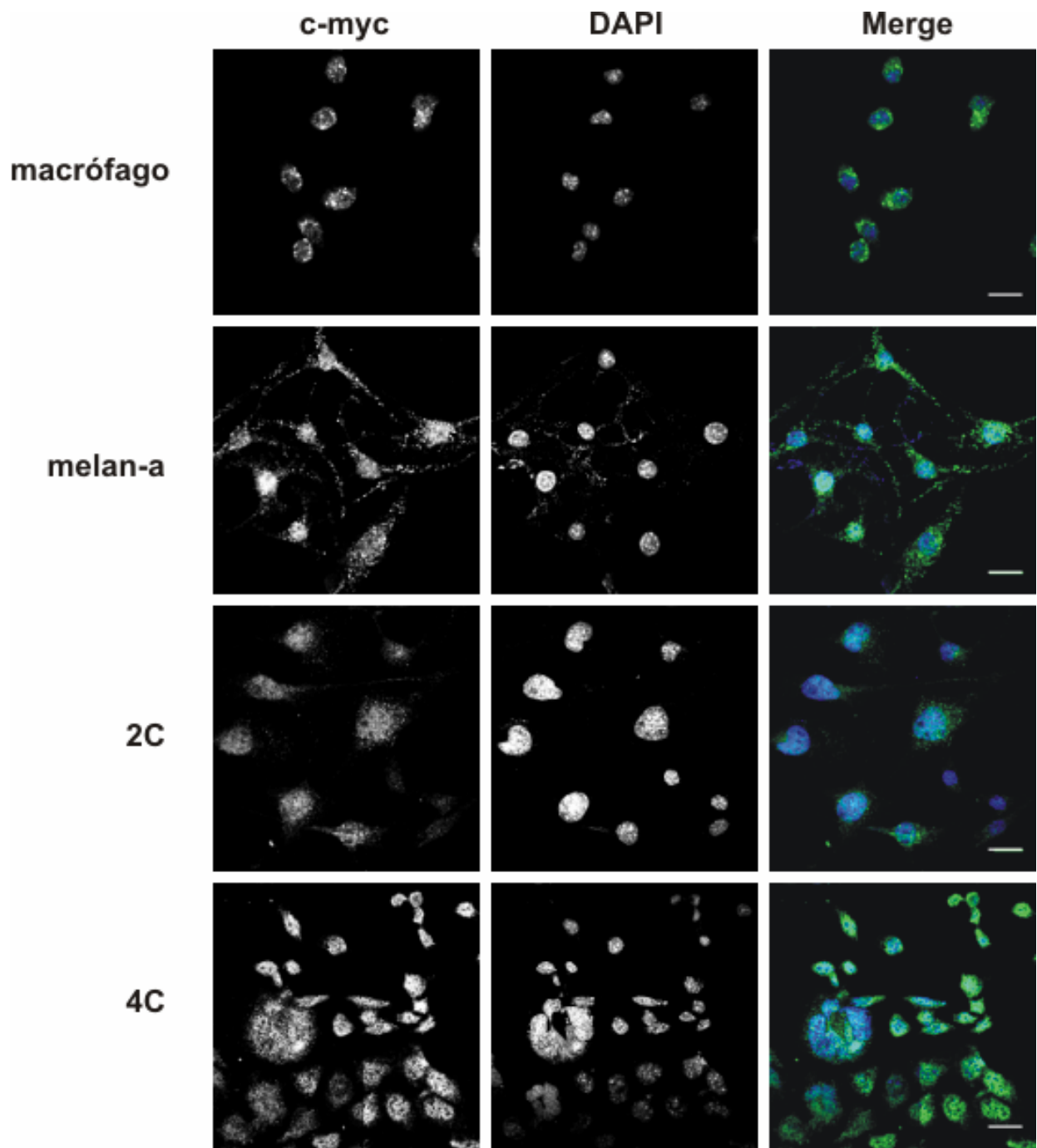
FIGURA 14 – Translocações robertsonianas e outras anormalidades centroméricas – Imagens representativas de fibroblastos normais de camundongos T38Ha e das linhagens celulares melan-a, 4C3- e 4C3+. Células em metáfases hibridadas com sondas contra seqüências centroméricas e teloméricas. Nos painéis G, H e I, está representada a linhagem celular 4C3-. Note os fragmentos centroméricos na imagem ampliada no canto direito inferior do painel G e os quatro sinais teloméricos no inserto do painel H. Nos painéis J, K e L, são mostradas metáfases representativas da linhagem 4C3+. Uma translocação robertsoniana é mostrada no inserto do painel J. Atenção ao fato de que sob o ponto de fusão centromérico não há nenhum sinal telomérico. Note que em todas as linhagens celulares existem cromossomos com ausência de sinais teloméricos nas terminações dos cromossomos, mas a linhagem 4C3+ apresenta a maior porcentagem de cromossomos com esta característica. T38Ha: fibroblastos normais de camundongos T38Ha; melan-a: células melan-a; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática.

4. Expressão de c-Myc é desregulada no modelo de melanoma

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a expressão anormal do gene c-Myc induz rearranjos cromossômicos e agregações teloméricas através da remodelação do núcleo interfásico das células (Louis e col., 2005; Mai & Garini, 2005; Caporali e col., 2007), e também sugerem que o modo de ação pelo qual tais rearranjos são estabelecidos envolve a regulação do complexo protéico que protege e envolve os telômeros (Louis e col., 2005). Além disso, sugerimos que c-Myc medeia a formação de translocações robertsonianas em células murinas através da promoção de fusões teloméricas (Guffei e col., 2007). A expressão constitutiva do gene c-Myc devido a translocações cromossômicas, mutação ou amplificação contribui para o desenvolvimento e progressão de muitos cânceres (Nesbit e col., 1999; Potter & Marku, 1997; Kuttler & Mai, 2006). É sabido que 70% dos cânceres humanos mostram expressão desregulada deste gene, o que coloca c-Myc entre os mais importantes proto-oncogenes humanos (Kuttler & Mai, 2006).

Em nosso estudo, todas as células estudadas apresentaram expressão constitutiva deste gene, representada pela marcação nuclear nos ensaios de imunofluorescência com anticorpo anti-c-Myc em células não sincronizadas. Este tipo de marcação é um indicativo de expressão aberrante de c-Myc, uma vez que este gene é expresso de maneira transiente ao longo do ciclo celular de células normais (**Figura 15**) (Kuttler & Mai, 2006).

Embora exista expressão aberrante da proteína c-Myc nas linhagens que compõe o nosso modelo, aparentemente o mecanismo responsável pelos rearranjos cromossômicos encontrados em nossas células difere daquele descrito anteriormente pelo nosso grupo (Guffei e col., 2007).



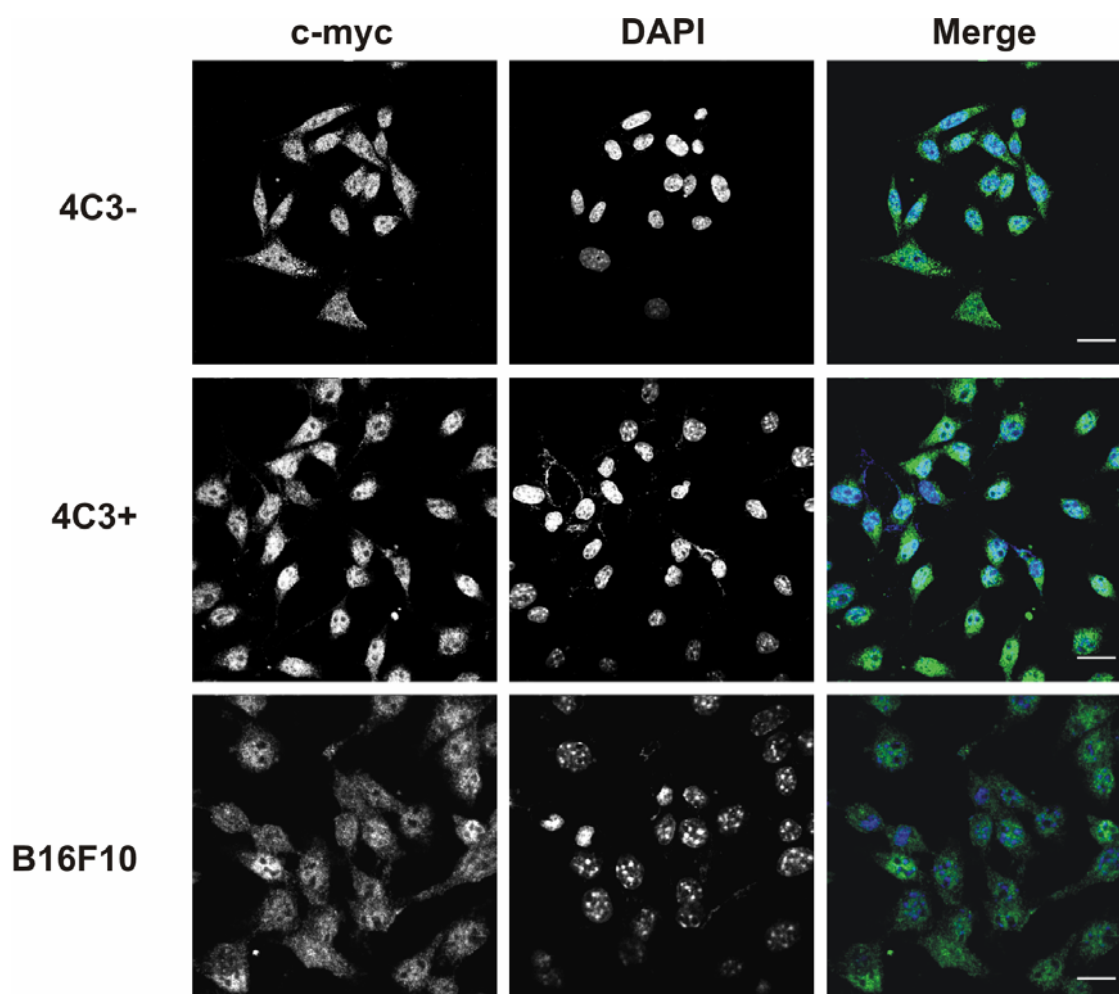


FIGURA 15 – Expressão de c-Myc. Cada painel mostra uma imagem representativa para cada linhagem celular. Coluna da esquerda: marcação da proteína c-Myc (Alexa 488, Molecular Probes), coluna central: marcação nuclear (DAPI), Coluna da direita: imagens sobrepostas. Macrófagos: macrófagos extraídos de cultura primária de peritônio de camundongos C57Bl6; ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a 2 e 4 ciclos de bloqueio de adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática. B16F10: linhagem de melanoma metastática. Barras: 20 μ m.

Discussão

Caracterização do modelo

Nosso grupo desenvolveu recentemente um modelo de transformação maligna de melanócitos murinos onde a linhagem não tumorigênica, melan-a, foi submetida a ciclos sequenciais de bloqueio de adesão ao substrato, processo que resultou no estabelecimento de sublinhagens não tumorigênicas de melan-a e várias linhagens de melanoma (Correa e col., 2006; Oba-Shinjo e col., 2005).

No melanoma, a possibilidade de uma correlação patológica específica com uma correspondente alteração genética permite o estudo experimental das diferentes fases da progressão deste tumor. No entanto, amostras de fases iniciais são geralmente indisponíveis para estudo, impedindo a identificação de eventos iniciais associados à transformação maligna. É neste contexto que o estudo de modelos como o nosso se torna relevante.

Estas células têm sido utilizadas como representativas de etapas correspondendo a diferentes fases da gênese do melanoma, onde melan-a, 2C e 4C poderiam corresponder às fases de nevo a nevo displásico, as linhagens de melanoma 4C3- e 4C11- corresponderiam a melanomas pouco agressivos e as demais linhagens de melanoma, a melanomas mais agressivos ou de fase de crescimento vertical e metastático, já que são capazes de levar à formação de metástases à distância (**Figura 9A**).

Diversas características nos levam a fazer tais associações: a linhagem parental melan-a foi inicialmente descrita por Bennett e colaboradores (1987) como tendo um cariótipo normal diplóide ($2n=40$) (Bennett e col., 1987) como o nevo comum, que normalmente não apresenta mudanças genéticas e/ou alterações citogenéticas. Embora a linhagem melan-a hoje apresente um cariótipo quase triplóide (**Tabela 2**), acreditamos que este aumento na ploidia tenha sido causado pelo tempo em que estas células permaneceram em cultura, uma vez que estas já se encontram em passagem superior a 60. As linhagens derivadas de melan-a denominadas 2C e 4C não são capazes de formar tumores *in vivo* (**Figura 8**), mas assim como os nevos displásicos já apresentam anormalidades cromossômicas estruturais (**Figura 11 A, B e Tabela 2**). Linhagens distintas de melanoma (4C3-, 4C11-, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5) obtidas a partir da diluição limitante de esferóides de células 4C são

capazes de crescer como tumores quando injetadas subcutaneamente em camundongos singenêicos, com diferentes tempos de latência para o aparecimento de tumores (**Figura 8**), e as mais agressivas apresentam morfologia semelhante à linhagem estabelecida de melanoma murino B16F10 (**Figura 6**) e cariótipos bem mais complexos (**Tabela 2**). Como pode ser observado na **Figura 7**, há uma diferença marcante na proliferação celular *in vivo* entre as diversas linhagens de melanoma, separando-as em linhagens de crescimento lento, menos agressivas (4C3- e 4C11-), e linhagens de crescimento rápido, mais agressivas (4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5). Além dessas modificações, alterações graduais na morfologia das linhagens estabelecidas após submeter os melanócitos melan-a a ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem foram observadas (**Figura 6**).

Evolução cariotípica

A teoria da evolução clonal do tumor sugere que a instabilidade genética precede a progressão tumoral. Células originadas de um mesmo clone subseqüentemente podem adquirir alterações genéticas adicionais que permitem a seleção dos subclones com maior vantagem de crescimento em detrimento àqueles que poderiam não ser viáveis. Este processo de múltiplas etapas levaria ao estabelecimento de um clone predominante até que novos eventos mutacionais causassem uma próxima evolução clonal (revisto em Nowell, 1986).

Em nosso modelo, é clara a existência de aberrações clonais (**Tabela 2**). Os rearranjos observados na linhagem 2C são mantidos pelas linhagens sucessoras até alcançarem o fenótipo metastático, onde o cariótipo se torna muito mais complexo. Essas observações são consistentes com a idéia de que cariótipos clonais possuem as vantagens de crescimento necessárias para a sobrevivência. Embora seja verdade que um genoma primariamente clonal possua a informação genética necessária para crescimento e sobrevivência, a adição de novos rearranjos tem importantes implicações na evolução/progressão tumoral. Nota-se neste modelo que a cada ciclo de

impedimento de adesão realizado uma nova translocação era adicionada ao genoma da linhagem obtida (**Tabela 2**).

Além disso, apesar destas células apresentarem um número anormal de cromossomos (aproximadamente 50 cromossomos por núcleo), nenhum aumento significativo na ploidia foi observado ao longo da progressão, com exceção das linhagens metastáticas (**Figura 11C e Tabela 2**).

Nossos achados estão de acordo com diversos outros estudos feitos em tumores epiteliais que indicam que lesões inicialmente diplóides normalmente apresentam alguns rearranjos numéricos e estruturais antes de tornarem-se tetraplóides e apresentarem cariótipos citogeneticamente complexos (revisto em Bayani e col., 2008).

Aberrações recorrentes em melanomas humanos

A tumorigênese do melanoma em humanos envolve uma série de deleções alélicas em diversos cromossomos, incluindo 1p, 6q, 9p ou 10q, 11q e 17q. Um ou mais dos genes de susceptibilidade ao melanoma atuam como supressores tumorais, e sua mutação ou perda provavelmente contribui com o desenvolvimento desta neoplasia. Dentre estes genes estão *CMM*, *TP16* e *CDK4*, localizados nas regiões 1p36, 9p21 e 12q14, respectivamente (revisto em Hussein, 2004)

Além das deleções alélicas, outros tipos de alterações como translocações e fusões também são freqüentes em melanomas humanos. O banco de dados Mitelman (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) traz uma relação das alterações recorrentes em diversos tipos de câncer, entre eles o melanoma humano (**Tabela 5**).

Ainda que nenhuma das técnicas utilizadas neste estudo nos informe a localização exata dos pontos de quebra e fusão, podemos sugerir que genes importantes no desenvolvimento do melanoma, localizados nos cromossomos envolvidos em rearranjos em nosso modelo, possam ter tido sua expressão comprometida (perdida ou expressa) pelas alterações estruturais existentes. Desta maneira, os estudos de ortologia entre humanos e camundongos podem

nos ajudar a relacionar as alterações encontradas no nosso modelo com aquelas descritas em melanomas humanos (**Figura 16**).

Sob este contexto podemos citar o oncogene *BRAF*, que age na via de sinalização das MAP quinases/ERKs, e afeta a divisão celular, diferenciação e secreção. A mutação deste gene é um dos eventos mais precoces e comuns descritos em melanoma humano (Thomas, 2006). Em camundongos, *BRAF* está localizado no cromossomo 6 e, em nosso modelo, alterações estruturais envolvendo o cromossomo 6 também são eventos iniciais e parecem ser importantes na aquisição do fenótipo maligno, visto que tal rearranjo é mantido até que as células adquiram um fenótipo tumorigênico (**Tabela 2**). Embora não possamos afirmar que *Braf* esteja ativado em nosso modelo, e muito menos que a fusão cromossômica seja a causa desta ativação, análises comparativas como esta podem apontar candidatos interessantes para estudos futuros.

Ainda sob o mesmo ponto de vista, nós analisamos alterações envolvendo o gene supressor tumoral *TP53*, localizado na região terminal do cromossomo 11 em camundongos. Em nosso modelo, deleções aparentemente terminais acontecem precocemente, e poderiam levar à perda deste importante supressor tumoral. No entanto, diferentemente de *Braf*, resultados prévios do laboratório mostram que todas as linhagens celulares estudadas com exceção das metastáticas apresentam expressão de *Tp53*. Com base nestes resultados, é plausível supor que a deleção parcial do cromossomo 11 não afeta o locus onde está localizado o gene *Tp53* nas linhagens não metastáticas, mas pode ser a causa da perda de expressão deste gene nas linhagens metastáticas.

Outro gene interessante localizado também nos cromossomos que sofrem alterações estruturais em nosso modelo é o gene *c-Myc* localizado no cromossomo 15 em camundongos. A expressão constitutiva de *c-Myc* pode ocorrer como resultado de translocações, mutações ou ampliações, e contribui para o desenvolvimento e progressão de muitos tipos de câncer (Potter & Marcu, 1997; Nesbit e col., 1999). Em humanos, mais de 70% de todos os tumores apresentam expressão alterada de *MYC*, fazendo deste gene um dos mais importantes proto-oncogenes (Kutler & Mai, 2006). Em nosso modelo, a expressão de *c-Myc* é desregulada em todas as linhagens celulares, incluindo a parental melan-a. Estudos recentes mostram que a super

expressão de *MYC* em lesões iniciais de melanoma pode ser associada à supressão da senescência induzida pela ativação de *BRAF* (Zhuang e col., 2008), este mesmo mecanismo pode ter ocorrido nas células melan-a uma vez que estas células foram imortalizadas espontaneamente. Além disso, a translocação entre os cromossomos X e 15, encontrada a partir da linhagem 2C, pode ter um papel na manutenção desta expressão ao longo do modelo.

Estudos mais detalhados são necessários para avaliar o verdadeiro papel das alterações estruturais sobre a expressão gênica celular em nosso modelo.

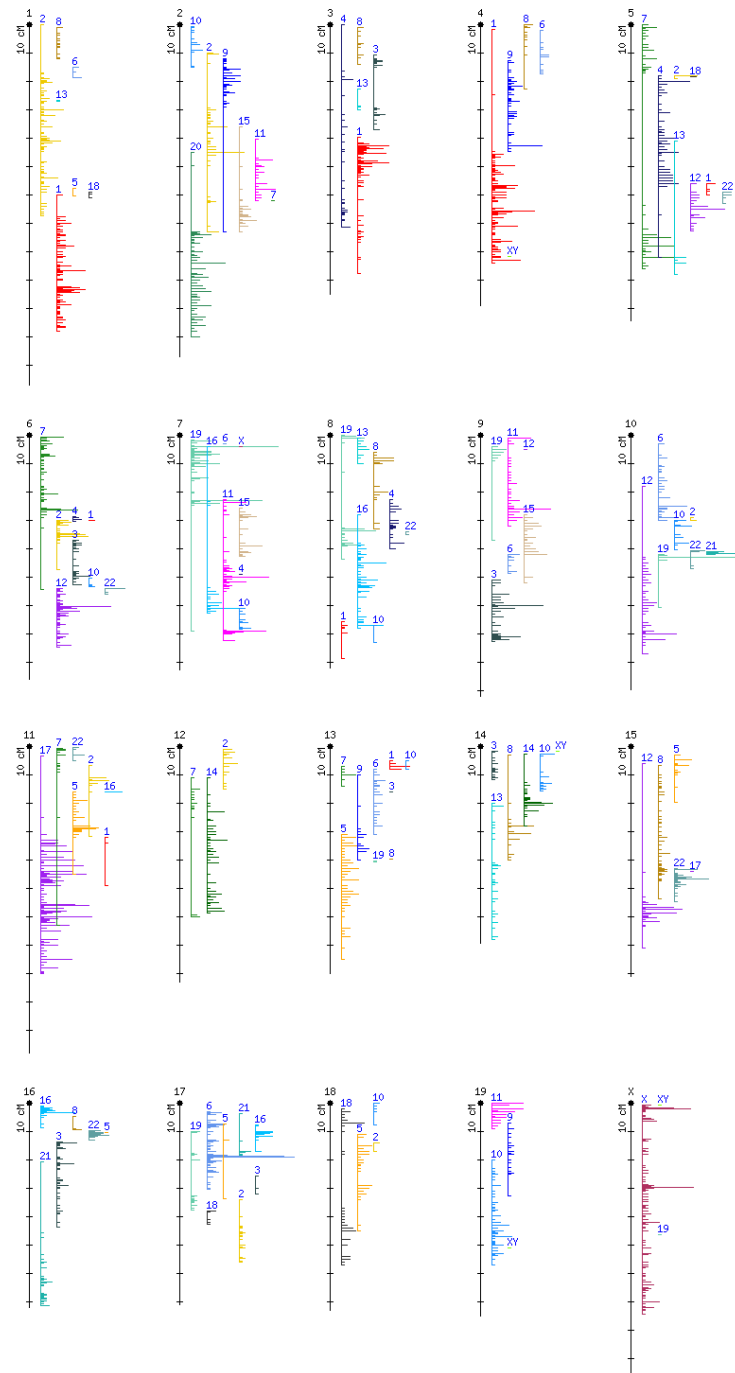


Figura 16 – Mapa de ortologia do genoma: genoma humano sob o genoma de camundongo. Este mapa nos fornece um panorama das informações de ortologia gênica entre humanos e camundongos. Ao lado de cada cromossomo murino existe uma série de histogramas que correspondem a cromossomos humanos. O número de cada cromossomo é mostrado logo acima do histograma. Cada barra no histograma é posicionada na localização em que os ortólogos se localizam. O comprimento da barra indica o número de ortologias encontradas na região (extraído de Mouse Genome Database - http://www.informatics.jax.org/reports/homologymap/mouse_human.shtml).

Tabela 5 – Alterações estruturais frequentes em melanomas humanos

<i>Translocações Balanceadas</i>	
Banda	Anormalidade
1q11	t(1;6)(q11;q11)
1q12	t(1;19)(q12;p13)
1q21	t(1;14)(q21;q32)
6q11	t(1;6)(q11;q11)
14q32	t(1;14)(q21;q32)
19p13	t(1;19)(q12;p13)
<i>Translocações Não-Balanceadas</i>	
Banda	Anormalidade
1p11	del(1)(p11)
1p13	del(1)(p13)
1p22	del(1)(p22)
1q10	i(1)(q10)
1q11	del(1)(q11)
1q32	del(1)(q32)
1q42	del(1)(q42)
2p11	del(2)(p11)
2p21	del(2)(p21)
2q11	del(2)(q11)
3p14	del(3)(p14p22)
3p22	del(3)(p14p22)
3p25	add(3)(p25)
4q21	del(4)(q21)
6p10	i(6)(p10)
6p21	del(6)(p21)
6q13	del(6)(q13)
6q14	del(6)(q14)
6q15	del(6)(q15)
6q21	del(6)(q21)
6q23	add(6)(q23)
7p11	der(7)t(7;9)(p11;q11)
7q10	i(7)(q10)
8p21	del(8)(p21)
8q10	i(8)(q10)
9p11	del(9)(p11)
9p11	der(9)del(9)(p11)del(9)(q22)
9p21	del(9)(p21)
9p22	del(9)(p22)
9q11	der(7)t(7;9)(p11;q11)
9q22	der(9)del(9)(p11)del(9)(q22)
11p15	add(11)(p15)
11q23	del(11)(q23)
12q21	add(12)(q21)
16q24	del(16)(q24)
17p13	del(17)(p13)

Alterações estruturais recorrentes em melanomas humanos, segundo o Banco de Dados Mitelman 2009 (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Del: deleção; Add: adição; der: derivativo, i: inserção, t: translocação.

Avaliação telomérica

O encurtamento telomérico e a ativação da telomerase são as aberrações mais prevalentes em lesões pré-cancerosas (Raynaud e col., 2008). Anormalidades no comprimento telomérico foram descritas em lesões pré-invasivas da mama (Meeker & Argani, 2004), pâncreas (van Heek e col., 2002), próstata (Joshua e col., 2008; Vukovic e col., 2007; Meeker e col., 2002), e em lesões precursoras de tumores epiteliais humanos (Meeker e col., 2004). Do mesmo modo, atividade de telomerase foi detectada no início de carcinogênese de diversos tecidos (Lantuejoul e col., 2005; Gulmann e col., 2005; Lancelin e col., 2000).

Para estudar o momento da ocorrência do encurtamento telomérico durante a transformação maligna de melanócitos, analisamos o perfil telomérico por Q-FISH e constatamos que, em comparação com a linhagem celular parental (melan-a), todas as demais linhagens apresentaram seus telômeros diminuídos (**Figura 13A**). Além disso, a variação entre o comprimento telomérico nas linhagens diminuiu significativamente à medida que novos ciclos de bloqueio de adesão eram realizados, direcionando o perfil telomérico destas células para uma distribuição característica de células tumorais (telômeros curtos e com pouca variação em tamanho). Estes achados estão em concordância com a idéia de que anormalidades no comprimento telomérico parecem ser uma das primeiras alterações genéticas adquiridas durante o processo de transformação maligna (Raynaud e col., 2008; Vukovic e col., 2007; Meeker & Argani, 2004).

Observamos o encurtamento telomérico ocorrendo em paralelo com a instabilidade genômica, e na presença de atividade da telomerase (**Figura 13B**). Essas observações são consistentes com o fato de que altas taxas de perda telomérica são freqüentemente observadas em tumores humanos e linhagens celulares tumorais que expressam telomerase, sugerindo que, mesmo quando as células tumorais mantêm ativamente seus telômeros, eles continuam a mostrar defeitos fundamentais que promovem perda de parte de suas seqüências (Chin e col., 2004; Lo e col., 2002; Fouladi e col., 2000) e que, embora a telomerase seja responsável pela adição de seqüências teloméricas nas pontas dos cromossomos a cada ciclo celular, uma infinidade de outras

proteínas também desempenha papéis importantes na regulação do comprimento telomérico, na sua manutenção e na formação de um complexo protetor que impede fusão cromossômica e erosão telomérica (de Lange, 2005; de Lange, 2002). Adicionalmente a isso, várias evidências sugerem também uma função protetora para telomerase, além do seu papel no alongamento telomérico (Kim e col., 2003; Zhu e col., 1999). Em recente trabalho, Xu e Blackburn (2007) descreveram uma classe distinta de telômeros extremamente curtos denominados *t-stumps* em células de câncer humano com telomerase ativa e ausência de expressão de alguns *checkpoints* do ciclo celular. Tais estruturas, além de serem toleradas por essas células, parecem também serem protegidas por pelo menos um componente da telomerase.

Muitos estudos em telômeros têm sido feitos em cromossomos metafásicos, e o estudo dessas estruturas permitiu aos pesquisadores identificar alterações cromossômicas, como translocações não balanceadas, cromossomos dicêntricos e deleções terminais, associadas a telômeros disfuncionais (Artandi e col., 2000; Gisselsson e col., 2001; Lo e col., 2002; Deng e col., 2003; Murnane and Sabatier, 2004; Louis et al., 2005).

O estudo dos cromossomos em metáfase de algumas das linhagens mostra um aumento na freqüência de extremidades livres de sinais teloméricos (**Figura 14**) ao longo da progressão, juntamente com o aumento de alterações cromossômicas estruturais que, como discutido acima, já foram anteriormente associadas à disfunção telomérica. Além disso, o aumento gradual de alterações associadas aos telômeros vista parece concordar com a proposta feita por Tussel e colaboradores (2008) de que, nos estágios iniciais da progressão onde a disfunção telomérica é limitada, fusão intracromossômica seria o evento principal e causaria somente ampliações e deleções nos cariótipos das células filhas. Mais tarde, com o encurtamento progressivo dos telômeros a cada ciclo de replicação, a disfunção telomérica afetaria mais terminais cromossômicos, levando a fusões intercromossômicas que, por sua vez, produziram rearranjos mais complexos.

Tem sido proposto que em câncer rearranjos cromossômicos resultantes de perdas teloméricas resultariam primariamente da extensiva fusão cromossômica que ocorre quando os telômeros se tornam extremamente

curtos ou instáveis durante a crise. Estas fusões ocorreriam através de eventos denominados BFB (breakage/fusion/bridge) (de Lange, 2002).

Ao que tudo indica somente uma célula que tenha deficiência dos *checkpoints* de ciclo celular ou apoptose escaparia da entrada na senescência e participaria de ciclos BFB. Em outras palavras, a ausência da expressão de genes *checkpoints* para ciclo celular e apoptose, como *RB*, *TP53*, *TP21* e *TP16* por exemplo, precederia o processo de perda telomérica (De Pinho e col, 2001; Guney & Sedivy, 2006; Herbig & Sedivy, 2006; Bailey & Murnane, 2006).

No nosso modelo, a linhagem 4C3+ parece ter alcançado o estágio de crise. Estas células são caracterizadas por um tamanho muito diminuído de telômero, uma pequena variabilidade intratelomérica e um cariótipo repleto de translocações não balanceadas e deleções terminais. Dados do laboratório mostram que o fenótipo telomérico de crise encontrado nestas células coincide com a perda de expressão de um dos mais importantes *checkpoints* celulares, o gene p53 (dados não mostrados).

Contudo, o encurtamento telomérico ou *uncapping* e a ativação da telomerase parecem ter tanto um papel supressor tumoral como oncogênico: a instabilidade genômica gerada pelo encurtamento telomérico poderia gerar sinais pró-apoptóticos que levariam a célula em questão à morte, agindo assim como um mecanismo de supressão tumoral. Por sua vez, a ativação da telomerase poderia levar à manutenção da instabilidade genômica, pela estabilização dos telômeros extremamente curtos e diminuição da variação do comprimento, perpetuando cariótipos complexos (Hackett & Greider, 2002).

Instabilidade centromérica

Além de anomalias teloméricas, uma das mais notáveis características deste modelo é a instabilidade centromérica que se manifesta por fragmentos e fusões centroméricas (**Figura 12 e Figura 14J**). Esses fragmentos podem conter apenas heterocromatina e não serem capazes de produzir nenhuma anormalidade na célula, no entanto outros fragmentos podem transportar material eucromático, podendo causar instabilidade genética pela da expressão dos genes que poderiam estar neles presentes.

Esses fragmentos aumentam durante o modelo de melan-a até 4C3-, quase desaparecendo na linhagem de melanoma 4C3+, onde as fusões Rob estão presentes (**Figura 11B**). A perda desses fragmentos é possivelmente associada à alta taxa de proliferação destas células, visto que se tratam de estruturas muito pequenas, que poderiam ser facilmente perdidas durante a replicação de células que já não detêm todos os *checkpoints* de ciclo celular.

Sendo os telômeros são estruturas especializadas responsáveis pela integridade e estabilidade cromossômica, um pré-requisito para a formação de translocações robertsonianas poderia ser tanto a eliminação como a inativação telomérica. Existem na natureza camundongos de laboratório que possuem translocações Rob em seus cariótipos e, ainda, que a maioria dos fetos humanos naturalmente abortados apresenta esse mesmo tipo de rearranjo (Bidau e col., 2001; Dobrar-Muller e col., 2000). No entanto, tendo em vista que células germinativas apresentam atividade de telomerase, espera-se que o padrão telomérico nestas células seja mantido e não haja encurtamento dessas regiões. Sendo assim, deve haver outro mecanismo pelo qual as translocações Rob são formadas nestes casos.

Sob este contexto Slijepcevic discute em uma revisão publicada em 1998 que existem três mecanismos possíveis de formação de translocações Robertsonianas: encurtamento, eliminação e disfunção telomérica.

Os cromossomos dos camundongos (com exceção do cromossomo Y) são classificados citogeneticamente como acrocêntricos. No entanto, até hoje nenhuma seqüência codificadora de DNA foi encontrada entre os centrômeros e os telômeros do braço curto destes cromossomos, o que os torna telocêntricos. Os telômeros dos braços curtos dos cromossomos de camundongos são menores do que os dos braços longos (Zijlmans e col., 1997) e, já que se espera que a taxa de encurtamento telomérico seja a mesma para todos os terminais cromossomos (4.8Kb por geração), os braços curtos dos cromossomos são mais sensíveis à perda de seqüências teloméricas que os braços longos, levando a maiores taxas de translocações Rob do que fusões terminais envolvendo dois braços longos (revisto em Slijepcevic, 1998). Além disso, o encurtamento telomérico resultante da inativação da telomerase leva a um aumento na freqüência de fusões Robertsonianas em células de camundongos (Blasco e col., 1997).

A disfunção telomérica também parece ter um papel na formação das translocações Rob. Recentes trabalhos do nosso grupo demonstraram que a expressão constitutiva de c-Myc pode mediar a formação de fusões Robertsonianas pelo do remodelamento centromérico no núcleo interfásico e subsequente promoção de fusões teloméricas em cromossomos de camundongos sem afetar o comprimento telomérico (Guffei e col., 2007).

Em camundongos, a formação de translocações Rob pela eliminação completa dos telômeros dos braços curtos também já foi descrita. Neste caso, eventos de quebra nas seqüências *minor* centroméricas levariam à completa perda dos telômeros dos braços curtos, facilitando a formação de fusões centroméricas (Garagna e col., 1996; Nanda e col., 1995).

As fusões Rob identificadas não apresentaram sinais teloméricos sob ponto de fusão centromérica (**Figura 14K, L**), e todos os fragmentos centroméricos encontrados apresentam sinais teloméricos associados, alguns deles aparecem como mini cromossomos contendo quatro sinais teloméricos nas suas extremidades e, provavelmente, foram produzidos pela fusão de dois fragmentos centroméricos individuais (**Figura 14G, H, I**).

Tendo em vista o que foi discutido acima, um mecanismo similar ao descrito por Garagna e colaboradores (1996) e Nanda e colaboradores (1995) poderia estar acontecendo nas células do nosso modelo. As quebras nas regiões centroméricas poderiam explicar não só a formação das translocações Robertsonianas em nosso modelo, mas também o aumento no número de fragmentos centroméricos (**Figura 12C**) e o concomitante aumento na taxa de extremidades livres de seqüências teloméricas encontradas linhagem 4C3-.

As translocações Robertsonianas em humanos constituem a mais comum das anomalias genéticas estruturais em fetos abortados e recém-nascidos (Kim & Shaffer, 2002; Nielsen & Wohrlet, 1991; Jacobs, 1981). Além disso, estas estruturas foram encontradas em cânceres hematológicos (Welborn, 2004; Qian e col., 2002), em tumores sólidos (Bayani e col., 2003; Padilla-Nash e col., 2001), e em fases iniciais da leucemia mielóide aguda (Shimokawa e col., 2004). A presença de translocações Robertsonianas no nosso modelo correlaciona-se com o fenótipo metastático, visto que a única linhagem celular a apresentar tais estruturas é também a única linhagem analisada a apresentar tal característica.

A instabilidade cromossômica demonstrada nas diferentes linhagens que compõem o nosso modelo de transformação maligna de melanócitos murinos sugere que a progressão das aberrações cromossômicas e a conseqüente evolução cariotípica é mediada por instabilidade centromérica e telomérica. Este fenótipo parece depender do processo de impedimento de adesão ao substrato e dos insultos genômicos e/ou epigenômicos submetidos à linhagem de melanócitos imortalizados, melan-a, e estes dois tipos de instabilidade parecem ser eventos precoces na progressão maligna de melanócitos murinos.

Conclusão

No nosso modelo:

- a diminuição do tamanho telomérico, assim como a modificação no padrão de distribuição dos mesmos corrobora os dados da literatura, onde células não neoplásicas apresentam telômeros grandes e com grande variação de tamanhos, enquanto as células tumorais apresentam telômeros menores e com uma variação pequena;
- As aberrações cromossômicas estruturais precedem e coincidem com a carcinogênese;
- Rearranjos específicos determinam fenótipos tumorais específicos;
- Translocações Robertsonianas estão relacionadas diretamente a maior agressividade tumoral;
- Instabilidade centromérica e telomérica parecem ser eventos precoces na progressão maligna de melanócitos;
- A instabilidade cromossômica é mediada por instabilidade telomérica e centromérica. Este fenótipo parece depender do processo de impedimento de adesão ao substrato e dos insultos genômicos e ou epigenômicos submetidos à linhagem melan-a.

Referências

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York and London, Garland Science.

Alkan C, Ventura M, Archidiacono N, Rocchi M, Sahinalp SC, Eichler EE (2007). Organization and evolution of primate centromeric DNA from whole-genome shotgun sequence data. *PLoS Comput Biol.* **3**,1807-1818.

Amati BB, Gasser SM (1988). Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* **54**, 967-978.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2007* (2007). Atlanta, American Cancer Society.

Amor DJ, Choo KH (2002). Neocentromeres, role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet.* **71**, 695-714.

Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Choo KH (2004). Building the centromere, from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.* **14**, 359-368.

Armstrong BK, Krickler A (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* **63**, 8-18.

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641-645.

Baerlocher GM, Lansdorp PM (2003). Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* **55**,1-6.

Bailey SM, Murnane JP (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2408-2417.

Bartholdi MF (1991). Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci.* (Pt 2): 255-263.

Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA. Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells (2007). *Cancer Biol.* **17**, 5-18.

Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7-16.

Baylin SB, Ohm JE (2006). Epigenetic gene silencing in cancer- a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **6**, 107-116.

Beheshti B, Karaskova J, Park PC, Squire JA, Beatty BG (2000). Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of

prostate cancer cell lines by sequential giemsa banding and spectral karyotyping. *Mol Diagn.* **5**, 23-32.

Beil M, Dürschmied D, Paschke S, Schreiner B, Nolte U, Bruel A, Irinopoulou T (2002). Spatial distribution patterns of interphase centromeres during retinoic acid-induced differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cytometry* **47**, 217-225.

Beil M, Fleischer F, Paschke S, Schmidt V (2005). Statistical analysis of the three-dimensional structure of centromeric heterochromatin in interphase nuclei. *J Microsc.* **217**, 60-68.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* **39**, 414 – 418.

Bickmore WA, Oghene K (1996). Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes. *Cell* **84**, 95-104.

Bidau CJ, Giménez MD, Palmer CL, Searle JB (2001). The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* **87**,305-313.

Bjerling P, Ekwall K (2002). Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 499-507.

Blackburn EH (1992). Telomerases. *Annu Rev Biochem.* **61**: 113–129.

Blackburn EH (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661–673.

Blackburn EH, Gall JC (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* **120**, 33–53.

Blasco MA (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* **6**,611-622.

Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.

Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO* **14**, 4240-4248.

Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG (2007). Oxidative stress modulates DNA methylation

during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* **9**, 1111-1121.

Caporali A, Wark L, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398-1406.

Casolari JM, Brown CR, Drubin DA, Rando OJ, Silver PA (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev.* **19**, 1188-1198.

Chammas R. Melanoma cutâneo. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 1. São Paulo, SP: ATHENEU, 2004. Cap 22, p. 231-240.

Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW, Lockett SJ (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet.* **36**, 984-988.

Choo KH (1997). Centromere DNA dynamics, latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet.* **61**, 1225-1233.

Choo KH (1998). Why is the centromere so cold? *Genome Res.* **8**, 81-82.

Choo KH (2000). Centromerization. *Trends Cell Biol.* **10**, 182-188.

Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2004). The threedimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* **3**, 2 – 12.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M (1984). A study of tumor progression, the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* **15**, 1147-1165.

Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, and Jasiulionis MG (2005). Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer* **114**, 356-363.

Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, and Cerutti JM (2002). TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 65-68.

Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK, Chiorazzi N (2004). Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* **103**, 375-382.

- Darai E, Kost-Alimova M, Kiss H, Kansoul H, Klein G, Imreh S (2005). Evolutionarily plastic regions at human 3p21.3 coincide with tumor breakpoints identified by the "elimination test". *Genomics* **86**, 1-12.
- de Lange T (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540.
- de Lange T (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110.
- der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londoño-Vallejo JA (2004). The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **23**, 1221-1228.
- Esteller M, Capellà G, Ribas M, Peinado MA. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* **66**, 8462-8468.
- Evans, E.P.: Standard normal chromosomes, pp. 1446-1449. In: *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Lyon, M.F., Rastan, S., and Brown, S.D.M. (eds.), Third Edition, Volume 2, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- Fleisig HB, Wong JM (2007). Telomerase as a clinical target: current strategies and potential applications. *Exp Gerontol.* **42**, 102-112.
- Flores I, Benetti R, Blasco M (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol.* **18**, 254-260.
- Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO* **4**, 575 – 580.
- Gaggioli C, Sahai E (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* **20**, 161-172.
- Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, Kelly ZD, Nolan IM, Fox EJ, Culhane AC, McArdle L, Fraga MF, Hughes L, Currid C A, O'Mahony F, Byrne A, Murphy AA, Moss C, McDonnell S, Stallings RL, Plumb JA, Esteller M, Brown R, Dervan PA, Easty DJ (2005). Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation, insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* **26**, 1856-1867.
- Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci.* **114**, 4429 – 4434.
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* **36**, 94-99.

- Gardner RJM and Sutherland GR (2004). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Oxford University Press, Cary, North Carolina, U.S.A., 2004.
- Gazave E, Catalan J, Ramalhinho Mda G, Mathias Mda L, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, Auffray JC (2003). The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* **81**, 33-42.
- Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* **340**,1341-8.
- Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, Strömbeck B, Dal Cin P, Höglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,12683-12688.
- Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* **8**, 416-424.
- Greaves IK, Rangasamy D, Ridgway P, Tremethick DJ (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 525-530.
- Greider CW (1996). Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* **65**, 337–365.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-14.
- Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D (1993). Lessons from tumor progression, the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* **100**, 342S-345S.
- Guffei A, Lichtensztejn Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, and Mai S (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**, 578-588.
- Gulmann C, Lantuejoul S, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E (2005). Telomerase activity in proximal and distal gastric neoplastic and preneoplastic lesions using immunohistochemical detection of hTERT. *Dig Liver Dis.* **37**, 439-445.
- Guney I, Sedivy JM (2006). Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle* **5**, 2319-2323.
- Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **18**,150-159.

Hackett JA, Greider CW (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 619-626.

Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Méhes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet.* **36**, 1159-1161.

Hathcock KS, Kaech SM, Ahmed R, Hodes RJ (2003). Induction of telomerase activity and maintenance of telomere length in virus-specific effector and memory CD8+ T cells. *J Immunol.* **170**,147-152.

Hede, K (2005). Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. *J Natl Cancer Inst.* **97**, 87-89.

Herbig U, Sedivy JM (2006). Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev.* **127**, 16-24.

Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, Michel L, Mittal V, Gerald W, Benzera R, Lowe SW, Cordon-Cardo C (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* **430**, 797-802.

Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Säll T, Mitelman F, Horsman D (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* **108**, 57-65.

Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* **44**, 235-246.

Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. 2004. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr. Biol.* **14**, 1621–31.

Houghton NA, Polsky D (2002). Focus on melanoma. *Cancer Cell* **2**,275-278.

Howell PM Jr, Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker AI (2009). Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control.* **16**, 200-218.

Hsu MY, Meier F, Herlyn M (2002). Melanoma development and progression, a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**,522-536.

Hug N, Lingner J (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma* **115**, 413-425.

Hultdin M, Rosenquist R, Thunberg U, Tobin G, Norrback KF, Johnson A, Sundström C, Roos G (2003). Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. *Br J Cancer.* **88**,593-598.

- Hussein MR (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol.* **57**, 797-801.
- Hussein MR, Sun M, Roggero E, Sudilovsky EC, Tuthill RJ, Wood GS, Sudilovsky O (2002). Loss of heterozygosity, microsatellite instability, and mismatch repair protein alterations in the radial growth phase of cutaneous malignant melanomas. *Mol Carcinog.* **34**, 35-44.
- Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet.* **33**, 44-54.
- Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005). Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* **161**,159-163.
- Johnson JP (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 345-357.
- Joshua AM, Evans A, Van der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, Squire JA (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim Biophys Acta.* **1785**, 156-181.
- Kalitsis P, Griffiths B, and Choo AKH (2006). Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8786– 8791.
- Kastan MB, Bartek J(2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**,316-323.
- Katakura Y (2006). Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**,1076-1081.
- Khalil, A. et al (2007). Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Res.* **15**, 899-916.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat.Genet.* **23**, 405–12
- Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, Misteli T (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res.* **105**, 292-301.
- Kim SR, Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test.* **6**, 163-168.
- Kolodner RD (1995).Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* **20**, 397-401.

- Komarova NL, Lengauer C, Vogelstein B, Nowak MA (2002). Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* **1**, 685-692.
- Kraemer KH, Greene MH (1985). Dysplastic nevus syndrome. Familial and sporadic precursors of cutaneous melanoma. *Dermatol Clin.* **3**, 225-237.
- Kuttler F and Mai S (2006). c-Myc, genomic instability and disease. In Vol 1: Genome dynamics. *Genome and Disease*. J-N Volff (Ed). Karger Publishers, Wuerzburg, Germany, pp. 171-191.
- Lancelin F, Anidjar M, Villette JM, Soliman A, Teillac P, Le Duc A, Fiet J, Cussenot O (2000). Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *BJU Int.* **85**, 526-531.
- Lancôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* **8**, 104-115.
- Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* **11**, 2074-2082.
- Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-7.
- Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, Leachman AS, Dirk Noyes R, Wittwer CT, Perreard L, Bernard OS (2005). Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer* **104**, 1678-1686.
- Li B, de Lange T. 2003. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol. Biol. Cell* **14**, 5060–5068.
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* **20**, 8125-8135.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* **2**, 169-174.
- Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, et al. 2004. PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat. Cell Biol.* **6**, 673–680.

Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line (2002). *Neoplasia* **4**, 531-538.

Loeb LA (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* **61**, 3230-3209.

Londoño-Vallejo JA (2004). Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett.* **212**,135-144.

Louis, S.F., Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Guffei, A., Lichtensztein, Z., Kuttler, F., Chuang, T.C., Moshir, S., Mougey, V., Chuang, A.Y., Kerr, P.D., Fest, T., Boukamp, P. and Mai, S. (2005) c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9613-9618.

Madame Curie Bioscience Database, 2009 (NCBI) [Electronic Book] www.landesbioscience.com/curie/

Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire (Eds). Oxford University Press,Oxford. pp. 55 – 67.

Mai S, and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327-1331.

Mancianti ML, Györfi T, Shih IM, Valyi-Nagy I, Levensgood G, Menssen HD, Halpern AC, Elder DE, Herlyn M (1993). Growth regulation of cultured human nevus cells. *J Invest Dermatol.* **100**, 281S- 287S.

Mann MB, Hodges CA, Barnes E, Vogel H, Hassold TJ, Luo G (2005). Defective sister-chromatid cohesion, aneuploidy and cancer predisposition in a mouse model of type II Rothmund-Thomson syndrome. *Hum Mol Genet.* **14**, 813-825.

McClintock B (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234-282.

McCormack SJ, Weaver Z, Deming S, Natarajan G, Torri J, Johnson MD, Liyanage M, Ried T, Dickson RB (1998). *Myc/p53* interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16**, 2755-2766.

McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M (2002). Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* **1**, 459-465.

Meaburn, K.J.; Misteli, T.; Soutoglou, E (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol.* **17**, 80-90.

-
- Medic S, Pearce RL, Heenan PJ, Ziman M (2007). Molecular markers of circulating melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **20**, 80-91.
- Meeker AK, Argani P (2004). Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 285-296.
- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* **10**, 3317-3326.
- Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, De Marzo AM (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* **62**, 6405-6409.
- Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schittek B, Garbe C, Herlyn M (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* **3**, D1005-D1010.
- Merico V, Pigozzi MI, Esposito A, Merani MS, Garagna S (2003). Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet Genome Res.* **103**, 321-329.
- Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA (2005). Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol.* **15**, 484-493.
- Miller AJ, Mihm MC Jr (2006). Melanoma. *N Engl J Med.* **355**, 51–65.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* **15**, 417-474.
- Mitelman, F (2000). Recurrent chromosome aberration in cancer. *Mutat Res* **462**, 247-253.
- Modrich P (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* **272**, 24727-24730.
- Monaghan P, Haussmann MF (2006). Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol.* **21**, 47-53.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55 – 63.
- Mufson RA, Fisher PB, and Weinstein IB (1979). Effect of phorbol ester tumor promoters on the expression of melanogenesis in B-16 melanoma cells. *Cancer Res.* **39**, 3915-3919.

- Murata S, Nakazawa T, Ohno N, Terada N, Iwashina M, Mochizuki K, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Ohno S, Katoh R. (2007). Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. *Thyroid* **17**, 489-496.
- Murnane JP (2006). Telomeres and Chromosome instability. *DNA Repair (Amst)* **5**,1082-1092.
- Nachman MW and Searle JB. (1995) Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* 10: 397-402.
- Nanda I, Schneider-Rasp S, Winking H, Schmid M (1995). Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res.* **3**,399-409.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004-3016.
- Neumann AA, Reddel RR (2002). Telomerase maintenance and cancer – look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* **2**, 879-884.
- Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* **87**, 81-83.
- Nowell PC (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* **46**, 2203-2207.
- Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, and Jasiulionis MG (2006). Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* **8**, 231-241.
- Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schröck E, Hilgenfeld E, Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 349-363.
- Palm W, de Lange T (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* **42**, 301-334.
- Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G, Lissia A, Tanda F, Castello G (2003). Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res.* **13**, 167-170.
- Parris CN, Jezzard S, Silver A, MacKie R, McGregor JM, Newbold RF (1999). Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer* **79**, 47-53.

Pedram M, Sprung CN, Gao Q, Lo AW, Reynolds GE, Murnane JP (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol Cell Biol.* **26**, 1865-1878.

Petrova NV, Yakutenko II, Alexeevski AV, Verbovoy VA, Razin SV, Iarovaia OV (2007). Changes in chromosome positioning may contribute to the development. *J Cell Physiol.* **213**, 278-283.

Pidoux AL, Allshire RC (2000). Centromeres, getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 308-319.

Pidoux AL, Allshire RC (2005). The role of heterochromatin in centromere function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**, 569-579.

Potter M, Marcu KB (1997). The c-myc story: where we've been, where we seem to be going. *Curr Top Microbiol Immunol.* **224**, 11-17.

Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* **132**, 79-80.

Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 695-701.

Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausson KA, and Soria JC (2008). Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol.* **66**, 99-117.

Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Rothhammer T, Bosserhoff AK (2007). Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* **20**, 92-111.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Sarkar R, Guffei A, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Alterations of centromere positions in nuclei of immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry A.* **71**, 386-392.

Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O (2000). A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* **88**, 440-453.

Sawyer JR, Swanson CM, Koller MA, North PE, Ross SW (1995). Centromeric instability of chromosome 1 resulting in multibranching chromosomes, telomeric fusions, and "jumping translocations" of 1q in a human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* **76**, 1238-1244.

Schaefer LH, Schuster D, Herz, H (2001) Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Microsc.* **204**, 99-107.

Schulten HJ, Gunawan B, Otto F, Hassmann R, Hallermann C, Noebel A, Füzési L (2002). Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet Cytogenet.* **133**, 134-141.

Seabright MA (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**, Y971-Y972.

Shaw CJ, Lupski JR (2004). Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* **13** Spec No 1:R57-64.

Shay JW, Bachetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787-791.

Shay JW, Wright WE (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**,867-874.

Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, Takeyama H (2004). Acute myelogeneous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med.* **43**, 508-11.

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M (2005). Upregulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol.* **166**,1541-1554.

Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1659–68.

Stewart SA, Weinberg RA (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**, 531-557.

Thomas NE (2006). BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* **16**, 97-103.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* **351**, 998–1012.

Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M (2000). DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet.* **89**, 121-128.

Ueda Y, Okano M, Williams C, Chen T, Georgopoulos K, Li E (2006). Roles for Dnmt3b in mammalian development, a mouse model for the ICF syndrome. *Development* **133**,1183-1192.

van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH,

- Maitra A(2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* **161**,1541-1547.
- van Steensel B, de Lange T (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740–743.
- Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC, Chuang AY, Wark L, Young IT (2005) Characterizing the Three-Dimensional Organization of Telomeres. *Cytometry A.* **67**, 144-150.
- Vig BK, Sternes KL, Paweletz N (1989).Centromere structure and function in neoplasia.*Cancer Genet Cytogenet.* **43**,151-178.
- Villa A, Navarro-Galve B, Bueno C, Franco S, Blasco MA, Martinez-Serrano A (2004). Long-term molecular and cellular stability of human neural stem cell lines. *Exp Cell Res.* **294**,559-570.
- Villasante A, Abad JP, Méndez-Lago M (2007). Centromeres were derived from telomeres during the evolution of the eukaryotic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10542-10547.
- Vukovic B, Beheshti B, Park PC, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA (2007).Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotypic evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* **116**, 1-11.
- Wagner, RP; Maguire, MP; Stallings, RL. Chromosome Organization. In: Wagner, RP; Maguire, MP; Stallings, RL. *Chromosomes: a synthesis.* 2. Wiley-Liss, New York.pp.66-111.
- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* **12**, 1769-1774.
- Wascher RA, Morton DL, Kuo C, Elashoff RM, Wang HJ, Gerami M, Hoon DS (2003). Molecular tumor markers in the blood, early prediction of disease outcome in melanoma patients treated with a melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2558–2563.
- Weaver, B.A.A.; Cleveland, D.W (2007). Aneuploidy: Instigator and Inhibitor of Tumorigenesis. *Cancer Res.* **67**, 10103-10105.
- Weimer R, Haaf T, Krüger J, Poot M, Schmid M (1992). Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0, G1, S, G2, G1, and early S' phase in human lymphocytes. *Hum Genet.* **88**, 673-682.
- Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **151**,14-35.
- Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA (2005). Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* **118**(Pt 17):3861-8.

Xu L, Blackburn EH (2007). Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Mol Cell*. **28**, 315-327.

Yue Y, Grossmann B, Ferguson-Smith M, Yang F, Haaf T (2005). Comparative cytogenetics of human chromosome 3q21.3 reveals a hot spot for ectopic recombination in hominoid evolution. *Genomics* **85**, 36-47.

Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3723-3728.

Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA, Berman AE, Giordano TJ, Prochownik EV, Soengas MS, Nikiforov MA (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **7**, 6623-6634.

Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7423-7428.

Abstract

Aneuploidy and chromosomal instability are hallmarks of most solid tumors. These alterations may result from inaccurate chromosomal segregation during mitosis, which can occur through several mechanisms including defective telomere metabolism, centrosome amplification, dysfunctional centromeres and/or defective spindle checkpoint control. In this work, we used an *in vitro* murine melanoma model that utilizes the cell adhesion blockade as a transforming factor to characterize telomeric and centromeric alterations that accompany melanocyte malignant transformation. To study the timing of the occurrence of telomere shortening during the transformation model, we analyzed the profile of telomere length by Q-FISH and found that telomere length significantly decreased as additional rounds of cell adhesion blockages were performed. Together with it, increase in telomere free ends and karyotype complexity were also found, which includes Robertsonian fusions in 100% of metaphases of the metastatic melanoma cells. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation and that telomere abnormalities result in telomere aggregation, breakage-bridge-fusion cycles and chromosomal instability. Another remarkable feature of this model is the abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Taken together, our results illustrate for this melanoma model chromosomal instability with a structural signature of centromere breakage and telomeric loss.

Anexos

Telomere-centromere-driven genomic instability contributes to karyotype evolution in a mouse model of melanoma.

Amanda Gonçalves dos Santos Silva^{1,2}, Herbert Alexander Graves¹, Amanda Guffei¹, Tatiana Iervolino Ricca², Renato Arruda Mortara³, Miriam Galvonas Jasiulionis^{2, 4*} and Sabine Mai^{1*}

¹Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, CancerCare Manitoba, Winnipeg, MB, Canadá; ²Department of Immunology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil; ³Department of Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil; ⁴Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil.

Running title: Telomere-centromere-driven genomic instability

Keywords: Telomere, centromere, genomic instability, carcinogenesis, melanoma.

Corresponding authors:

Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermot Avenue, Winnipeg MB R3E 0V9 CANADA, phone: 204-787-2135; FAX: 204-787-2190; e-mail: smai@cc.umanitoba.ca

Miriam Galvonas Jasiulionis, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, BRAZIL, phone: 11-5549-6073; FAX: 11-5572-3328; e-mail: mjasiulionis@unifesp.br

Requests for reprints: Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermot Avenue, Winnipeg, MB, Canada R3E 0V9.

E-mail: smai@cc.umanitoba.ca

Abstract

Aneuploidy and chromosomal instability are hallmarks of most solid tumors. These alterations may result from inaccurate chromosomal segregation during mitosis, which can occur through several mechanisms including defective telomere metabolism, centrosome amplification, dysfunctional centromeres and/or defective spindle checkpoint control. In this work, we used an *in vitro* murine melanoma model, that utilizes a cellular adhesion blockade as a transforming factor, to characterize telomeric and centromeric alterations that accompany melanocyte transformation. To study the timing of the occurrence of telomere shortening in this transformation model, we analyzed the profile of telomere length by quantitative fluorescent *in situ* hybridization (Q-FISH) and found that telomere length significantly decreased as additional rounds of cell adhesion blockages were performed. Together with it, an increase in telomere free ends and complex karyotypic aberrations were also found, which include Robertsonian fusions in 100% of metaphases of the metastatic melanoma cells. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation and that telomere abnormalities result in telomere aggregation, breakage-bridge-fusion cycles and chromosomal instability. Another remarkable feature of this model is the abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Taken together, our results illustrate for this melanoma model chromosomal instability with a structural signature of centromere breakage and telomeric loss.

Abbreviations: CIN, chromosomal instability; BBF, breakage – bridge – fusion; FISH, fluorescence in situ hybridization; MIN, microsatellite instability; Rb, Robertsonian; SKY, spectral karyotyping.

Introduction

The progression of a melanocyte to malignant melanoma is a multistep process requiring the gradual acquisition of genetic and epigenetic alterations. This transformation process is characterized by the loss of tumor suppressor genes, epigenetic changes, alterations of the mismatch repair pathway and the generation of genomic instability [1]. Malignant melanomas commonly display two types of genomic instability found in cancer, microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN). MIN is found in approximately 30% of cases, while CIN is associated with the majority of cases of analyzed [1-3].

CIN is a hallmark of most classes of solid tumors [2-6]. Its initiation may be the result of inaccurate chromosomal segregation during mitosis caused in part by defective telomere metabolism, centromere amplifications, dysfunctional centromeres or defective spindle checkpoint controls [7, 8]. Centromere-driven CIN is resultant from a variety of insults to the centromere that impact in part or cumulatively on the assembly of the kinetochore, segregation of the sister-chromatids, nuclear localization of centromeres, and recombination events at pericentromeric regions [9-11]. Pericentromeric regions are often hotspots for both recombination events during evolution [12] and in cancer [13, 14]. Centromere integrity is therefore essential for genomic stability and there are several examples where defects in centromere function are associated with birth defects, spontaneously aborted fetuses, Robertsonian translocations and cancers (for review see Goncalves dos Santos Silva et al [11]). Additionally, pericentric inversions in humans are often associated with decreased male

fertility [15-17], cancer [18-20], and mental retardation [21, 22]. The centromeres are also substrates for rearrangements that are associated with structural genetic abnormalities in cancer where, in the same fashion as evolution, selection occurs at the cellular level in an accelerated manner (for review see Goncalves dos Santos Silva et al [11]).

Telomere dysfunction resulting from eroded or unprotected telomere structures has been shown to induce CIN [23, 24]. Unprotected telomeres whether through erosion by progressive cell division or telomere capping malfunction have been shown to recombine and illegitimately repair through the non-homologous end joining (NHEJ) double-strand-break (DSB) repair pathway [25]. Such illegitimate telomeric repair is known to generate telomere fusions and aggregates which form chromosomal bridges leading to continued rounds of DSB creation and mutational repair [26-29].

In melanoma, the possibility of correlating a specific pathological stage with corresponding genetic alterations has allowed the experimental study of different stages of tumor progression, but until now the majority of experimental models of tumorigenesis utilize chemical or environmental carcinogens and genetic manipulations to study the progression of this disease (for reviews see Foijer [30] and Wu [31]). Here, we used an experimental model of melanocyte malignant transformation that utilizes forced sequential cycles of adhesion blockage as a transforming factor in which the non-tumorigenic melanocyte lineage melan-a was cultured in suspension for 96h [32]. Progressive morphologic alterations were observed

along each cycle of anchorage blockage culminating in the establishment of non-tumorigenic melan-a sublines corresponding to intermediate phases of malignant transformation found after 2 and 4 cycles of anchorage blockade (2C and 4C lineages, respectively). In addition, distinct tumorigenic lineages, both slow-growing (4C3-) and fast-growing melanoma lineages (4C3+) were established from spheroids formed after a new anchorage blockade cycle of 4C cells. Oncogenic cell signaling pathways generated through sequential anchorage blockage cycles offer a novel opportunity to study the mechanisms for the decline of genomic integrity specifically in melanoma. Our study suggests that this transformation is driven by changes in telomere length and stability, centromere stability and overall karyotype evolution.

Materials and Methods

Cells and Cell Culture Conditions

The nontumorigenic murine melanocyte lineage, melan-a was grown in RPMI (pH6.9; Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 200 nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (PMA; Tocris, Ellisville, MO) at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Melan-a cell sublines 2C, 4C, 4C3-, 4C3+, established after submitting melan-a cells to sequential substrate adhesion impediment cycles were cultured using the same conditions as the parental cell line but without the addition of PMA. The

Melan-a cell line appears in this work as a near triploid cell with a median of 54 chromosomes, which is probably a result of the time in culture, since this cell line has first been described as having a normal diploid karyotype [33]. Cells were maintained at a density of around 10^5 to 10^6 cells/ml.

Cell Fixation and Chromosome Preparations

Cells were harvested and spun down at 800 rpm for 10 minutes and, for chromosome preparation, they were resuspended in 5 ml of 0.075 M KCl for 30 minutes at room temperature. For chromosome fixation, the drop fixation method [34] was used. For the fixation of 3D interphase nuclei, all cells were cultured on glass slides until subconfluence and 3D fixed using 3.7% formaldehyde/phosphate-buffered saline for 15 minutes at room temperature.

Immunofluorescence (IF)

Different cell lines were cultured on glass coverslips (Glasst cnica, Sao Paulo, Brazil) until subconfluence and fixed in 1% paraformaldehyde in PBS. Fluorescent detection of c-Myc protein was performed as described in Garagna et al [35] by using a polyclonal anti-c-Myc antibody (N262; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and a goat anti-rabbit IgG FITC antibody, at 1:100 and 1:1000 dilutions respectively. Analysis was performed by using a Bio-Rad 1024 UV confocal system attached to a Zeiss Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada), with a 63x/1.4 oil objective lens.

Quantitative Fluorescence in Situ Hybridization (Q-FISH)

On slides with 3D interphase nuclei fixed, telomere FISH protocol was performed as described above by using Cy3-labeled peptide nucleic acid (PNA) probes (DAKO, Glostrup, Denmark). At least 30 nuclei were analyzed for each cell line. AXIOVISION 4.6 (Carl Zeiss, Inc. Canada) with deconvolution module was used. For every fluorochrome, the final 3D images consist of a stack of 50 individual images with a sampling distance of 200 nm along the z and 107 nm in the xy direction. 3D Image acquisition was performed on at least 30 nuclei per cell line using an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada). The constrained iterative algorithm was used for deconvolution [36]. Note that telomeric signals at a distance of ≤ 200 nm will be detected as one signal [37]. Telomere measurements were done with TELOVIEW™ version 2.3 [38].

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

PNA-FISH was performed on two-dimensional (2D) metaphase samples derived from T38Ha primary mouse fibroblasts, melan-a, 4C3- and 4C3+. A Cy3-labelled PNA telomeric probe was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark) and a PNA human centromeric probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was custom-made. The sequences and the method description were described

elsewhere [39]. Additional FISH experiments were performed using metaphase chromosomes of the 4C3- cell line and a mouse pan-centromeric probe conjugated with FITC from Cambio (Dry Drayton, Cambridge, UK). The experiment was carried out as described by Mai & Wiener [40]. All slides were imaged the following morning to avoid changes in imaging conditions. 3D image acquisition was performed on 20 metaphases per sample using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada).

Spectral Karyotyping (SKY) Analysis

SKY was performed using the ASI (Applied Spectral Imaging, Vista, CA, USA) kit for mice in accordance with the supplier's hybridization protocols. We used the Spectra Cube (ASI) on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective and the Case Data Manager 4.0 software (ASI) for PC to perform analyses. A minimum of 20 metaphases was examined for each cell line.

Proliferation Rates Index - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

For measurements of cell viability, $2,5 \times 10^3$ cells/100 μ l medium were plated into each well of 96-well plates. After 24, 48, 72 or 96 h incubation, 10 μ l MTT solution

(Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added into each well, and plates were incubated for 4 h at 37°C, and 450 nm UV absorbance of each sample was measured in a microplate reader. The assay was done in triplicate wells and *p* values of <0.05 were considered significant.

Tumorigenicity Assay

Cells were harvested after trypsin treatment of subconfluent monolayers, counted, and then suspended in 1x PBS. Melan-a cells and their derived clones (1×10^6 cells) were injected subcutaneously in the flank of syngeneic 6- to 8-week-old C57Bl/6 female mice and determined as follows: $[\text{maximum diameter} \times (\text{minimum diameter})^2]/2$. Animals were kept under 12-hour daylight cycles, without food or water restriction, and checked daily for tumor development. Each experimental group consisted of at least five animals (CEP 0738.07). The *p* value for the overall study was <0.001.

Experimental Metastasis Assay

Cells of subconfluent cultures were trypsinized, suspended in RPMI with 10% fetal calf serum, spin down, suspended in PBS, counted, and adjusted to the necessary concentration. Cells (2×10^5) in 0.1 ml of PBS were injected into the lateral tail vein of syngeneic C57BL/6 female mice with a 27-gauge needle. Lungs were harvested 20, 40, 60 and 80 days later and metastatic foci in the

lungs identified. The experimental groups consisted of fifteen animals for the 4C3- cell line and seven for the 4C3+ cell line.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

Telomerase activity of cell lysates was analyzed by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay with a TRAPeZe® Telomerase Detection Kit –S7700 – Chemicon (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each reaction was carried out by using 0.05 µg of extract. PCR products were electrophoresed in a 12,5% acrylamide gel (0.5×TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer using the protean II xi gel system (Biorad, Hercules, CA, USA). Gels were silver stained according to the protocol described elsewhere [41]. Images were captured by using FinePix S9000 digital camera (Fujifilm, Minato, Tokio, Japan).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from cells with TRizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). One microgram of RNA was reverse-transcribed to cDNA with Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The resulting single-strand cDNAs were amplified by PCR in a reaction mixture containing 75 mM Tris-HCl pH9.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.4 µM of each primer, 1 unit of BioTools DNA Polymerase

- Recombinant from *Thermus thermophilus* (BioTools, Madrid, Spain). The thermal cycling conditions were as follows: initial 5 minutes at 94°C, followed by cycles (30 for Tert and 20 for beta-actin amplifications) of 94°C for 45 seconds, 65°C for 45 seconds and 72°C for 60 seconds. The beta-actin mRNA was used as control. PCR fragment amplification was confirmed by 1% agarose gel. The PCR primers were as follow: Tert Forward 5'CATGGGTGCCAAGTCCTGCTC3'; Tert Reverse 5'CTGTGCAGGCGGAGCAAATCC3'; Actin Forward 5'CGAGGCCCCAGAGCAAGAGAG3'; Actin Reverse 5'AGGAAGAGGATGCGGCAGTGG 3'.

Statistical Analysis

A Student's test with two tails was used to calculate the statistical significance of the observed differences in telomere length. To calculate the differences in c-Myc and Tert expression the bands intensity were quantified using ImageJ 1.38 software (Image Processing and Analysis in JAVA, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and *p* values were determined by One-way analysis of variance (ANOVA). To calculate the statistical significance of the proliferation index and tumorigenesis assay, one-way ANOVA was used with Tukey's post test. For the comparison of survival curves, Logrank test was performed. For chromosome rearrangements and changes in ploidy we used nonparametric Kruskal-Wallis with Dunn's post test. GraphPad Prism

version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA,
www.graphpad.com, was used for the all calculations.

Results

Characterization of our mouse melanoma model

Cell viability and proliferation rates were characterized using the colorimetric MTT assay. The non tumorigenic cells (melan-a, 2C and 4C) showed a similar *in vitro* proliferation rate. The tumorigenic cell lines 4C3- and 4C3+ showed a higher proliferative ability than melan-a, 2C and 4C ($p < 0.0001$) (Figure 1A). All cell lines constitutively expressed c-Myc protein (Figure 2 Supplement). Due to these significant differences in the cell proliferation *in vitro*, we examined the consequences of their different proliferation rates *in vivo*. As predicted and previously described, melan-a, 2C and 4C did not cause tumor formation [42,43] whereas the injection of 4C3- cells led to tumor formation with a growth rate roughly less than half of tumors produced by the inoculation of 4C3+ cells (Figure 1B). Additionally, the latency time for tumor development after inoculation of the 4C3- cell line was almost twice the time of 4C3+ being 25 and 14 days respectively (Figure 1C)

Next we determined the metastatic capacity of 4C3- and 4C3+ cell lines. 2×10^5 cells were inoculated intravenously and lungs were harvested 20, 40, 60 and 80 days later to check for metastatic foci. After just 20 days every animal that was inoculated with 4C3+ cell lines had several metastatic foci in their lungs (Figure 1D, white arrow). Conversely, metastatic foci were not found in the lungs

of animals that were inoculated with 4C3- cell line even after 80 days after injection (Figure 1E, F and G).

Telomere shortening in the presence of *TERT* expression and telomerase activity.

To analyze the telomere length on our model we performed quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) on 3D fixed interphase nuclei with a Cy3 telomeric PNA probe. To this end thirty nuclei were analyzed per cell line. Telomere length progressively decreased through the melanoma genesis model as illustrated by the column scatter graph in Figure 2A. The immortalized cell line, melan-a, and the non-tumorigenic cell line (2C, 4C) showed highly heterogeneous telomeres sizes, while we noted a smaller difference in size distribution in the tumorigenic ones (4C3- and 4C3). In comparison to the parental cell (melan-a), the variation in telomere length was very significant for 2C ($p < 0.0005$), significant for 4C ($p < 0.009$) and highly significant for 4C3- and 4C3+ ($p < 0.0001$). In all cases the differences in telomere length with respect to the metastatic melanoma cell line (4C3+) were highly significant ($p < 0.0001$).

The differences found in telomere length prompted us to analyze the telomerase activity in the model (Figure 2B). Since the Tert subunit seems to be the main rate-limiting determinant of telomerase and it has been suggested to be an indicator of its activity [44, 45], we opted to analyze the expression of this

gene by RT-PCR. Tert was then quantified for all cell lines involved in this study, and no statistical differences among the cells were found (Figure 2C).

The loss of telomere-specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH) signals was examined using the telomere probe in metaphase spreads of primary cultures of mouse T38Ha primary fibroblasts (used as a normal control – data not shown), melan-a (data not shown) and on the non-metastatic and metastatic melanoma cell lines (4C3- and 4C3+ respectively) (Figure 3).

All cell lines but the normal control displayed marked loss of telomere-specific signals, when compared to the control ($p < 0.0001$). The highest number of signal free ends was observed in 4C3+ where more than 30% of the ends had no distinguishable telomere signal ($p < 0.001$). While melan-a showed telomere free ends on 9% of potential telomere signals ($p < 0.05$), the non-metastatic cell line 4C3-, showed telomere free ends on 15% ($p < 0.001$). All together, these results indicate ongoing telomeric instability in this model.

Centromere instability and fragmentation

In our work centromeric fragments were first observed by dual-color FISH (Figure 3A) and by inverted DAPI during the SKY analysis (Figure 1 supplemental). In order to confirm these observations, a mouse centromeric probe was then hybridized against the same slides used for SKY. The centromere hybridization matched the structures previously identified by inverted

DAPI (Figure 4A and B). The number of centromere fragments increased from melan-a to 4C3-, becoming negligible in 4C3+ ($p < 0.0001$) (Figure 4C).

Some of the centromere fragments showed features of mini chromosomes or double minutes containing four telomeric signals (Figure 3B). In addition, a non-random Robertsonian (Rb) translocation was noted in 4C3+ cells involving only chromosomes 8 and 12 (Supplemental Table 1) suggesting either non-random centromere instability or a selective proliferation advantage of cells carrying this Rb chromosome combination during the acquisition of metastatic potential.

Karyotype evolution

While the melan-a cell line displayed no structural aberrations based on SKY analysis, the 2C, 4C and 4C3- cell lines displayed common structural aberrations of T(8;14), T(14;8) and Fus(8.6). The metastatic melanoma cell line (4C3+) had a more heterogeneous karyotype, indicative of higher instability in the latter cells. Supporting the case for increased genomic instability in the 4C3+ cell line, Robertsonian fusions were found in 100% of metaphases analyzed from 4C3+ cells (Figure 5B and Table 1, Supplemental Figure 1). Deletions of chromosome 11 were the only shared chromosomal abnormalities between 2C, 4C, 4C3- and 4C3+ cell lines (Table 1). Whereas the total number of chromosomes increased in the 4C3+ cell line to 72, the number of centromere fragments decreased compared to all other cell lines. In contrast to 4C3+, the

4C3- cell line showed on average fewer chromosomes, 53 per cell, with an increased number of centromere fragments ($p < 0.0001$) (Table 1 and Figure 4C).

Discussion

Our group has recently established a melanocyte malignant transformation model where a murine-non-tumorigenic melanocyte cell line (melan-a) was submitted to sequential cycles of cell anchorage blockade resulting in the establishment of non-tumorigenic melan-a sublines and several melanoma cell lines [46,47]. In melanoma the possibility of correlating a specific pathological state with several corresponding genetic alterations has allowed the experimental study of different stages of oncogenesis. Our cell adhesion blockage model allows for investigating early stage tumor progression unlike other chemical transformation models or melanoma tissue samples.

Our results suggest that adhesion blockage cycles initiate telomere and centromere driven CIN that becomes the causative factors in genomic instability and early tumor development. It is widely supported that telomere dysfunction could play a causal role in early carcinogenesis by instigating bridge-breakage-fusion type chromosomal instabilities, thus promoting neoplastic transformation [48,49].

To study the timing of the occurrence of telomere shortening during melanocyte transformation, we analyzed in our model the profile of telomere length by Q-FISH. We found that telomere length significantly decreased as

additional rounds of cell anchorage blockages were performed. Additionally, variation among telomere length for individual cell lines significantly decreased in parallel with telomere length as subsequent cell anchorage blockages were performed. The development of smaller and less variable sized telomeres is described in a multitude of cancers [50]. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation.

Indeed, telomere shortening and telomerase activation are the most prevalent aberrations in pre-cancerous lesions [51]. Telomere length abnormalities have been described in pre-invasive breast lesions [52], pancreas [53], prostate [54-56], and many different types of human epithelial cancer precursor stages [57]. Likewise, telomerase activity has been detected early in carcinogenesis [58-60].

In addition, an *in vivo* study in human breast cancer found that cancer cells continue to experience telomere loss and anaphase bridges even after expression of telomerase. These data suggest that telomerase expression alone is not sufficient to maintain telomeres at non-critical length. Similarly, in our mouse melanoma model, we observed telomere shortening in parallel to genomic instability in the context of telomerase positive cell lines. Additionally, several lines of evidence suggest a protective function for telomerase apart from its role in telomere elongation [61,62]. In recent work Xu and Blackburn (2007) [63] described a distinct class of extremely short telomeres (t-stumps) in human cancer cells with active telomerase.

Apart from telomere abnormalities, our melanoma displays an abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Those centromere fragments increase from melan-a to 4C3- almost disappearing in 4C3+ where the Rb fusions are present. Many centromeric fragments contained four telomere signals, and could be described as a mini chromosomes or double minutes. These structures were likely produced by the fusion of two individual centromere fragments where the shortening of telomeres would lead to a telocentric fusion creating two chromosomes with terminal deletions and one centromere fragment with four telomeric signals. This mechanism is supported by the fact that the rate of telomere free ends increases as additional rounds of cell adhesion blockages are performed.

Rb translocations in humans constitute the most common structural genetic abnormalities in aborted fetuses and newborns [64-66]. Moreover, human Rb translocation chromosomes have been found as acquired or constitutional genetic lesions in hematological cancers [67,68] in solid tumors [69,70] and at the onset of acute myelogenous leukemia [71]. The presence of Rb fusions in our model correlates with oncogenesis as the metastatic cell line is the only cell line with the Rb structure.

Our results describe a melanoma model whereby repetitive cycles of cell anchorage blockage generate chromosomal instability with a cytological signature of centromere breakage and telomeric loss. This phenotype in immortalized melanocyte melan-a cells that seem to have initial genomic or

epigenomic insults. This unique model allows for molecular investigations into the early stages of development for melanoma.

Acknowledgement. The authors acknowledge funding support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (SM) and the CIHR Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training” (AG).

References

1. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD,
2. Weinstock, MA (1999). Do sunscreens increase or decrease melanoma risk: an epidemiologic evaluation. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **4**, 97-100.
3. Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G, Lissia A, Tanda F, Castello G (2003). Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res.* **13**, 167-170.
4. Hussein MR (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol.* **57**, 797-801.
5. Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649.
6. Jemal, A, Murray, T, Samuels, A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ (2003). Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* **53**, 5-26.
7. Hussein MR, Sun M, Roggero E, Sudilovsky EC, Tuthill RJ, Wood GS, Sudilovsky O (2002). Loss of heterozygosity, microsatellite instability, and mismatch repair protein alterations in the radial growth phase of cutaneous malignant melanomas. *Mol Carcinog.* **34**, 35-44.

8. Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, Sudilovsky EC, Wood GS, Sudilovsky O. Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. *J Cutan Pathol.* **28**, 343-350.
9. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Säll T, Mitelman F, Horsman D (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* **108**, 57-65.
10. Schulten HJ, Gunawan B, Otto F, Hassmann R, Hallermann C, Noebel A, Füzési L (2002). Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet Cytogenet.* **133**, 134-141.
11. Gonçalves Dos Santos Silva A, Sarkar R, Harizanova J, Guffei A, Mowat M, Garini Y, Mai S. (2008). Centromeres in cell division, evolution, nuclear organization and disease. *J Cell Biochem.* **104**, 2040-58.
12. Yue Y, Grossmann B, Ferguson-Smith M, Yang F, Haaf T (2005). Comparative cytogenetics of human chromosome 3q21.3 reveals a hot spot for ectopic recombination in hominoid evolution. *Genomics* **85**, 36-47.
13. Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005). Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* **161**, 159-163.
14. Shaw CJ, Lupski JR (2004). Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* **1**, R57-64.

15. Chantot-Bastaraud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP (2007). Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod.* **13**, 55-59.
16. Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B (2006). TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* **38**, 122-127.
17. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005). Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* **111**, 297-304.
18. Anelli L, Albano F, Zagaria A, Liso A, Cuneo A, Mancini M, Liso V, Rocchi M, Specchia G (2004). Pericentric chromosome 8 inversion associated with the 5'RUNX1/3'CBFA2T1 gene in acute myeloid leukemia cases. *Ann Hematol.* **84**, 245-249.
19. Pedrazzini E, Cerretini R, Noriega MF, Narbaitz M, Palacios MF, Negri P, Bengió R, Slavutsky I (2006). Inversions of chromosomes 2 and 6 in mantle cell lymphoma. Cytogenetic, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet.* **167**, 164-167.
20. Mathew S, Dalton J, Riedley S, Spunt SL, Hill DA (2002). Complex t(X;18)(p11.2;q11.2) with a pericentric inversion of the X chromosome in an adolescent boy with synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **132**, 136-140.
21. Ulucan H, Akin R, K sem M, G l D (2006). De novo pericentric inversion of chromosome 5 in a girl with mental retardation and unilateral ear malformation. *Am J Med Genet A.* **140**, 298-299.

22. Ramadevi AR, Naik U, Dutta U, Srikanth, Prabhakara K (2002). De novo pericentric inversion of chromosome 4, inv(4)(p16q12) in a boy with piebaldism and mental retardation. *Am J Med Genet.* **113**, 190-192.
23. Masuda A, Takahashi T. (2002) Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene.* **21 (45)**, 6884-97
24. de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19(18)**, 2100-10.
25. Riha K, Heacock ML, Shippen DE. (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu Rev Genet.* **40**: 237-77
26. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztejn Z, Kuttler F, Chuang TC, Moshir S, Mougey V, Chuang AY, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9613-9618.
27. Mai S, and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327-1331.
28. Caporali A, Wark L, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398-1406.

29. Guffei A, Lichtensztejn Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, and Mai S (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**, 578-588.
30. Foijer F, Draviam VM, Sorger PK (2008). Studying chromosomal instability in the mouse. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 73-82
31. Wu X, and Pandolfi PP (2001). Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* **11**, S2-9.
32. Duesberg P, and Rasnick D (2000). Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**, 81–107.
33. Bennett DC, Cooper PJ, and Hart IR (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* **39**, 414 – 418.
34. Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire. Eds. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 55–67.
35. Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, and Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci.* **114**, 4429–4434.
36. Schaefer LH, Schuster D, and Herz H (2001). Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to threedimensional fluorescence microscopy. *J Microsc.* **204**, 99–107.

37. Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, and Mai S (2004). The threedimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* **3**, 2–12.
38. Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC, Chuang AY, Wark L, Young IT (2005). Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A.* **67**, 144-150.
39. Cleveland DW, Mao Y, and Sullivan KF (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**, 407-421.
40. Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire. Eds. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 55–67.
41. Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, and Cerutti JM (2002). TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 65-68.
42. Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, and Jasiulionis MG (2006). Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* **8**, 231-241.
43. Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, and Jasiulionis MG (2005). Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer* **114**, 356-363.

44. Kanaya T, Kyo S, Takakura M, Ito H, Namiki M, Inoue M. (1998). hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*. **78(5)**, 539-43.
45. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. (1998). Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet*. **19(12)**, 182-6.
46. Soler D, Genescà A, Arnedo G, Egozcue J, Tusell L (2005). Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* **44**, 339-350.
47. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641-645.
48. De Vos WH, Hoebe RA, Joss GH, Haffmans W, Baatout S, Van Oostveldt P, Manders EM. (2009). Controlled light exposure microscopy reveals dynamic telomere microterritories throughout the cell cycle. *Cytometry A*. **75(5)**, 428-39.
49. Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausson KA, and Soria JC (2008). Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol*. **66**, 99-117
50. Meeker AK, Argani P (2004). Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 285-296.
51. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH,

Maitra A(2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* **161**,1541-1547.

52. Joshua AM, Evans A, Van der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, Squire JA (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim Biophys Acta.* **1785**, 156-181.

53. Vukovic B, Beheshti B, Park P, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA (2007). Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* **116**, 1-11.

54. Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, De Marzo AM (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* **62**, 6405-6409.

55. Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* **10**, 3317-3326.

56. Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* **11**,2074-2082.

57. Gulmann C, Lantuejoul S, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E (2005). Telomerase activity in proximal and distal gastric neoplastic and preneoplastic lesions using immunohistochemical detection of hTERT. *Dig Liver Dis.* **37**, 439-445.

58. Lancelin F, Anidjar M, Villette JM, Soliman A, Teillac P, Le Duc A, Fiet J, Cussenot O (2000). Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *BJU Int.* **85**, 526-531.
59. de Lange T (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110.
60. de Lange T (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540.
61. Kim M, Xu L, Blackburn EH (2003). Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties. *Exp Cell Res.* **288**, 277-287.
62. Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3723-3728.
63. Xu L, Blackburn EH (2007). Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Mol Cell.* **28**, 315-327.
64. Kim SR, Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test.* **6**, 163-168.
65. Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* **87**, 81-83.
66. Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet.* **33**, 44-54.

67. Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 151, 14-35.
68. Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 132, 79-80.
69. Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 7-16.
70. Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schröck E, Hilgenfeld E, Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 349-363.
71. Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, Takeyama H (2004). Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med.* 43, 508-511.

Figure and Tables legends.

Table 1. Summary of the rearrangements found throughout melanocyte malignant transformation. The data given are derived from the analysis of 20 metaphases. The braces indicate how often each rearrangement was seen in 20 metaphases. Only rearrangements that were present in more than 2 metaphases are presented here. * Median of chromosome number from 20 metaphases. ** Absence or presence of centromere fragments in the metaphases, braces represent the median of fragments found in the cell lines studied.

Figure 1 – Characteristics of the model – **A**: Cell viability was determined by the MTT assay in triplicate. **B**: Tumorigenicity assay *in vivo*. Mice were subcutaneously injected with 2×10^5 cells. *Bars*: SD of the mean of 5 animals per group. *** $p < 0.0001$. **C**: Survival curves (100% x number of mice alive after each day/total number of mice at day 0) for mice inoculated with 4C3- and 4C3+. Experimental metastasis assay, 2×10^5 4C3+ cells (**D**) and 4C3- (**E**, **F**, and **G**) were injected via the caudal vein. Mice were sacrificed 20 (**D** and **E**), 40 (**F**) and 80 (**G**) days later, their lungs were removed and metastatic foci in the lungs were identified and some are indicated in the panel **D** by the white arrows. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 2 – Shortening of telomeres in the presence of telomerase activity – **A**: Telomere length distribution in the model as determined by PNA telomere Q-FISH. The vertical lines and the arrows highlight the decreased heterogeneity of telomere lengths through the melanoma genesis model. **B**: Tert expression analyzed in melan-a cells and melan-a-derived cell lines by RT-PCR, β -actin expression was used as a normalization control. No significant difference was observed between the samples. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 3 – Robertsonian Fusions and other Centromere Abnormalities - Representative FISH images of 4C3- and 4C3+ metaphases hybridized with probes against centromere and telomere. 4C3- cell line is shown in panels **A**, **B** and **C**. Note the centromere fragment in the magnification box, it shows under the centromere staining (**A**) four telomeric signals (**B**). In panels **D**, **E** and **F**, the representative metaphase of 4C3+ cell line. Rb fusion is shown on the magnification boxes. Attention to the fact that under the centromeric fusion point (**D**) there is no telomeric signals (**E**). **A** and **D**: centromeric signals only; **B** and **E**:

telomeric signals only. Note that in both cell lines chromosomes with missing signals are present, but 4C3+ had the highest percentage of telomere free ends (see text). 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 4 – Centromere fragments - Multicentric chromosomes and centromere fragments are visible by FISH. Metaphases of 4C3- cell line were hybridized using a mouse pan-centromeric probe conjugated to FITC (green) (Cambio, UK). **A**: inverted DAPI image; **B**: pan-centromeric probe. White squares highlight the centromere fragments and they are shown on the magnification boxes in both panels. **C**: the number of centromere fragments in all the cell lines. Note that the number increase from melan-a to 4C3-, almost disappearing on 4C3+. 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 5 – Chromosome rearrangements. A total of 20 metaphases were examined for each cell line. **A**: Number of rearrangements found in each cell line per metaphase; **B**: Number of Rb chromosome found per metaphase in the melanoma model.

Supplemental material

Supplemental Figure 1 – Karyotype evolution - SKY of metaphases derived from cell lines corresponding to phases of melanocyte malignant transformation. Representative images from SKY are shown: Panel (A) melan-a; Panel (B) 2C; Panel (C) 4C; Panel (D) 4C3- and Panel (E) 4C3+. White arrows point to Rb fusion chromosomes. Note the increase of abnormalities through the model and the increase of chromosome number in the 4C3+ cell line. Each panel shows a representative image for each cell type; however, layout is the same for all. Left panel: the raw image of a metaphase; central panel: the classified image of the metaphase; right panel: the inverted DAPI-banded image of the metaphase; and larger panel: the karyotype table of the metaphase. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Supplemental Figure 2 - Indirect Immunofluorescence using a c-Myc-specific antibody. c-Myc staining in the melanoma model. Each panel shows a representative image for each cell type; however, the layout is kept constant. **Left column:** c-Myc staining (Alexa 488, Molecular Probes), **central column:** nuclear staining (DAPI), **right column:** merge images. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line. Bars: 20µm.

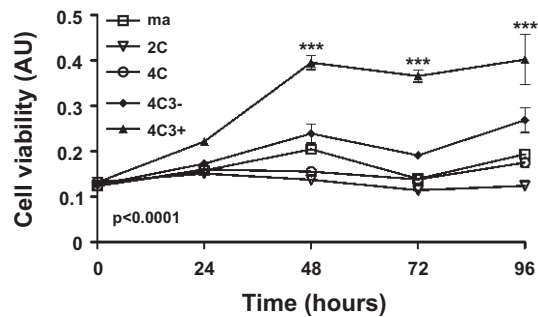
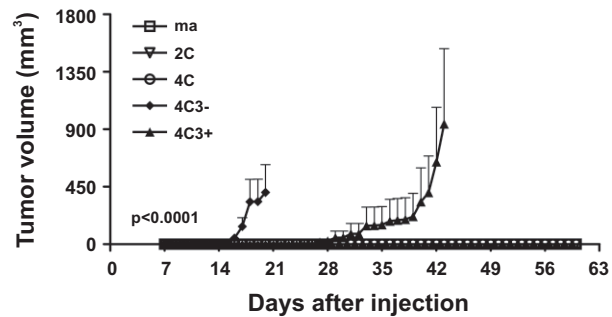
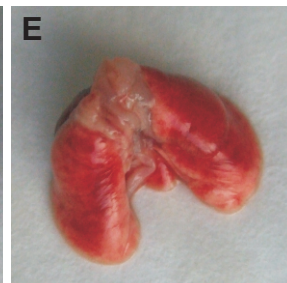
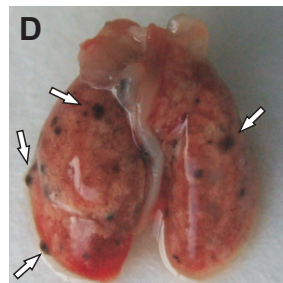
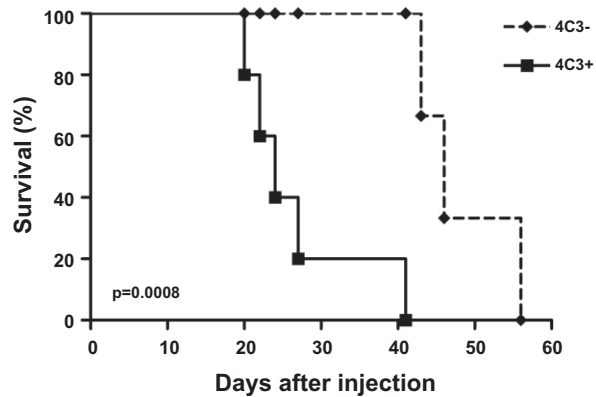
Supplemental Table 1. Summary of chromosomes involved in the formation of Rb chromosomes in 4C3+ cells in a non-random manner. The numbers given are derived from the analysis of 20 metaphases. All metaphases carried at least one Rb chromosome, fifteen of these 20 metaphases carried two or more Rb fusions. The involvement of each chromosome in the formation of Rb chromosomes is given, and the respective significance is indicated. Fifteen of twenty metaphases (75%) carried one Robertsonian fusion involving chromosomes 8 and 12, while 100% of the metaphases analyzed carried at least one Rb(12.12). For further details, see text and Material and Methods section.

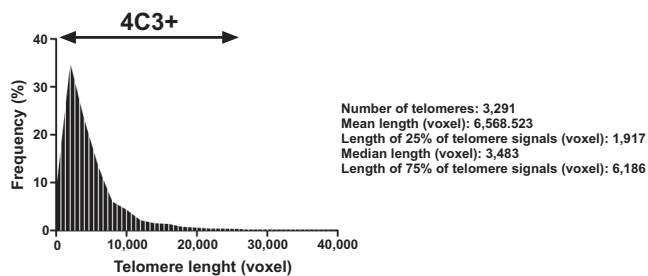
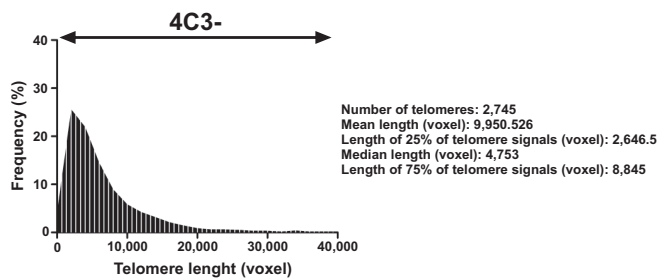
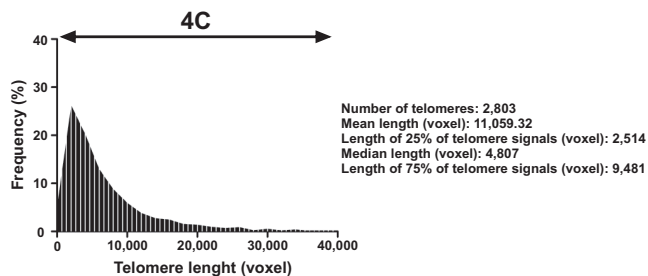
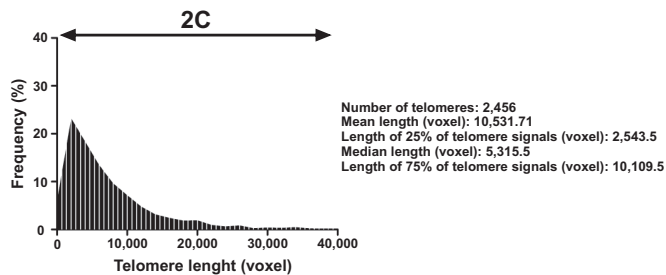
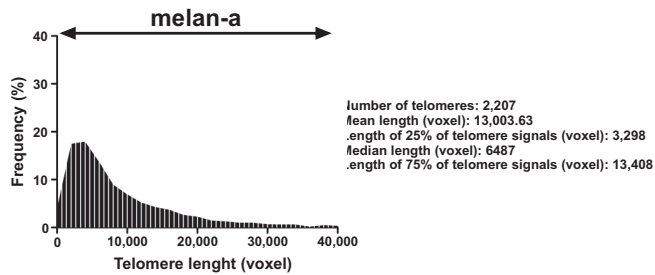
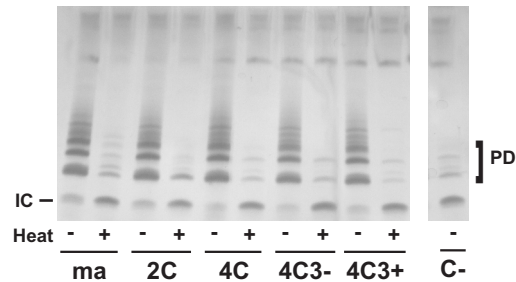
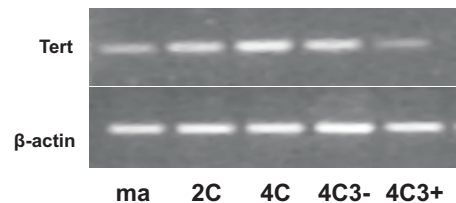
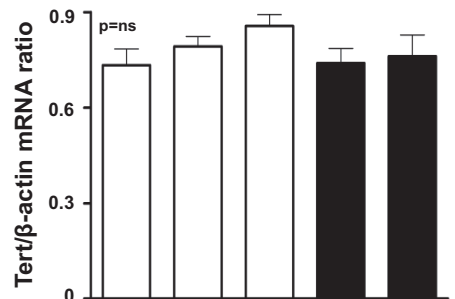
Table 1.

Cell line	Number of Chromosomes*	Centromere fragments**	Aberration chart (structural aberrations)
melan-a	54	yes {1}	none
2C	51	yes {1}	T(8;14){13} / T(14;8){20} / F(8;6){19} / Del(11){18}
4C	51	yes {1}	T(8;14){19} / T(14;8){21} / T(15;X){18} / F(8;6){4} / Del(11){18}
4C3-	53	yes {2}	T(8;14){18} / T(14;8){21} / T(5;18){9} / T(15;X){18} / F(8;6){15} / Del(11){17}
4C3+	72	yes {0}	T(1;16){18} / T(8;1){17} / T(1;12){15} / T(3;13){20} / T(13;3){20} / T(X;15){19} / T(10;16){16} / Rb(8.12){15} / Rb(12.12){26} / Del(1){18} / Del(6){12} / Del(11){20}

Table 1 supplemental

Chromosome Number	Times Involved in Rb Fusions	<i>P</i>
8	15	<0.01
12	67	<0.001

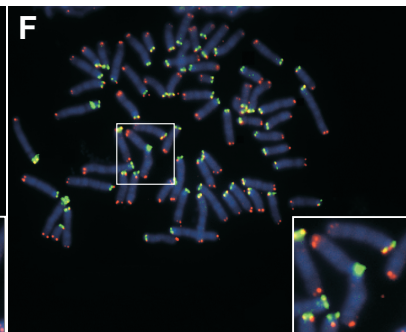
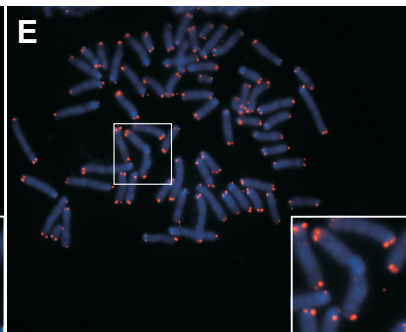
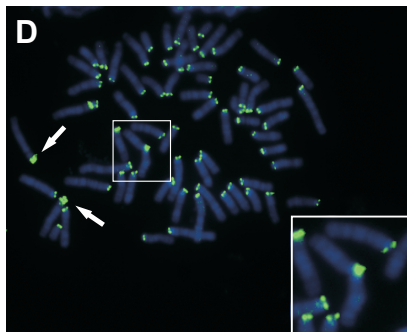
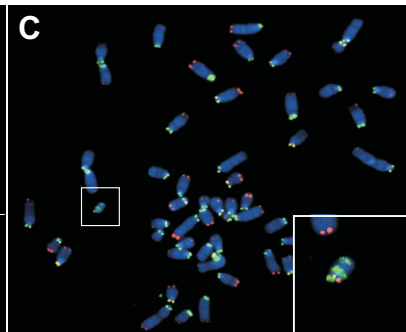
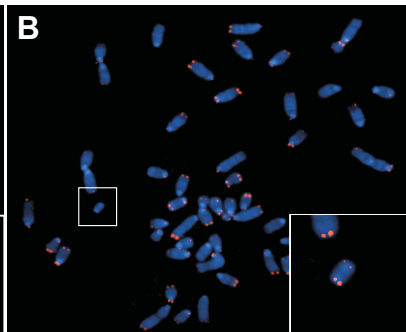
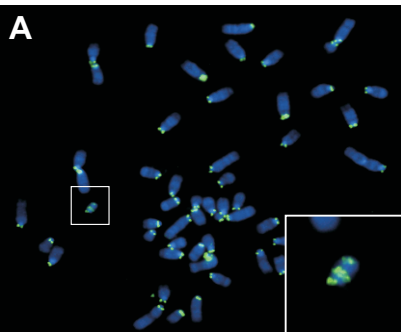
A**B****C**

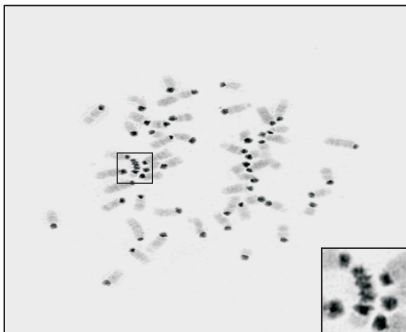
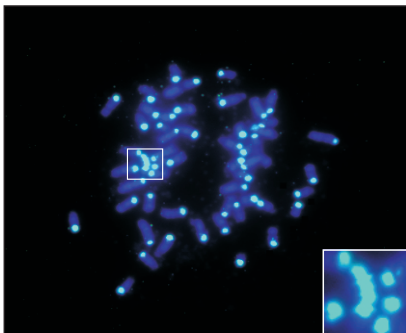
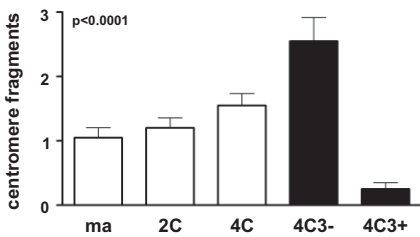
A**B****C**

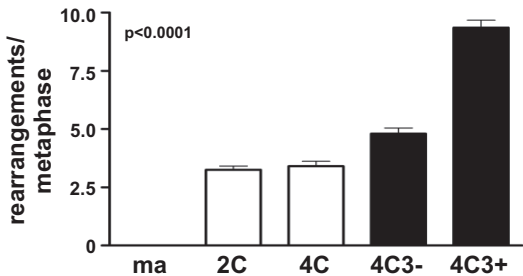
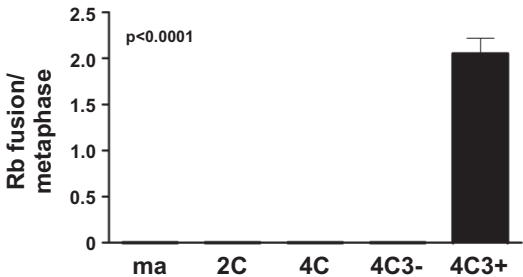
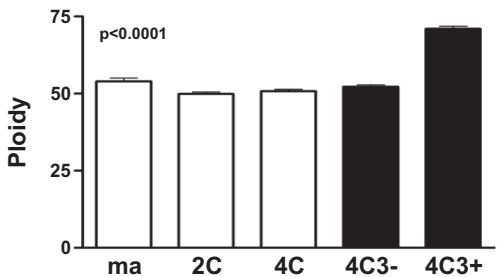
Centromere

Telomere

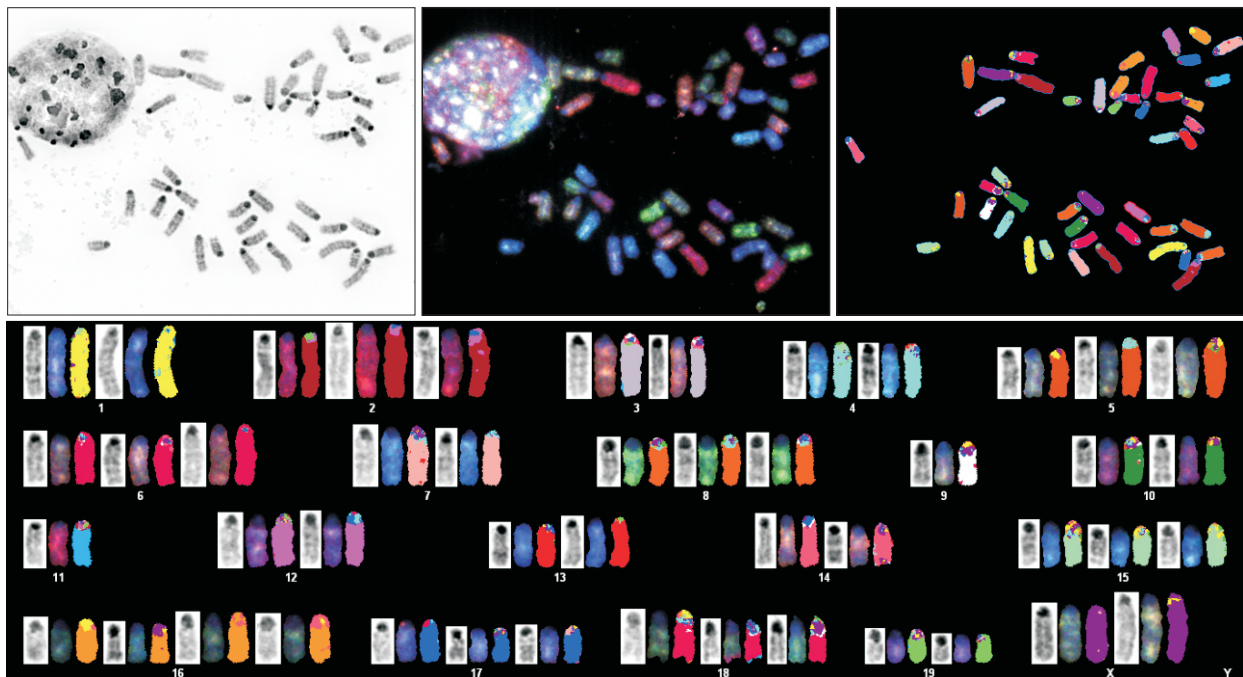
Merge



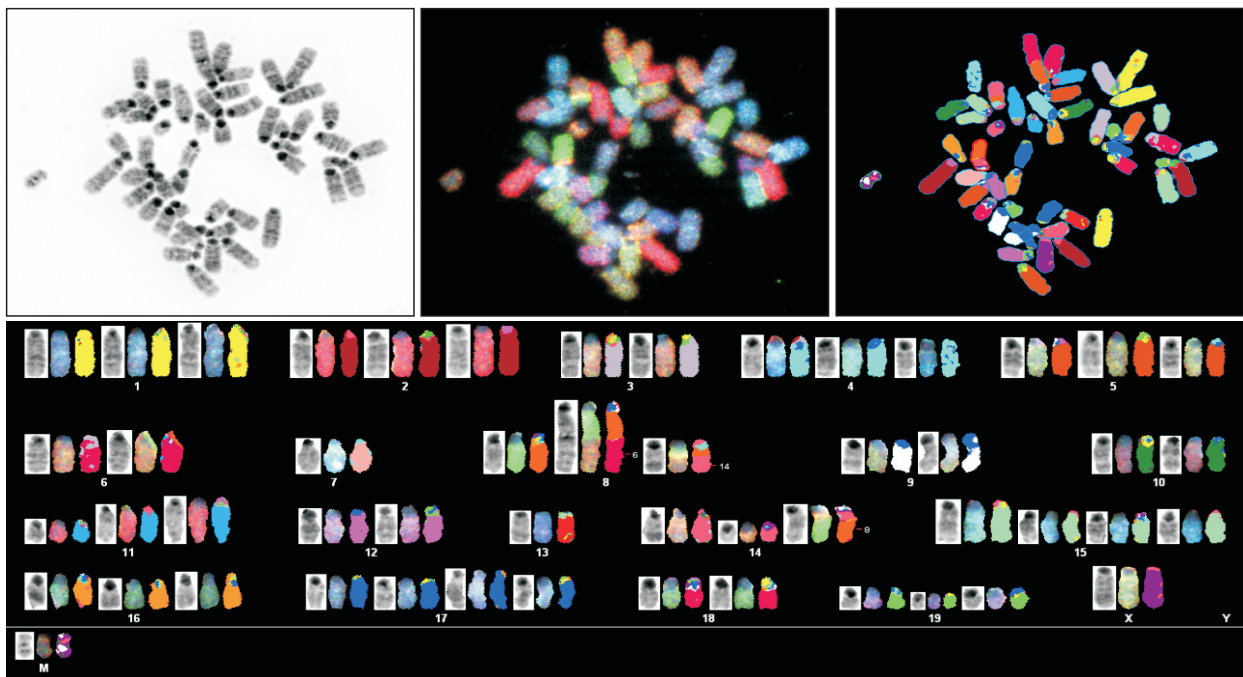
A**B****C**

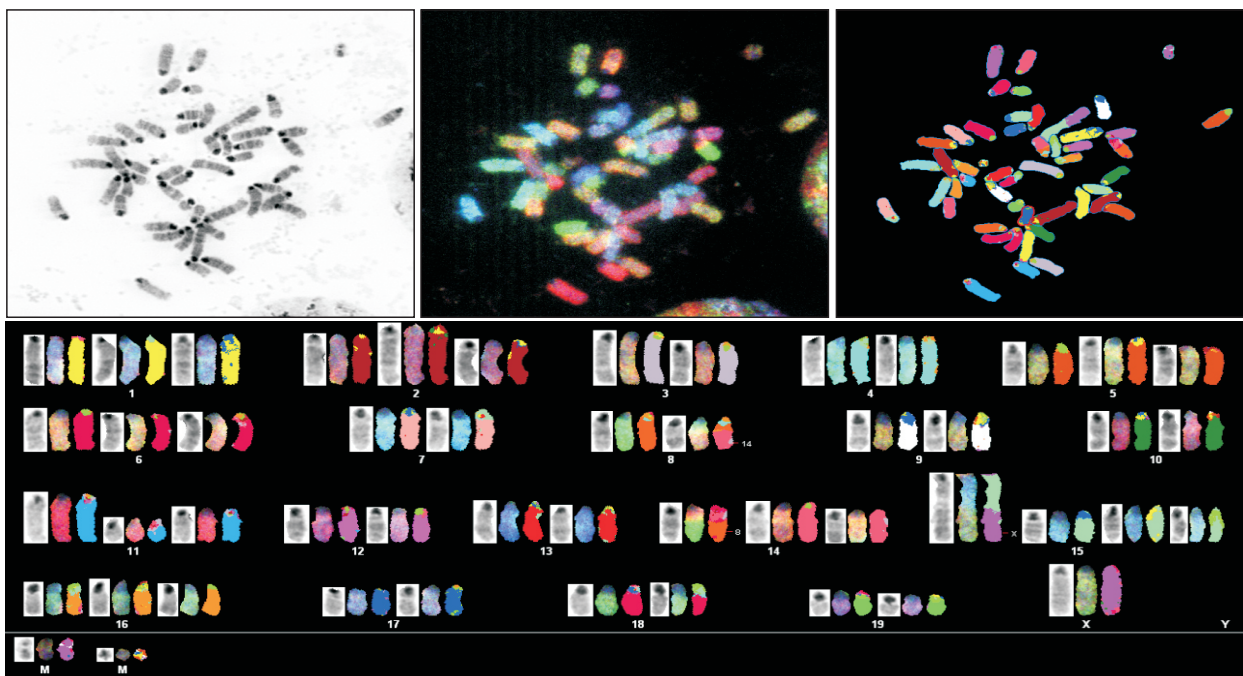
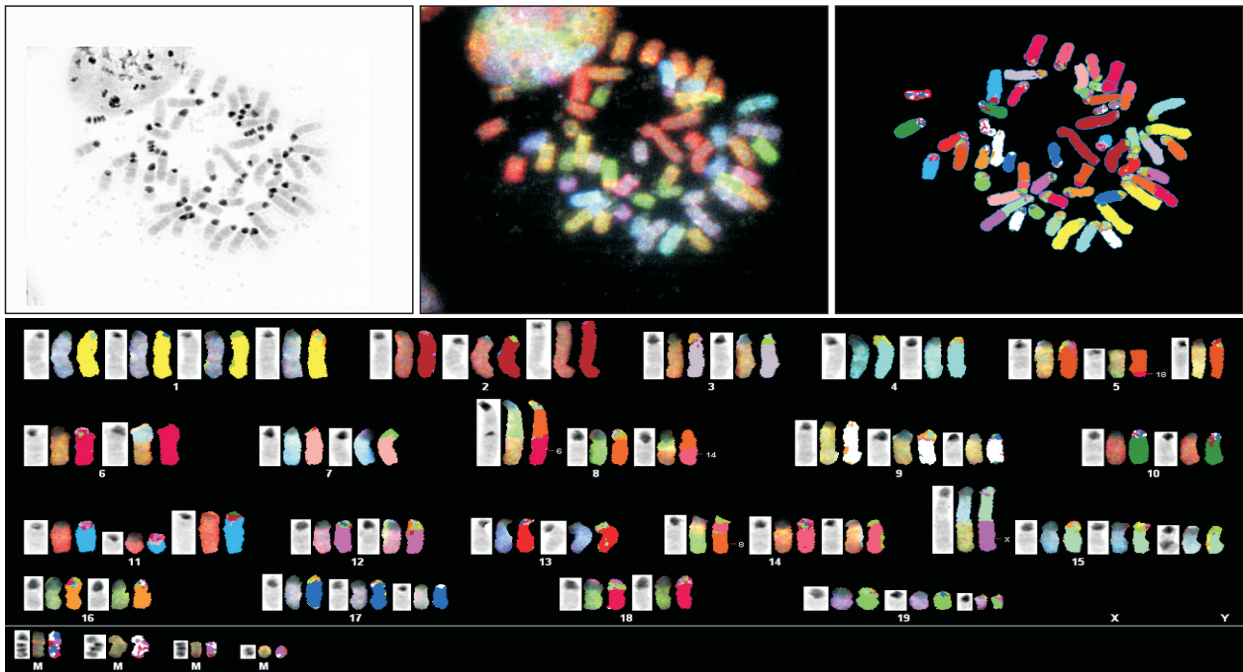
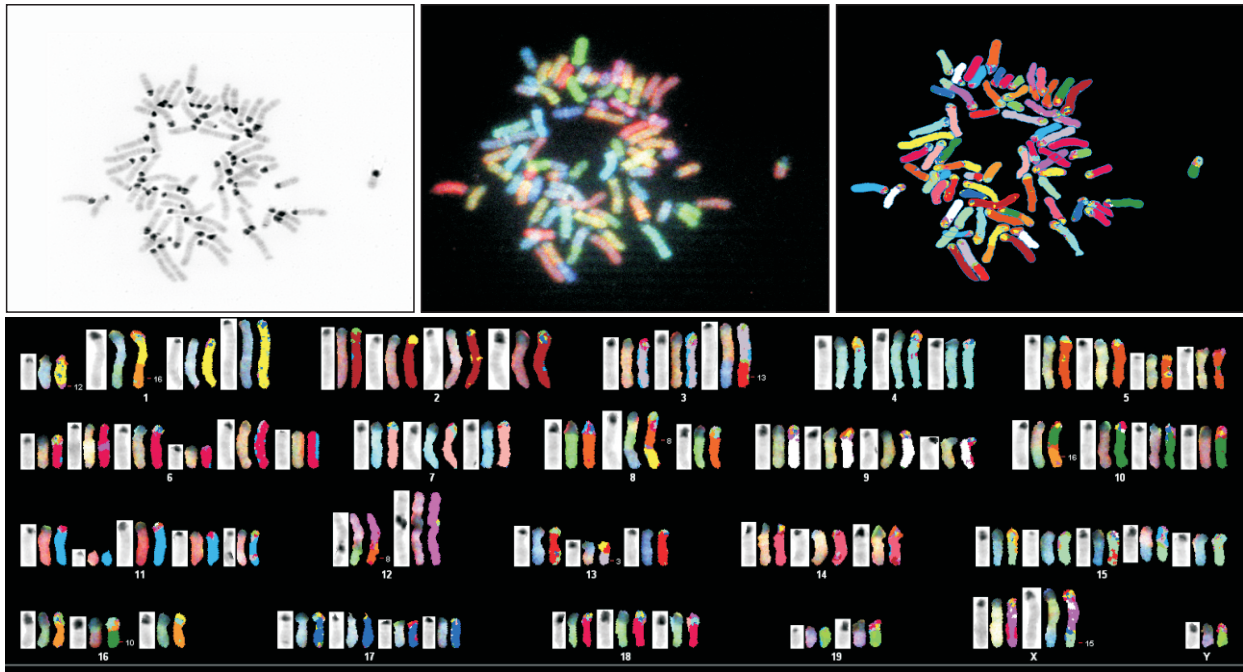
A**B****C**

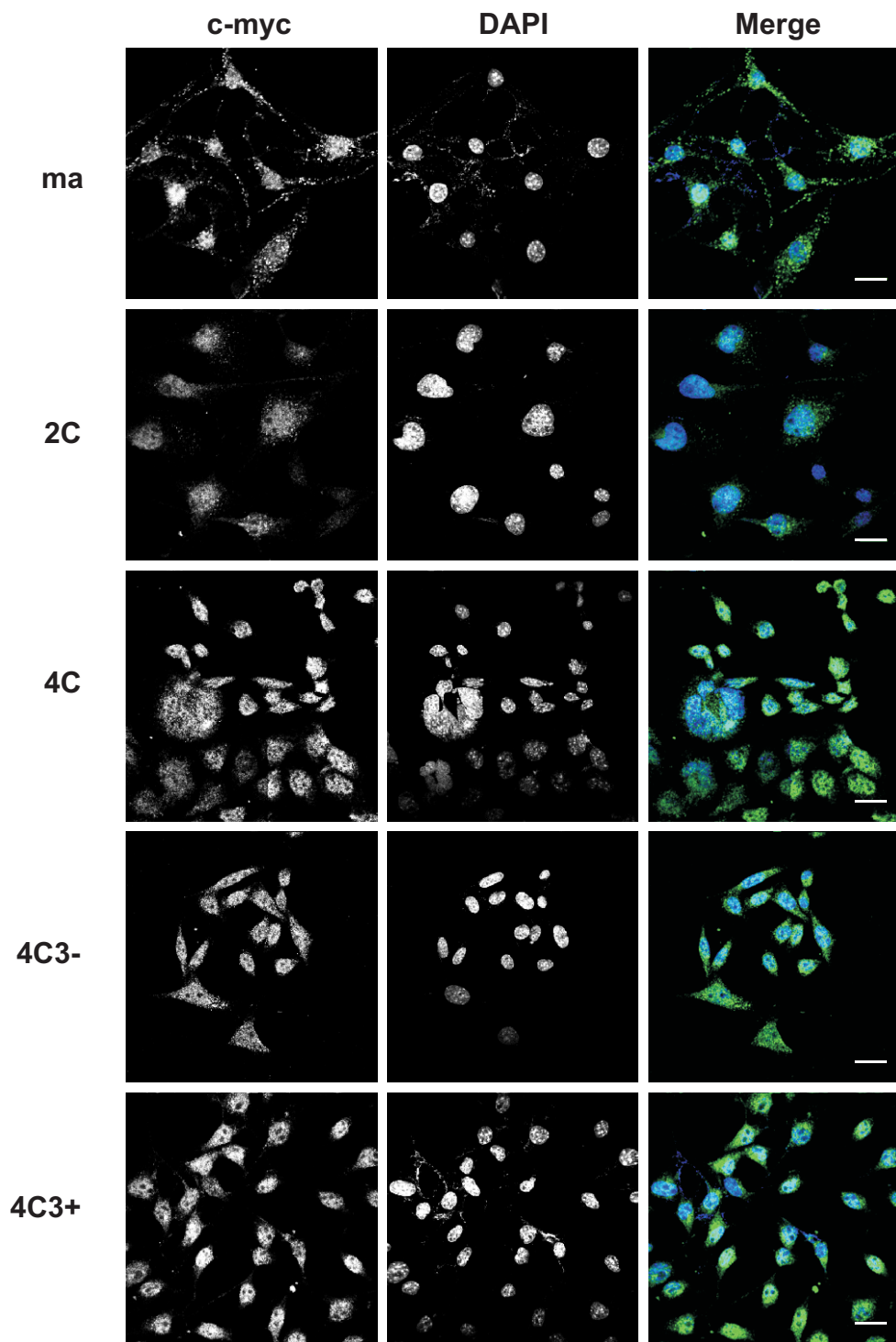
A



B



C**D****E**



AMANDA GONÇALVES DOS SANTOS SILVA

**INSTABILIDADE GENÔMICA RESULTANTE DE
ALTERAÇÕES TELOMÉRICAS E CENTROMÉRICAS
DEFINEM A EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM UM MODELO
MURINO DE MELANOMA.**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2009

AMANDA GONÇALVES DOS SANTOS SILVA

**Instabilidade genômica resultante de alterações
teloméricas e centroméricas definem a evolução cariotípica
em um modelo murino de melanoma.**

Tese preparada durante o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP), na Disciplina de Imunologia e apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, como requisito parcial para obtenção do título de *Doutor em Ciências*.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

São Paulo
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Amanda Gonçalves dos Santos

Instabilidade genômica resultante de alterações teloméricas e centroméricas definem a evolução cariotípica em um modelo murino de melanoma. Amanda Gonçalves dos Santos Silva – São Paulo, 2009.

XIV, 181(f)

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês. Telomere-centromere-driven genomic instability defines karyotype evolution in mouse model of melanoma.

1. Telômero. 2. Centrômero. 3. Instabilidade genômica. 4. Transformação maligna. 5. Melanoma

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

DISCIPLINA DE IMUNOLOGIA

Chefe de Departamento: Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, em conjunto com o *Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, Winnipeg – Canadá*, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), National Cancer Institute of Canada, The Canadian Cancer Society, CancerCare Manitoa Foundation e The Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training”

Aos meus pais, Reginaldo e
Sonia, pelo amor, exemplo e
apoio. Sem vocês eu não
poderia ter chegado até aqui!
Amo vocês!
Muito Obrigada!

A minha maravilhosa irmã,
Raquel, por estar sempre ao
meu lado! Obrigada.

À doutora Miriam Galvonas
Jasiuliones pela oportunidade
e orientação.

À Dra. Sabine Mai por tudo que
me ensinou, pela grande ajuda,
e por todas as portas que esse
trabalho me abriu.

Obrigada...

Aos Professores Doutores da Disciplina de Imunologia, Mario Mariano, Ieda Maria Longo Maugéri, Célia Regina Whitaker Carneiro e Zulma Peixinho, pela ajuda e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Mariângela Corrêa pelo apoio, críticas e sugestões que foram muito importantes para minha formação.

Aos colegas pós-graduandos da Disciplina de Imunologia pelo carinho, apoio e amizade.

As meninas do laboratório, Adriana Taveira da Cruz, Karina Santiago, Alice S. Moraes, Mariana Toricelli, Camila Souza, Letícia Abigail, Viviane C. Cordaro, Paula Sola, Leandro S. L. Nunes pela agradável convivência, paciência e incentivo constante.

Aos funcionários do Departamento de Imunologia Aparecido Mendes, Geová dos Santos, Zélia Pereira, Creusa Marina, Ivone Mozat Eraldina do Nascimento, Gisélia Lopes e Creuza Rosa pelo auxílio constante.

Aos funcionários do Manitoba Institute of Cell Biology pelo auxílio e eficiência que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

As instituições de fomento no Canadá National Cancer Institute of Canada, The Canadian Cancer Society, CancerCare Manitoba Foundation e The Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training” pelo auxílio financeiro.

As instituições de fomento no Brasil CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

A minha querida amiga Sheila, pela amizade, e por estar sempre disposta a me ensinar e ajudar. Te adoro guria!

A minha amiga Ana Paula Suenaga, pela amizade, ajuda e companhia. Sem você tudo teria sido bem mais difícil.

A amiga de todas as horas, Tatiana Ricca, pela convivência, amizade, pelo carinho, conselhos, discussões e paciência. Tenho muita sorte em ter você do meu lado!

Aos amigos especiais Juliana Cuzzi, Mariana Maschietto, Edaise Silva, Daniel Vidal e Fabiano Ricardo, a faculdade nos uniu e nossa amizade nos mantém assim. Que vocês sempre estejam comigo!

As amigas de uma vida inteira Jamille Biondillo, Daniela Mancuso, Cristiane Beguelo, pela amizade e apoio desde sempre!

Ao querido Gustavo Correa, pela sorte...

Aos mais novos amigos Cris Toré, Clarissa Dias, Edh Tavaréz e Adriana Bertazzo, obrigada pela amizade, pelo carinho, apoio e por tudo o que passamos juntos neste pouco tempo... Agradeço todos os dias por ter vocês comigo!

Aos meus meninos, Leonardo Terra, Santiago Troyano, Kleber Borgui e Eduardo Brandão. Mais do que especiais vocês são essenciais pra mim!!!

Aos amigos "internacionais" Amanda Guffei, Elena Peyst, Alexandre Graves, Landon Wark, Zelda e Daniel Lichtensztejn, David Novak, Sherif Louis, Fabien Kutler, Andrea Caporali, Emilia Wiechec. Obrigada pela ajuda, pela recepção e pelo carinho. Foi um prazer trabalhar com todos vocês!!!!

A minha família chilena/canadense Karina, Jose e Nicole Puelles. Não tenho palavras pra agradecer todo amor que me deram!!!!

Aos amigos Dr. Rubens Bollos e André Bachi, pela ajuda, discussões e apoio.

Aos amigos Flávio Paiva, Whinter Silva, Thiago Silva, Thiago Casemiro, Fernando Aldemundo, Vanessa Tanaka, Carol Duca, Fabio Moskospki, Alex Zago, Sandra Rodackiewicz, Sydney e Luciana Mendes, Guilherme Prando, Eduardo Oliveira, Evandro Guarino, Daniel Kosher, Sueli Chicorsqui, Ricardo Leite, Rodrigo Pasin, Márcio Angelim, Ligia Borin, Bárbara Herdy, Alexandre Harris e Patrícia Silveira. A vida também é feita de diversão, e a minha seria bem menos divertida sem vocês!!!! Obrigada pelos ótimos momentos!!!

ÍNDICE

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	2
1. Melanoma.....	2
2. Telômeros.....	6
2.1 Histórico.....	6
2.2 Estrutura do telômero.....	7
2.3 Encurtamento telomérico e a telomerase.....	11
2.4 Telômeros e câncer.....	13
3. Centrômeros.....	17
3.1 Origem e função.....	17
3.2 Estrutura	17
3.3 Evolução centromérica, especiação, anormalidades estruturais e câncer ...	19
3.4 Organização dos centrômeros no núcleo interfásico	20
3.4.1 Ciclo celular	20
3.4.2 Diferenciação celular	21
3.4.3 Transformação maligna	22
5. Instabilidade genética	23
6. Modelo de transformação neoplásica.....	25
OBJETIVOS	28
1. Objetivo geral.....	28
2. Objetivos específicos.....	28
MATERIAL	29
1. Comitê de Ética em Pesquisa.....	29
2. Animais.....	29
3. Anticorpos.....	29
4. Drogas e reagentes.....	30
5. Enzimas.....	31
6. Sondas.....	32
7. Linhagens celulares.....	32
8. Oligonucleotídeos	32

9. Programas	33
MÉTODOS	34
1. Modelo de estudo	34
2. Cultura primária de macrófagos	34
3. Meio de cultura celular.....	34
4. Cultura e manutenção dos estoques celulares	35
5. Tumorigênese <i>in vivo</i>	35
6. Ensaio de metástase experimental	36
7. Ensaio de proliferação celular	36
8. Extração de RNA total.....	36
9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa	38
10. RT-PCR semiquantitativo	39
11. Ensaio da telomerase (TRAP assay)	40
12. Preparação de lâminas para análise de núcleos interfásicos.....	41
13. Preparação de metáfases.....	41
14. Peptide-nuclei-acid (PNA)-FISH em núcleo interfásico.....	42
15. Aquisição de Imagem 3D.....	43
16. Análise das imagens 3D pelo software Teloview.....	43
17. PNA-FISH em metáfases.....	44
18. Spectral Karyotyping Analysis (SKY)	45
19. FISH centromérico em metáfases.....	47
RESULTADOS	49
1. Características do modelo	49
1.1 Morfologia das linhagens ao longo da transformação maligna.....	49
1.2 Análise da proliferação celular <i>in vitro</i> e tumorigenicidade <i>in vivo</i> da linhagem melan-a e suas derivadas.....	52
1.3 Análise da capacidade metastática das linhagens de melanoma obtidas a partir da linhagem melan-a	55
2. Evolução cariotípica no modelo experimental de melanoma.....	57
3. Instabilidade e fragmentação centromérica	67
4. Avaliação do perfil telomérico no modelo de transformação maligna de melanócitos.....	69

4.1 Diminuição no tamanho absoluto e variabilidade do comprimento telomérico ao longo do modelo de transformação de melanócitos.....	69
4.2 Análise da perda completa de seqüências teloméricas.....	72
5. Expressão de c-Myc é desregulada no modelo de melanoma	74
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS	90
ABSTRACT	105
APÊNDICE	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark	5
Figura 2. A estrutura dos telômeros humanos.....	9
Figura 3. O complexo shelterin.....	10
Figura 4. Ciclos de quebra/ fusão/ ponte.....	16
Figura 5. Modelo de transformação maligna de melanócitos associado à resistência ao <i>anoikis</i>	27
Figura 6. Morfologia dos melanócitos melan-a e das linhagens obtidas após ciclos sequenciais de bloqueio de ancoragem.....	50
Figura 7. Proliferação celular <i>in vitro</i>	53
Figura 8: Tumorigenicidade <i>in vivo</i> das linhagens derivadas de células melan-a. ..	54
Figura 9. Ensaio de metástase experimental.....	56
Figura 10. Evolução cariotípica	59
Figura 11. Rearranjos cromossômicos.....	63
Figura 12. Fragmentação centromérica.....	68
Figura 13. Encurtamento telomérico na presença de telomerase.....	71
Figura 14. Translocações Robertsonianas e outras anormalidades centroméricas.....	73
Figura 15. Imunofluorescência indireta usando um anticorpo específico contra c-Myc.....	75
Figura 16. Mapa de ortologia do genoma: genoma humano sob o genoma de camundongo	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seqüências dos iniciadores	32
Tabela 2 – Sumário dos rearranjos encontrados no modelo de melanoma	64
Tabela 3 – Aumento no número individual de cromossomos no modelo de melanoma	65
Tabela 4 – Resumo dos cromossomos envolvidos na formação das translocações Robertsonianas nas linhagens metastáticas do modelo de melanoma.	66
Tabela 5 – Alterações estruturais freqüentes em melanomas humanos	83

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
1C	linhagem obtida após submeter células melan-a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
2C	linhagem obtida após submeter células 1C um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
3C	linhagem obtida após submeter células 2C um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C	linhagem obtida após submeter células 3C um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3-, 4C11-, Tm1 e Tm5	diferentes linhagens de melanoma obtidas a partir da diluição limitante de esferóides formados após submeter a linhagem 4C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3+ e 4C11+	diferentes linhagens de melanoma obtidas espontaneamente em cultura a partir das linhagens 4C3- e 4C11-, respectivamente.
BSA	soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
Ig	Imunoglobulina
Kb	quilo base
mg	miligrama
ml	mililitro

mM	milimolar
nM	nanomolar
pb	pares de base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Éster de forbol-miristato
RGP	melanoma primário de fase de crescimento radial
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
VGP	melanoma primário de fase de crescimento vertical
BFB	ciclos de quebra/fusão/ponte ou <i>breakage/fusion/bridge</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
SKY	Cariótipo espectral
Q-FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente quantitativa
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
Rb	Translocação Robertsoniana
T	Translocação
Fus	Fusão

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
1C	linhagem obtida após submeter células melan-a a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
2C	linhagem obtida após submeter células 1C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
3C	linhagem obtida após submeter células 2C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C	linhagem obtida após submeter células 3C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3-, 4C11-, Tm1 e Tm5	diferentes linhagens de melanoma obtidas a partir da diluição limitante de esferóides formados após submeter a linhagem 4C a um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato.
4C3+ e 4C11+	diferentes linhagens de melanoma obtidas espontaneamente em cultura a partir das linhagens 4C3- e 4C11-, respectivamente.
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotretitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
Ig	Imunoglobulina
Kb	quilo base
mg	miligrama
mL	mililitro

mM	milimolar
nM	nanomolar
pb	pares de base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Éster de forbol-miristato
RGP	melanoma primário de fase de crescimento radial
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
VGP	melanoma primário de fase de crescimento vertical
BFB	ciclos de quebra/fusão/ponte ou <i>breakage/fusion/bridge</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
SKY	Cariótipo espectral
Q-FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente quantitativa
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
Rb	Translocação Robertsoniana
T	Translocação
Fus	Fusão

Resumo

Aneuploidia e instabilidade cromossômica são características da maioria dos tumores sólidos. Estas alterações podem resultar da segregação inapropriada dos cromossomos durante a divisão celular, que pode ocorrer através de diversos mecanismos incluindo defeitos teloméricos, amplificação centrossômica, centrômeros não funcionais e/ou defeitos no controle dos *checkpoints* do processo de divisão. Neste trabalho, nós utilizamos um modelo *in vitro* de melanoma murino, cujo fator transformante foi o bloqueio seqüencial da adesão celular ao substrato, para caracterizar alterações teloméricas e centroméricas que acompanham a transformação maligna dos melanócitos. Para estudar o tempo de ocorrência do encurtamento telomérico durante a transformação maligna, nós analisamos o perfil do comprimento telomérico por Q-FISH e observamos que o tamanho dos telômeros diminui gradativamente ao longo da transformação maligna. Paralelamente, um aumento no número de cromossomos sem telômeros e na complexidade do cariótipo foi também encontrado, o que inclui o aparecimento de fusões Robertsonianas em 100% das metáfases analisadas nas linhagens metastáticas. Estes achados estão em concordância com a idéia que anormalidades no comprimento dos telômeros parecem ser uma das alterações genéticas mais precocemente adquiridas no processo de transformação maligna e que anormalidades teloméricas resultam em agregação telomérica, ciclos de quebra, ponte e fusão e instabilidade cromossômica. Outra característica importante do modelo é a grande instabilidade centromérica manifestada pela presença abundante de fragmentos centroméricos e fusões de centrômeros. Juntos, nossos resultados ilustram, para este modelo de melanoma, instabilidade cromossômica com uma assinatura estrutural de quebras centroméricas e perda telomérica.

Introdução

1. Melanoma

Em 2005, o câncer foi responsável por 13% das mortes ocorridas no mundo, sendo que mais de 70% destas ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006). No ano passado, foram estimados 59.940 novos casos de melanoma nos Estados Unidos, com uma expectativa de 8.110 mortes (American Cancer Society, 2007). Estima-se que em 2008 dentre todos os tipos de câncer o de pele será o mais incidente na população brasileira com 120.930 casos novos, dos quais 4,9% serão de melanoma (INCA, 2007). Mesmo sendo o tipo de câncer de pele mais raro, o melanoma é responsável pela maioria das mortes (aproximadamente 80%) relacionadas ao câncer de pele (Lewis e col., 2005; Medic e col., 2007), visto que apenas 14% dos pacientes com melanoma metastático apresentam sobrevida livre de doença por cinco anos (American Cancer Society, 2007).

Apesar da maioria dos melanomas diagnosticados em estágios precoces serem curáveis cirurgicamente, um número pequeno de pacientes diagnosticados em estágios avançados sobrevive, mesmo após intervenções terapêuticas agressivas (Wascher e col., 2003; Miller & Mihm, 2006). No entanto nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56% (www.inca.gov.br).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são histórico familiar, múltiplos nevos (benignos ou atípicos) e ocorrência prévia de melanoma. Fatores de risco adicionais incluem sensibilidade ao sol, exposição solar excessiva e doenças imunossupressoras (Miller & Mihm, 2006). Além disso, o melanoma é predominantemente uma doença de populações de pele clara, sendo sua incidência 5 a 20 vezes menor nas populações de pele escura. Esta sensibilidade diferencial associada à cor da pele ou, mais propriamente, a reação da pele à exposição intermitente a radiações do tipo UV-A e B é um dos melhores exemplos da interação entre fatores físicos e genéticos no desenvolvimento dos tumores (Gilchrest e col., 1999).

Outros fatores como alterações genéticas têm demonstrado correlação direta com o desenvolvimento do melanoma. Estas mutações são relacionadas a três

categorias de genes: proto-oncogenes, genes supressores de tumor ou genes de reparo de DNA (Kastan & Bartek, 2004).

Melanomas são neoplasias malignas de melanócitos. Os melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, região bulbar dos folículos pilosos, coróide e leptomeninges. Os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, são de origem neuroectodérmica, e migram da crista neural para a epiderme onde se diferenciam em melanócitos. Na epiderme, os melanócitos interagem especificamente com queratinócitos, definindo as unidades de pigmentação da epiderme (Bennett, 1993; Hsu e col., 2002).

Baseado em características clínicas e histopatológicas, cinco fases da progressão do melanoma foram propostas (Clark e col., 1984; Meier, 1998): clusters de melanócitos normais (nevo comum), nevo displásico, melanoma primário de fase de crescimento radial (RGP), melanoma primário de crescimento vertical (VGP) e melanoma metastático (**FIGURA 1**).

No nevo comum, há acúmulo de melanócitos na camada basal da epiderme, encontrando-se agregados de células névicas na junção dermoepidérmica. No nevo displásico, atipias na arquitetura dos nevos são observadas, incluindo traves de melanócitos presentes na derme e presença de melanócitos na camada suprabasal da epiderme. Melanomas de fase de crescimento radial caracterizam-se pela progressiva proliferação de células de melanoma predominantemente na epiderme, sendo possível à presença de células de melanoma na derme, porém estas não proliferam. Melanomas de fase de crescimento vertical caracterizam-se pela proliferação de células de melanoma na derme, extensa degradação da matriz extracelular e indução sustentada de angiogênese. O processo de angiogênese, induzido em parte pela expressão de fatores como VEGF, por exemplo, ocupa uma posição central na progressão de melanomas VGP para o melanoma metastático. Os vasos formados servem tanto para a nutrição do tumor como para o escape de células tumorais para a circulação linfática e sanguínea, dando origem a metástases (revisto em Chammas, 2004).

Em nível molecular, a progressão de um melanócito transformado para um melanoma maligno é acompanhada pela aquisição gradual de múltiplas alterações genéticas (Hussein, 2007) e epigenéticas (Rothhammer & Bosserhoff, 2007; Howell e col., 2009) que levam à perda de genes supressores tumorais e aumentam a hipermutabilidade do tumor (Hussein, 2004). Os melanomas malignos apresentam os

dois tipos de instabilidade genética encontrados em neoplasias: instabilidade cromossômica (CIN) e instabilidade de microssatélite (MIN) (Hussein e col., 2004; Lengauer e col., 1998; Hussein, 2007). No entanto, MIN é encontrada em níveis baixos no melanoma cutâneo (Palmieri e col., 2003; Hussein e col., 2002), enquanto CIN tem sido encontrado em praticamente todos os casos analisados (Hussein e col., 2004; Höglund e col., 2004; Schulten e col., 2002).

Embora haja na literatura inúmeros trabalhos com diferentes modelos (tecidos, linhagens celulares e anticorpos) indicando mudanças em várias moléculas envolvidas na gênese do melanoma, as alterações responsáveis pelo desenvolvimento e a progressão do melanoma ainda não são totalmente conhecidas.

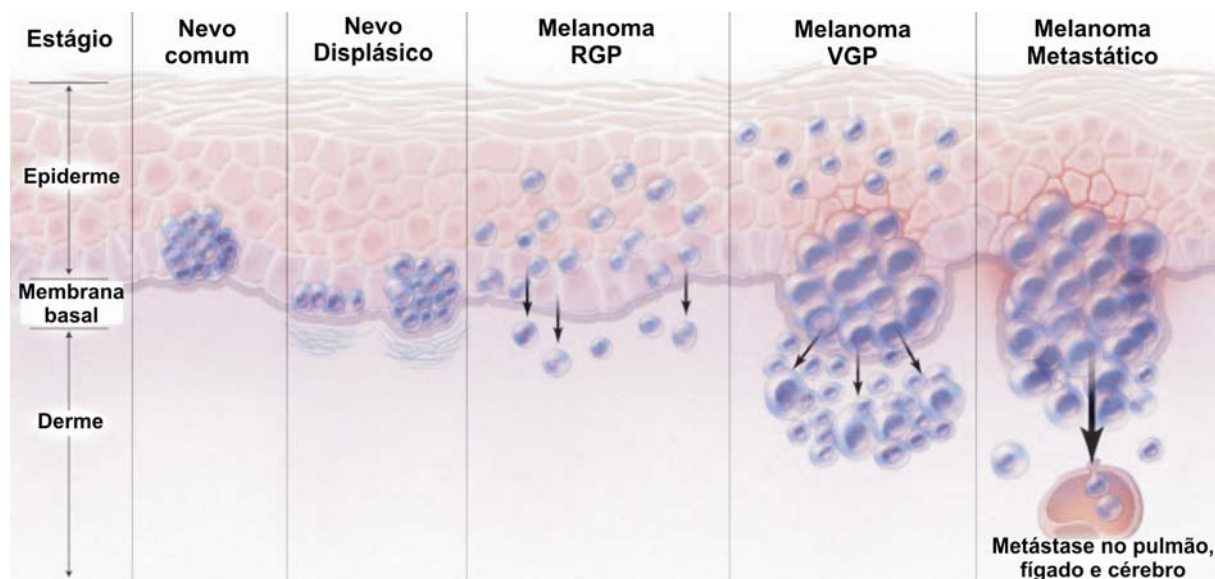


FIGURA 1. Modelo de progressão do melanoma proposto por Clark. Os melanomas são classificados histologicamente de acordo com sua localização e estágio da progressão. Cinco estágios foram propostos na evolução do melanoma com base nesses critérios histológicos: nevo adquirido e congênito comum; nevo displásico com estrutura e arquitetura atípicas; melanoma primário de fase de crescimento radial (RGP), melanoma primário de crescimento vertical (VGP), e melanoma metastático (Clark e col., 1984). Figura modificada de Miller & Mihm, 2006.

2. Telômeros

2.1 Histórico

A presença de estruturas especializadas no final dos cromossomos foi descrita por Hermann J. Muller em 1938. Em seus estudos com drosófilas, ele notou que os cromossomos das moscas, quando irradiadas, apresentavam muitos tipos de quebras, trocas e fusões, mas nunca simples deleções terminais. Ele concluiu que as porções finais dos cromossomos deveriam ser protegidas por estruturas especializadas e notou também que estas regiões tinham características de heterocromatina. Muller inicialmente chamou estas estruturas de proteção de “gene terminal” e mais tarde de “telômeros” (revisto em Chuaire, 2006).

Dois anos depois, Barbara McClintock relatou que, em milho, os finais dos cromossomos quebrados tendiam a se fundir, formando cromossomos dicêntricos. Estes cromossomos formados se quebrariam novamente à medida que os dois centrômeros tentassem migrar durante a anáfase. De acordo com suas conclusões, os telômeros tinham papel crucial na integridade cromossômica, uma vez que eles preveniam estes ciclos de quebra-fusão e ponte, prejudiciais à integridade celular (revisto em Madame Curie Bioscience Database, 2009).

Contudo, os estudos sobre telômeros só voltaram a ter importância 30 anos depois com a descoberta dos mecanismos de replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Nesta época, James Watson identificou que o problema da replicação terminal cromossômica consistia na incapacidade da DNA polimerase em replicar o final 3' da fita de DNA e com isso os cromossomos eram encurtados a cada divisão celular. Além disso, ele postulou que deveria existir um mecanismo de proteção pelo qual o encurtamento cromossômico seria prevenido, mas este mecanismo não seria descoberto antes de 1978 (revisto em Chuaire, 2006).

Até 1960, acreditava-se que as células eram capazes de proliferar indefinidamente. No entanto, em 1961, Leonard Hayflick demonstrou que fibroblatos humanos possuíam potencial proliferativo limitado (entre 40 a 50 divisões) e que após este período eles entravam em senescência. Com base neste e em outros estudos, conclui-se que a célula possuía um mecanismo de controle interno, capaz de estabelecer o número total de divisões celulares durante sua existência - limite de Hayflick (Stewart & Weinberg, 2006). Atualmente é sabido que o determinante do

número de divisões celulares é o comprimento telomérico e que as células, ao atingirem seu limite, ativam mecanismos de parada de crescimento celular, que são irreversíveis (Katakura, 2006).

Finalmente em 1978, Elizabeth Blackburn descreveu os finais cromossômicos, ou telômeros, como sendo composto de seqüências repetitivas simples de DNA (revisto em Blackburn, 1992). Logo se tornou aparente que esta seqüência era conservada através da evolução e que um mecanismo comum deveria existir entre os eucariotos para que houvesse a manutenção dos telômeros. Em 1984, Greider e Blackburn, identificaram uma enzima, a telomerase, que adicionava repetições teloméricas nos finais dos cromossomos. Elas sugeriram que a telomerase poderia compensar a replicação incompleta dos cromossomos. Isto explicaria a manutenção do comprimento telomérico observado em organismos como o protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* e leveduras (revisto em Greider, 1996).

2.2 Estrutura do telômero

Os telômeros, do grego *telos* (finais) e *meros* (partes), são estruturas nucleoprotéicas especializadas, localizadas nos finais dos cromossomos e que tem como função principal proteger estas regiões de recombinação e degradação. A presença dos telômeros confere às células a capacidade de diferenciar quebras randômicas na dupla fita de finais naturais dos cromossomos, e impede também que genes importantes localizados em regiões próximas a eles sejam perdidos por degradação (McClintock, 1941; Bailey & Murnane, 2006).

O telômero da maioria dos eucariotos consiste em repetições curtas ricas em citosina (C) na fita 5', referida como fita C. A fita complementar é rica em guanina (G) e é denominada fita G. A fita G corre na direção 5'-3' do cromossomo e é mais longa que a fita C devido à presença de uma "cauda" que em mamíferos consiste de 50 a 500 nucleotídeos (Palm & de Lange, 2008) (**FIGURA 2**).

A primeira seqüência de DNA telomérico foi descrita no protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* em 1978, composto por repetições TTGGGG (Blackburn & Gall, 1978). Na maioria dos insetos, a região telomérica tem seqüência TTAGG e na maior parte das plantas, a seqüência TTTAGGG (Monaghan & Haussmann, 2006). O número de nucleotídeos destas seqüências varia entre as espécies, porém na maioria

dos organismos estudados, as seqüências teloméricas consistem de 5 a 8 pares de bases. Em humanos e em camundongos, a região telomérica possui seqüências repetidas e não codificadas de hexanucleotídeos TTAGGG, e variam entre 10-15kb em humanos e 25-40kb em camundongos (Griffith e col, 1999; Blasco, 2005).

Análises por microscopia eletrônica mostraram que o DNA telomérico humano e murino formam uma estrutura altamente organizada, na qual a cauda G da fita 3' se insere nas regiões teloméricas de dupla fita, formando uma "alça" conhecida como *T-loop* (Griffith e col., 1999). Esta estrutura de alça é estabilizada pela ligação dos telômeros às proteínas TRF1, TRF2 e POT1. Esta forma estrutural permite que os telômeros sejam reconhecidos como as porções finais cromossômicas e não como quebras, impedindo assim que sejam processados pela maquinaria de dano do DNA (Herbig & Sedivi, 2006). A cauda G ainda serve como substrato, no qual a telomerase adiciona repetições teloméricas, fornecendo um molde para a síntese de DNA da fita descontínua (*lagging*) (Hultdin, 2003).

Em mamíferos, as proteínas TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 e Pot1 formam o complexo *shelterin*, componente constitucional do telômero (de Lange, 2005) (**FIGURA 3**). As proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se às repetições teloméricas de fita dupla formando homodímeros, enquanto que a Pot1 liga-se às repetições TTAGGG da fita simples. Além disso, TRF1 e TRF2 recrutam outros quatro componentes do *shelterin* para os telômeros, TIN2, Rap1, TPP1 e Rap1 (Palm & de Lange, 2008).

O complexo *shelterin* também está envolvido no controle do comprimento telomérico. A inibição de TRF1 (Van Steensel & de Lange, 1997), redução dos níveis de TIN2 (Kim e col., 1999) e Rap1 (Li & de Lange, 2003) e supressão de Pot1 (Liu e col., 2004) promovem alongamento do telômero, enquanto a super expressão de TRF1 e TRF2 (Houghtaling e col., 2004; Smogorzewska e col., 2000) causa o encurtamento do mesmo, sem afetar a atividade da telomerase *in vitro*. Este complexo pode também inibir a ação da telomerase através da formação do *T-loop*, impedindo assim o acesso desta enzima à fita simples telomérica (Hug & Ligner, 2006). Além disso, as proteínas associadas aos telômeros exercem funções de reparo de DNA, essenciais para a manutenção do mesmo (Stewart & Weinberg, 2006).

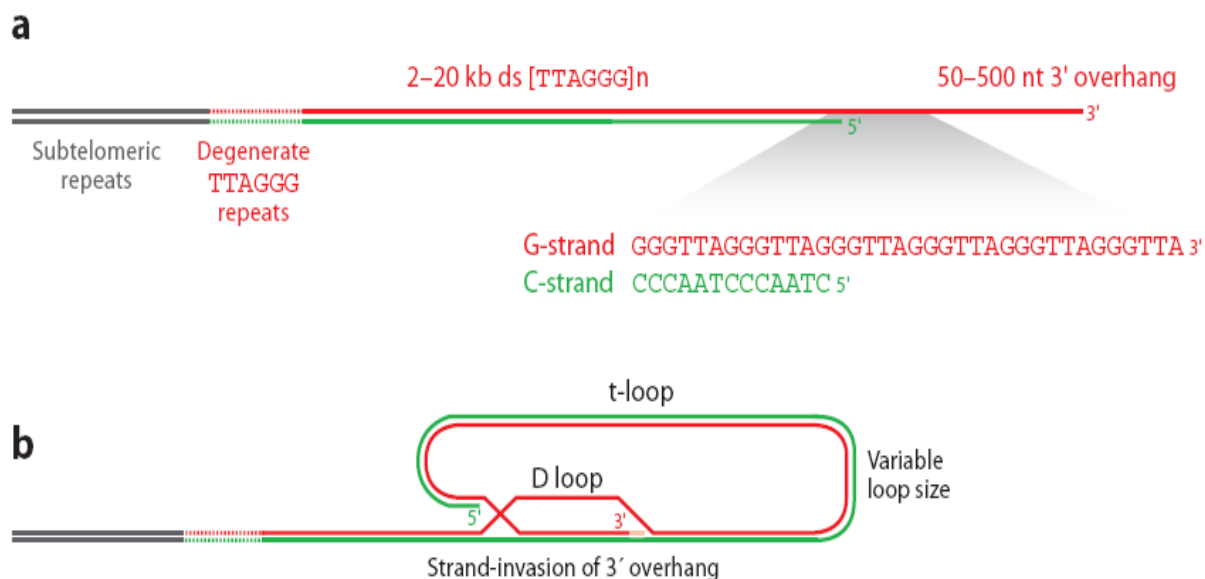


FIGURA 2 – A estrutura dos telômeros humanos. (a) Seqüência terminal dos cromossomos humanos composta por repetições em tandem dos nucleotídeos TTAGGG. Próximo às repetições teloméricas localiza-se um segmento de repetições degeneradas e repetições subteloméricas. A fita 3' do terminal telomérico apresenta uma extensão que varia entre 50-500 nucleotídeos e é rica em guanina (G), enquanto a fita 5' termina sempre com a seqüência de nucleotídeos ATC. (b) Representação esquemática da estrutura t-loop. O tamanho da estrutura é variável. Extraído de Palm & de Lange, 2008.

2.3 Encurtamento telomérico e a telomerase

Os telômeros diminuem gradualmente a cada divisão celular como resultado da incompleta replicação da fita *lagging* do DNA. Cada divisão celular resulta em uma perda de 50 a 200 nucleotídeos da região telomérica, de forma que o tamanho do telômero reflete a história proliferativa celular, funcionando como um “relógio mitótico” em direção a senescência (Engelhardt & Finke, 2001; Parris e col, 1999; Allsop e col, 1995).

Em diferentes espécies, o comprimento telomérico varia entre cromossomos, tecidos, indivíduos e idade. Nos vertebrados, o comprimento telomérico é similar nas células da maioria dos tecidos, mas, após o nascimento, os telômeros encurtam progressivamente nas células somáticas proliferativas. Alguns tecidos, como a mucosa intestinal e as células do sangue que tem rápida renovação e requerem elevadas taxas de proliferação celular, apresentam maior encurtamento dos telômeros. Por outro lado, tecidos com baixa taxa de proliferação, como músculo e cérebro, têm comprimento telomérico bastante estável (Monaghan & Hausmann, 2006).

Quando os cromossomos atingem um comprimento telomérico crítico, a estrutura protetora (T-loop) se perde, desencadeando o recrutamento de sensores de danos ao DNA (Herbig & Sedivy, 2006). Conseqüentemente, há ativação e estabilização de p53, favorecendo a transcrição de genes como o p21 (Lou & Chen, 2006). Este gene inibe a atividade de quinases dependentes de ciclina, que deveriam fosforilar e conseqüentemente ativar o oncogene pRb, resultando na ativação do mecanismo antiproliferativo denominado “estágio 1 de mortalidade” (M1). Apesar das células neste estágio permanecerem metabolicamente ativas, não progridem no ciclo celular (der-Sarkissian e col., 2004; Hathcock e col., 2003). O estágio M1 previne a propagação de erros e, por conseqüência, o desenvolvimento tumoral (Stewart & Weinberg, 2006).

Entretanto, se os genes de resposta a dano de DNA, como p53 e/ou p21, estiveram inativos, haverá escape em direção à persistência da proliferação, além da senescência (estágio M1) (Lou & Chen, 2006; der-Sarkissian e col., 2004; Baerlocher & Lansdorp, 2003). As células continuam se dividindo e encurtando seus telômeros até que um segundo bloqueio denominado “crise” ou “estágio 2 de mortalidade” (M2) seja alcançado (Shay & Wright, 2005). O estágio de crise é caracterizado por telômeros

curtos, fusões terminais, pontes de anáfase e morte celular programada (apoptose) (Stewart & Weinberg, 2006; Londoño-Vallejo, 2004).

Os telômeros também podem se tornar menores como resultado de danos oxidativos (Lotze e col, 1995) e podem ser controlados por modificações epigenéticas da cromatina telomérica. Telômeros de mamíferos apresentam modificações de histonas características de heterocromatina constitutiva, tais como di e trimetilação de H3K9 e trimetilação de H4K20, entre outras (Gonzalo e col, 2006). Estas modificações têm sido consideradas como reguladores negativos do tamanho dos telômeros (Garcia Cao e col, 2004).

Como já discutido, o encurtamento dos telômeros tem sido considerado o “relógio mitótico” (Parris e col, 1999, Blasco, 2005) por limitar o número de vezes em que uma célula se divide, contribuindo para o fenótipo de envelhecimento, mas também promovendo um efetivo mecanismo supressor tumoral (Shay & Wright, 2006; Bailey & Murnane, 2006; Pedram e col, 2006).

Com o encurtamento gradual dos telômeros para que a divisão celular continue ocorrendo, as seqüências teloméricas perdidas devem ser repostas. A adição de novas repetições teloméricas é realizada basicamente por dois mecanismos, o mais comum depende da síntese de novas seqüências teloméricas pela ação de uma transcriptase reversa - telomerase. A outra decorre de eventos de recombinação telomérica denominados *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT) (Damle e col., 2004; Villa e col., 2004). O ALT não é um mecanismo fisiológico e foi observado em tumores humanos, como carcinomas, osteosarcomas entre outros. Acredita-se se tratar de um mecanismo que auxilia a telomerase na manutenção telomérica. Entretanto, nem todas as células que perdem a expressão da telomerase apresentam ALT (Fleisig & Wong, 2006).

A telomerase é uma transcriptase reversa, codificada pelo gene TERT, que reconhece especificamente o grupo OH da região 3' do final da alça telomérica e, usando um molde de RNA codificado pelo gene TERC, alonga os telômeros (Blackburn, 2001; Blasco, 2005). A telomerase é expressa em células embrionárias, células imortalizadas e células tumorais, no entanto em células somáticas normais não há detecção desta enzima, com exceção de células proliferativas de tecidos em regeneração. Com isso, a manutenção do comprimento dos telômeros nas células somáticas é comprometida e resulta em um encurtamento gradual que pode levar a uma parada no ciclo celular (senescência) ou à crise e a apoptose.

2.4 Telômeros e câncer

Defeitos na funcionalidade dos telômeros têm sido associados à patologia de diversas doenças relacionadas à idade, síndromes de idade prematura e câncer (Blasco, 2005). Os telômeros podem se tornar não funcionais à medida que seu encurtamento se torna crítico e, como demonstrado há mais de 50 anos, a perda de funcionalidade telomérica pode ser o principal mecanismo envolvido na geração de anormalidades cromossômicas (McClintock, 1941; Meeker e col, 2004).

Muitos genes estão envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica, contudo defeitos em tais genes têm sido relacionados somente a um pequeno número de neoplasias humanas e, nestes casos, resultam principalmente em anomalias numéricas e não em cariótipos complexos como os encontrados na maioria dos tumores. Então, os mecanismos moleculares que levam à instabilidade cromossômica em câncer permanecem um mistério, assim como o exato momento em que a instabilidade cromossômica acontece no processo tumorigênico (Meeker e col, 2004).

A instabilidade cromossômica resultante da não funcionalidade telomérica pode ocorrer através de ciclos de quebra/fusão/ponte (breakage/fusion/bridge – BFB), exemplificados no diagrama abaixo (**FIGURA 4**) (McClintock, 1941). Estes ciclos são iniciados quando um cromossomo sem telômero ou com telômero não funcional sofre replicação. Neste caso, as porções finais das cromátides irmãs se fundem e formam uma ponte durante a anáfase, que se quebra à medida que os dois centrômeros são puxados em direções opostas. Devido ao fato da quebra não ocorrer necessariamente no ponto de fusão, uma das células filhas recebe um cromossomo com uma duplicação na sua ponta, enquanto a outra recebe um cromossomo com uma deleção terminal. Já que nenhum destes cromossomos apresenta telômeros, a próxima replicação levará à formação de uma nova fusão e assim sucessivamente. Estes ciclos podem continuar por muitas gerações, levando a uma extensiva replicação de DNA e uma deleção terminal progressiva, terminando somente quando um cromossomo eventualmente readquire um telômero e torna-se estável novamente (Murnane, 2006; Bailey & Murnane, 2006).

Tussel e colaboradores (2008) examinaram a participação de diferentes tipos de fusões terminais no estabelecimento de um cariótipo instável em células epiteliais de mama humanas não transformadas e propuseram uma ordem cronológica da participação destas fusões na geração da instabilidade cromossômica. A fusão

intracromossômica aconteceria principalmente nos estágios iniciais da progressão, onde a disfunção telomérica seria limitada e afetaria somente os terminais de um único cromossomo em cada célula. A ausência de um segundo substrato para a fusão conduziria a célula com o cromossomo instável a duplicar o DNA e fundir as cromátides irmãs depois da replicação. Mais tarde, visto que os telômeros encurtam progressivamente a cada ciclo de replicação, a disfunção telomérica afetaria mais terminais cromossômicos, e fusões entre pontas não funcionais de diferentes cromossomos também ocorreriam. Enquanto a fusão intercromossômica resulta em ampliações e deleções terminais nas células filhas, as fusões intracromossômicas resultam em rearranjos não balanceados.

Ao que tudo indica, somente uma célula com deficiência em *checkpoints* de ciclo celular ou apoptose escaparia da entrada na senescência e participaria de ciclos BFB. Em outras palavras, a ausência da expressão de genes de *checkpoints* para ciclo celular e apoptose, como *Rb*, *p53*, *p21* e *p16*, por exemplo, precederia o processo de perda telomérica (Guney & Sedivy, 2006; Herbig & Sedivy, 2006; Bailey & Murnane, 2006).

Trabalhos anteriores afirmam que um importante passo para a carcinogênese é a reativação da telomerase, uma vez que, para sobreviver à extensiva divisão celular, as células precisam prevenir a erosão e fusão de seus próprios telômeros (Bachetti e col, 1992; Shay & Bachetti, 1997). A telomerase é expressa em mais de 90% de todos os tumores humanos, e os demais apresentam um mecanismo alternativo para a manutenção dos telômeros conhecido como ALT (alternative length of telomeres) (Bryan e col, 1995; Neumann & Reddel, 2002).

A regulação da expressão do mRNA do gene TERT parece ser o passo mais importante na reativação da telomerase (Flores et al, 2006). O promotor de TERT contém vários sítios regulatórios, incluindo dois sítios de ligação para c-Myc. Neste contexto, a super expressão deste oncogene foi relacionada à reativação da telomerase por induzir a transcrição de TERT (Wu e col, 1999; Wang e col, 1998). A expressão constitutiva de c-Myc devido a translocações cromossômicas, mutação ou amplificação contribui para o desenvolvimento e a progressão de muitos tumores (Nesbit e col., 1999; Potter & Marku, 1997). De fato, mais de 70% de todos os cânceres humanos apresentam expressão desregulada de c-Myc, colocando este gene entre os mais importantes proto-oncogenes humanos (Kutler & Mai, 2006).

Estudos mostram que c-Myc é capaz de induzir rearranjos cromossômicos e agregados teloméricos através do remodelamento causado pela expressão constitutiva deste gene no núcleo interfásico (Caporali e col., 2007; Mai & Garini, 2005). Alguns estudos sugerem que a expressão aberrante de c-Myc resulta na regulação anormal de proteínas que protegem os telômeros (Louis e col., 2005). Adicionalmente, Guffei e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão constitutiva de c-Myc pode mediar a formação de fusões Robertsonianas através do remodelamento centromérico no núcleo interfásico e subsequente promoção de fusões teloméricas em cromossomos de camundongos.

Camundongos *knockout* têm sido importantes em estudos sobre os possíveis papéis dos telômeros e da telomerase na tumorigênese. Estes modelos têm demonstrado que telômeros curtos, na ausência de telomerase, funcionam como um potente supressor tumoral, e que isso coincide com a super regulação de *p53*. Similarmente, a tumorigênese é reduzida também em camundongos que são simultaneamente deficientes de telomerase e supressores tumorais diferentes de *p53*, tais como *p19*, *p16* ou *APC*. Isto sustenta a idéia de que telômeros curtos suprimem a carcinogênese mesmo na ausência das principais vias supressoras de tumor. Por outro lado, em camundongos heterozigotos para *p53*, a deficiência de telomerase e os telômeros curtos levam a um aumento no número de tumores epiteliais com altos níveis de instabilidade cromossômica, indicando novamente que *p53* é um importante mediador da resposta celular ao encurtamento telomérico (revisto em Blasco, 2005).

A telomerase tem sido alvo de numerosas tentativas de terapia, algumas delas em estágios avançados de verificação, entre elas: a imunoterapia direcionada a *TERT*, terapias baseadas em oligonucleotídeos direcionados a *TERC*, terapia gênica com vírus oncolíticos e terapia combinada dos regimes terapêuticos já estabelecidos, quimioterapia e radioterapia, e as terapias inibidoras de telomerase (Shay & Wright, 2006).

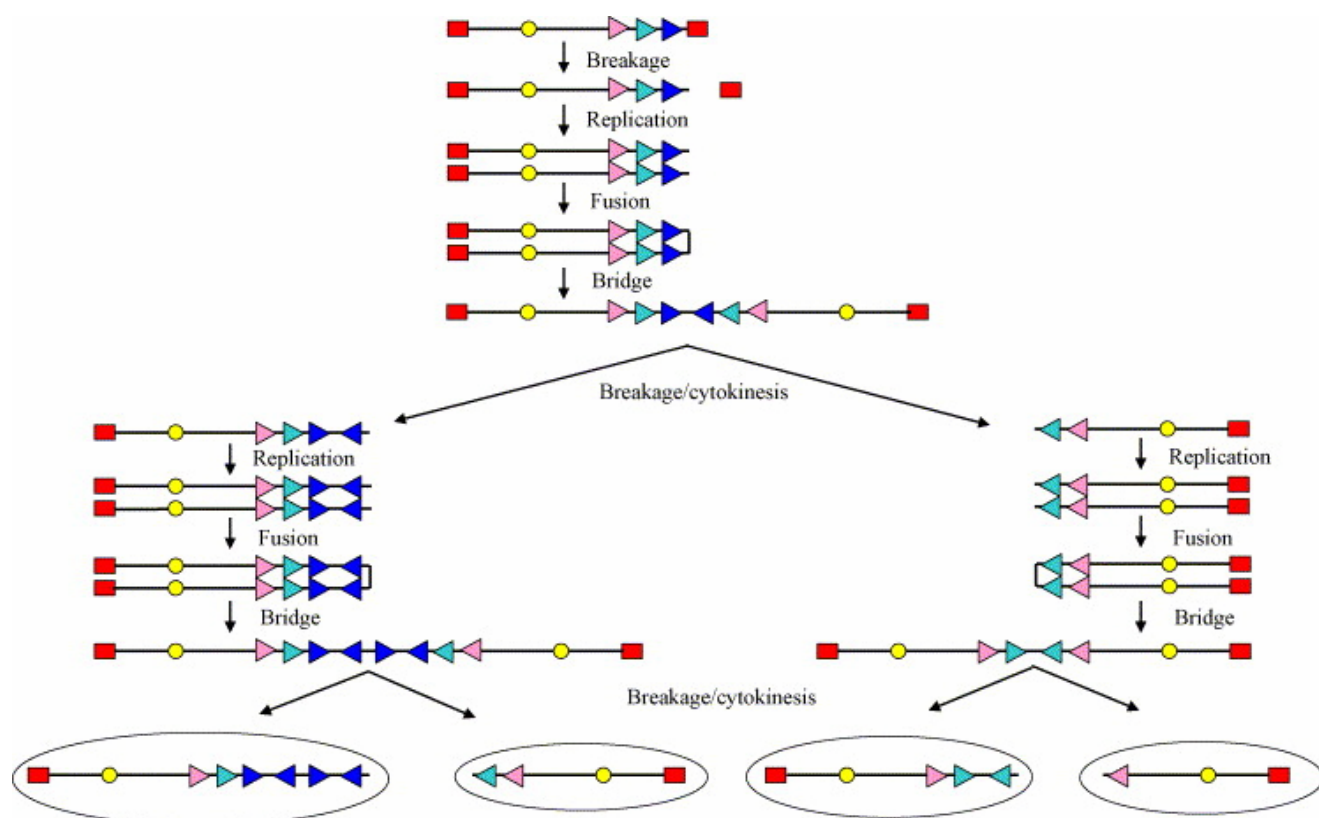


FIGURA 4. Ciclos de quebra/fusão/ponte – B/F/B (break/fusion/bridge). Representação esquemática dos ciclos de replicação que levam à instabilidade genômica causada pela perda dos telômeros. Extraído de Murnane, 2006.

3. Centrômero

3.1 Origem e função

O nome “centrômero” do grego kentron (centro) e meros (parte), foi dado à constrição primária do cromossomo por Darlington em 1936. O centrômero é a região cromossomal que determina a formação do cinetocoro e possibilita a coesão das cromátides irmãs durante a divisão celular. Através do cinetocoro, o cromossomo interage com as fibras do fuso, possibilitando a segregação cromossômica correta (Villasante e col., 2007). É sabido que um cromossomo sem centrômero, embora capaz de se replicar, é perdido após uma ou duas divisões celulares (Wagner e col., 1993). Eles são, portanto, cruciais para a estabilidade genética, e defeitos na função centromérica têm sido associados a doenças como câncer e outras síndromes genéticas, como por exemplo, a síndrome ICF (imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais).

Morfologicamente o centrômero divide o cromossomo em duas partes, chamadas de braços, onde o braço mais curto é denominado de “p” (*petit*) e o mais longo de “q” (subseqüente a “p”).

Quanto à posição centromérica, os cromossomos podem ser classificados como telocêntricos, acrocêntricos, metacêntricos ou submetacêntricos. Nos cromossomos ditos telocêntricos, os centrômeros localizam-se em uma das extremidades e não há braço curto. Nos acrocêntricos, o centrômero é localizado próximo a umas das extremidades, nos metacêntricos, a localização dessas estruturas é mediana e nos submetacêntricos, os centrômeros estão entre o ponto médio e as extremidades (Wagner e col., 1993).

3.2 Estrutura

A cromatina centromérica contém uma seqüência única de DNA normalmente não encontrada em outras partes dos cromossomos. Nos eucariotos mais complexos em particular, ela é chamada de heterocromatina e contém seqüências relativamente repetitivas de DNA como, por exemplo, GGAAT. Este tipo de DNA pode constituir uma

porção significativa do DNA genômico, variando de 20 a 40% do total (Wagner e col., 1993).

Duas características distinguem os centrômeros do restante do cromossomo: a presença da variante da histona H3, CENP-A e, na maioria dos organismos, a presença de heterocromatina (Pidoux & Allshire, 2005).

Os centrômeros variam em tamanho e complexidade, podendo ser formados por uma pequena seqüência (125pb) em levedura, ou por um enorme fragmento de repetições relativamente simples de 250 kb em drosófilas e 5000 kb em humanos (revisto em Choo, 1997). Estruturalmente, eles compreendem uma estrutura de cromatina diferenciada, consistindo em DNA e um complexo protéico chamado cinetocoro.

A seqüência de DNA não é conservada entre os centrômeros de diferentes organismos, embora a presença de DNA satélite seja uma característica de praticamente todos os organismos eucarióticos (Pidoux & Allshire, 2005; Amor & Choo, 2002). Esta seqüência consiste em repetições em tandem de 171 pares de bases (monômero), e é rica em AT (Choo, 1997). Estes monômeros são organizados em repetições que variam entre 3 e 5Mb de tamanho e apresentam uma alta similaridade nas seqüências que os compõem (Alkan e col., 2007).

Em camundongos, os centrômeros são compostos por duas classes de seqüências repetitivas de DNA, determinadas satélites *major* e *minor*. A seqüência *major* é composta por repetições em tandem de um monômero de 234 pares de bases. Este DNA é encontrado nas regiões pericêntricas e heterocromáticas de todos os cromossomos, com exceção do Y. Além disso, a seqüência de todos os monômeros parece ser conservada em todos os cromossomos, e este alto grau de conservação sugere freqüentes recombinações entre cromossomos não homólogos, que ainda parece ser facilitada pela natureza acrocêntrica dos cromossomos murinos (Choo, 1997).

Seqüências *minor* são encontradas com uma freqüência 10 a 20 vezes menor que as seqüências *major*. Estas seqüências são compostas de unidades básicas de 120pb organizadas em repetições de aproximadamente 300Kb, ou aproximadamente 2500 cópias por cromossomo (Choo, 1997). Deste modo, parece que a seqüência exata de DNA não é importante para a formação de um centrômero funcional e, cada vez mais, a atividade centromérica parece estar relacionada à organização da cromatina que seria centrômero-específica (Choo, 1998).

A cromatina centromérica pode ser dividida em *core* cromatina centromérica, que é o sítio de montagem do complexo cinetocoro, e em cromatina pericêntrica, que está particularmente associada com a formação da “heterocromatina”, e que é vital para a integridade estrutural do centrômero (Amor e col, 2004). Também tem sido proposto que a heterocromatina pericêntrica pode prover uma barreira física entre os centrômeros e os braços eucromáticos dos cromossomos, e assim suprimir a recombinação meiótica. No entanto, a função da heterocromatina que parece mais essencial para a função centromérica é sua habilidade intrínseca de recrutar o complexo coesivo para as regiões centroméricas. A presença da heterocromatina nos centrômeros capacita o enriquecimento da coesão nestes sítios e sua manutenção até a separação das cromátides irmãs (Amor e col, 2004; Pidoux & Allshire, 2000)

A região de heterocromatina centromérica é também uma região de silenciamento transcricional. Genes localizados nesta região estão silenciados. Este fenômeno, chamado “efeito da variação de posicionamento”, foi inicialmente descrito em drosófilas, e tem sido identificado em diversos organismos, de leveduras a humanos (Pidoux & Allshire, 2005).

3.3 Evolução centromérica, especiação, anormalidades estruturais e câncer.

O centrômero contribui para a especiação. Em camundongos, a especiação é comumente alcançada pela presença de cromossomos telocêntricos que apresentam uma alta taxa de homogeneização. Existe uma identidade maior que 99% entre as seqüências telocêntricas de todos os cromossomos de camundongos, o que leva a freqüentes recombinações e a uma manutenção evolucionária estável. Esta similaridade genética, contudo, também possibilita a formação de translocações Robertsonianas (Rb) (Kalitsis e col., 2006; Garagna e col., 2001). Este tipo de translocação foi primeiro descrito em 1916 em gafanhotos por W. R. B. Robertson (revisto em Gardner & Sutherland, 2004). Camundongos com translocações Rb existem na natureza (Gazave e col., 2003; Nachman & Searle, 1995) e estas translocações são também comuns em camundongos de laboratório. Na natureza, os camundongos que carregam cromossomos com translocações Rb apresentam fertilidade reduzida (Bidau e col., 2001; Merico e col., 2003).

Fusões terminais de cromossomos humanos acrocêntricos geram translocações Robertsonianas. Estas translocações constituem a mais comum anormalidade genética em fetos abortados e recém nascidos (Jacobs, 1981; Nielsen e Wohler, 1991; Kim e Shaffer, 2002). Contudo, translocações Rb também têm sido encontradas em lesões genéticas adquiridas ou constitutivas como cânceres hematológicos (Welborn, 2004; Qian e col., 2002), tumores sólidos (Padilla-Nash e col., 2001; Bayani e col., 2003), e no início da leucemia mielóide aguda (Shimokawa e col., 2004)

A posição espacial dos centrômeros no núcleo interfásico pode ser um fator que aumenta a propensão ao rearranjo (Guffei e col., Louis e col., 2005). Além disso, a grande homologia entre as seqüências centroméricas dos diferentes cromossomos pode também ter um papel na freqüência elevada de translocações nestas regiões (Bayani e col., 2006). Rearranjos estruturais em osteosarcomas mostram que quase 30% dos pontos de quebra acontecem nas regiões pericentroméricas (Bayani, 2003). Da mesma maneira, estudos em tumores de próstata mostram uma alta freqüência de quebras em regiões centroméricas e pericentroméricas (Vukovic, 2007; Beheshti, 2000). O freqüente envolvimento de regiões centroméricas na instabilidade genômica em câncer é também discutida por Bayanni e colaboradores em uma revisão recente (2007).

As células tumorais parecem seguir princípios evolucionários durante o processo de transformação maligna. Portanto, não é surpreendente que regiões pericentroméricas sejam *hotspots* tanto para recombinação durante a evolução (Yue e col., 2005) quanto ao longo da transformação maligna (Jamet e col., 2005; Shaw e Lupski, 2004). Neste contexto, um estudo realizado por Darai e colaboradores (2005) verificou que pontos de quebra no cromossomo 3p21.3 em tumores humanos coincidiam com as quebras evolucionárias identificadas em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Fugu rubripes*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Canis familiaris*.

3.4 Organização nuclear dos centrômeros no núcleo interfásico.

3.4.1 – Ciclo celular

A organização tridimensional (3D) dos centrômeros no núcleo interfásico tem sido estudada no contexto da diferenciação celular, ciclo celular, desenvolvimento embrionário e transformação celular. Estudando fibroblastos diplóides humanos, Bartholdi (1991) descreveu que a posição dos centrômeros varia durante o ciclo celular. Em G1, os centrômeros estariam associados com o nucléolo ou fundidos em cromocentros, com poucos centrômeros sozinhos. Na fase S, os centrômeros fusionados se dispersariam e formariam padrões distintos (anéis ou linhas). Na prófase, os centrômeros estariam condensados em pontos duplos distintos.

A análise de linfócitos humanos (Weimer e col., 1992) também indica uma organização ciclo celular-específica dos centrômeros no núcleo interfásico. Usando anticorpos direcionados a seqüências centroméricas (ACAS) de pacientes com síndrome de CREST, estes autores descreveram um posicionamento periférico dos centrômeros em G0 e G1, que era enfraquecido na fase S. Em G2, as células apresentavam uma distribuição randômica dos centrômeros.

Sarkar e colaboradores (2007) descreveram a organização 3D de centrômeros em linfócitos de camundongos durante o ciclo celular. Eles também mostraram que a localização centromérica no núcleo é dependente do ciclo celular. Os centrômeros foram encontrados principalmente nas regiões periféricas nas fases G1 e G2 e uma distribuição mais dispersa no núcleo foi encontrada durante o crescimento logarítmico.

Os dados apresentados acima sugerem que os centrômeros são distribuídos no núcleo de forma dependente de ciclo celular em todas as células humanas e murinas examinadas até agora.

3.4.2 – Diferenciação celular

Beil e colaboradores (2002 e 2005) estudaram a organização dos centrômeros durante a diferenciação da linhagem celular de leucemia NB4. A indução da diferenciação por ácido retinóico em células NB4 induziu uma distribuição nuclear alternativa de centrômeros quando comparado com células não diferenciadas. As células diferenciadas apresentaram diminuição no número de *clusters* centroméricos (cromocentros) e a distância entre eles aumentou de 350 para 800nm.

Células T murinas diferenciadas apresentam organização centromérica diferenciada quando comparadas a células não diferenciadas (Kim e col., 2004). Enquanto as células indiferenciadas tinham seus centrômeros localizados no interior

nuclear, as células diferenciadas (CD4+ e CD8+) tinham seus centrômeros posicionados mais periféricamente. Similarmente, células troncas embrionárias humanas têm uma pequena porção de seus centrômeros localizados na periferia nuclear quando comparadas com as células já diferenciadas (Wiblin e col., 2005).

Desta forma, é possível que a diferenciação celular necessite de alterações das posições centroméricas no núcleo e que estas estejam relacionadas ao remodelamento global das funções nucleares durante este processo, tais como, mudanças na transcrição gênica e parada da replicação. A periferia nuclear parece ser a região preferencial dos centrômeros quando as células se diferenciam e é também a posição preferida dos centrômeros em G0 e G1.

3.4.3 – *Transformação maligna*

O reposicionamento centromérico no núcleo interfásico contribui também para o remodelamento do núcleo na transformação maligna. Há um significativo remodelamento das posições centroméricas no núcleo de linfócitos transformados quando comparados aos normais (Sarkar e col., 2007). Enquanto os centrômeros dos linfócitos normais de camundongo assumem uma posição periférica no núcleo interfásico, os das células tumorais se redistribuem em uma posição nuclear mais central (Guffei e col., 2007). O remodelamento de posições centroméricas permite também o desenvolvimento de translocações Robertsonianas nos núcleos das células murinas depois da desregulação condicional de c-Myc (Guffei e col., 2007). O mesmo rearranjo é também observado em células com desregulação constitutiva de c-Myc (Guffei e col., 2007; McCormack e col., 1998).

Os centrômeros e suas regiões pericêntricas são evolucionariamente dinâmicas. Estas características reforçam a hipótese de que centrômeros reposicionados espacialmente podem então interagir entre eles permitindo aumento de eventos de recombinação, quebra e fusão. Portanto, o remodelamento dos centrômeros durante a transformação celular pode permitir a ocorrência de rearranjos cromossômicos e favorecer a expressão de novos genes e novos padrões de replicação, uma vez que estes estão mais freqüentemente localizados no interior nuclear, região associada tanto com replicação quanto transcrição (Casolari e col., 2005; Lanctôt e col., 2007).

5. Instabilidade genética

A instabilidade genética é uma característica comum à maioria dos tumores. Todas as células tumorais apresentam cariótipos anormais, com rearranjos numéricos ou cromossômicos (revisto em Mitelman, 2000).

A instabilidade genética é geralmente classificada em dois tipos: instabilidade de microssatélite (MIN) e instabilidade cromossômica (CIN) (Rajagopalan e col., 2003). A instabilidade de microssatélite é representada por simples trocas de bases que ocorrem devido a defeitos no sistema de reparo de DNA (Kolodner e col., 1995; Modrich, 1997), enquanto a instabilidade cromossômica é caracterizada por cariótipos apresentando muitas anormalidades, tanto numéricas quanto estruturais. Erros na segregação cromossômica durante a mitose levam ao fenótipo CIN, que é causado em parte por defeitos no metabolismo telomérico, ampliações e disfunções centroméricas, e por defeitos nos *checkpoints* celulares (Lengauer e col., 1997).

Nos últimos anos, diversos grupos têm associado síndromes de câncer com a instabilidade cromossômica, e alguns deles apontam a aneuploidia como um evento precoce (Komarova e col., 2002; Rajagopalan e col., 2003; Hanks e col., 2004; Michor e col., 2005) e outros, como eventos mais tardios (Hernando e col., 2004). Independentemente de quando esse evento acontece, os investigadores parecem concordar que a aneuploidia deve ser reconhecida como um dos principais eventos no processo de transformação maligna (Hede, 2005).

A idéia da aneuploidia como causa da transformação maligna não é nova, ela foi primeiramente proposta por Theodor Boveri em 1902. Esta teoria, conhecida como hipótese da aneuploidia, foi posta de lado com a descoberta dos oncogenes e dos supressores de tumor no final dos anos 70 (Weaver & Cleveland, 2007).

Diversos genes estão envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica e representam alvos mutacionais que levariam à desestabilização dos cromossomos. Entretanto, defeitos em tais genes têm sido associados somente a um pequeno grupo de tumores humanos, e estes afetam primeiramente o número de cromossomos (Meeker e col., 2004).

Outro mecanismo associado à instabilidade genômica é a deficiência funcional do telômero. O encurtamento telomérico pode conduzir à fusão das cromátides irmãs e aos ciclos de quebra/fusão/ponte (BFB), conduzindo à amplificação extensiva do DNA e às grandes deleções terminais (revisto em Bailey & Murnane, 2006).

Do mesmo modo, as anomalias do centrômero parecem ter igualmente um papel na aneuploidia. Diversos grupos têm mostrado aumento de rearranjos cromossômicos em regiões centroméricas hipometiladas (Sawyer e col., 1995; Dobrar-Muller e col., 2000; Rodriguez e col., 2006). Além disso, a fusão centrômero-centrômero, conhecida como translocação Robertsoniana (Rb) é o rearranjo cromossômico mais comumente observado no câncer humano (Dobrar-Muller e col., 2000).

Portanto, o mecanismo molecular que conduz à instabilidade cromossômica, assim como quando este processo se inicia, permanece um mistério (Meeker e col., 2004). Neste contexto, as translocações cromossômicas podem ser apenas uma consequência da transformação maligna, mas podem atuar igualmente como a causa deste processo pela formação de genes fusionados que conduzem a uma proteína oncogênica ou a uma desregulação gênica com potencial oncogênico (Meaburn e col., 2007).

A formação de translocações é ligada ao arranjo espacial dos cromossomos envolvidos, já que exige a interação física dos mesmos. A proximidade espacial tornou-se criticamente relevante para a compreensão de como a instabilidade genômica e as aberrações cromossômicas ocorrem. É cada vez mais evidente que o genoma está organizado espacialmente de maneira não randômica dentro do núcleo interfásico e que esta organização está ligada à correta expressão do genoma (Meaburn e col., 2007). Em núcleos eucarióticos, os cromossomos estão organizados de maneira não randômica dentro de discretos territórios tridimensionais ou domínios (CT). Este posicionamento parece ser influenciado pelo tamanho do cromossomo e por sua densidade gênica, sendo os cromossomos “ricos” em genes localizados no interior nuclear e os cromossomos “mais pobres” na sua periferia (Murata e col., 2007; Khalil e col., 2007; Meaburn e col., 2007). Estudos mostram que mudanças no posicionamento nuclear dos CTs induzidos pela presença de cópias cromossômicas extras podem contribuir para o desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer (Petrova e col., 2007; Murata e col., 2007; Sarkar e col., 2007).

6. Modelo de transformação neoplásica

Foi desenvolvido em nosso laboratório um modelo murino de carcinogênese *in vitro* a partir da restrição da adesão ao substrato da linhagem não tumorigênica de melanócitos, melan-a (Correa e col., 2005; Oba-Shinjo e col, 2006). Nele, a condição de impedimento seqüencial de ancoragem foi suficiente para o estabelecimento tanto de linhagens celulares não tumorigênicas, correspondentes às etapas que levam à transformação dos melanócitos melan-a, como de linhagens de melanoma com diferentes níveis de agressividade (**FIGURA 5**).

Melan-a é uma linhagem de melanócitos pigmentados imortalizados espontaneamente a partir de melanoblastos epidermais normais de embriões de camundongos C57BL (Bennett e col., 1987). Estas células proliferam em condições semelhantes àquelas requeridas pelos melanócitos e melanoblastos de camundongos normais não estabelecidos, como a dependência de forbol miristato acetato (PMA) e o pH extracelular baixo. Elas não formam tumores em camundongos singenêicos ou *nude*, mesmo quando inoculadas em quantidade elevada (2×10^7 células por animal), e retêm todas as características de melanócitos normais testadas, exceto pela resposta proliferativa à toxina da cólera na presença de PMA e pela senescência (Bennett e col., 1987).

Células melan-a (10^5 células/ml) foram mantidas em suspensão por 96 horas – tempo que corresponde a um ciclo impedimento de ancoragem. Apesar de não serem tumorigênicas, as células melan-a formaram pequenos esferóides em uma baixa proporção de aproximadamente 0,1%. Esses esferóides foram transferidos para uma placa de cultura, cultivados em condições normais de adesão e expandidos, dando origem a uma nova linhagem, denominada 1C (linhagem obtida após um ciclo de bloqueio da adesão ao substrato). Essa sublinhagem de melan-a foi submetida a um novo ciclo de impedimento de ancoragem e, após 96 horas, células sobreviventes foram resgatadas e a sublinhagem 2C (dois ciclos de bloqueio de adesão ao substrato) foi obtida.

Estes ciclos seqüenciais de impedimento de ancoragem por 96 horas, seguidos pelo cultivo em adesão e expansão das células sobreviventes, foram repetidos dando origem às linhagens 3C e 4C (três e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente). As linhagens 1C, 2C, 3C e 4C, como a parental, não são capazes de

formar tumores in vivo, mas já apresentam crescimento independente de PMA (Oba-Shinjo e col., 2006).

Esferóides formados após submeter à linhagem 4C a um ciclo de bloqueio de adesão ao substrato foram sujeitos à diluição limitante originando diferentes linhagens de melanoma (4C3, 4C11, Tm1 e Tm5, entre outras). Uma transformação espontânea em cultura ocorreu com as linhagens celulares 4C3 e 4C11, que então passaram a ser denominadas 4C3- e 4C11- e suas descendentes 4C3+ e 4C11+, respectivamente.

Esses clones também apresentaram capacidade de crescimento independente de PMA, uma característica de células de melanoma em cultura (Mufson e col., 1979), e foram testados quanto a sua tumorigenicidade, sendo transplantados subcutaneamente (5×10^5 células/animal) no dorso de camundongos C57BL/6 singênicos. Surpreendentemente, todos os clones analisados derivados dos esferóides da linhagem 4C mostraram-se tumorigênicos, com períodos de latência para o aparecimento do tumor variando de 12 a 30 dias. Posteriormente, estes clones foram avaliados quanto à capacidade de formação de esferóides e mostraram-se capazes de formar esferóides em uma proporção 20 a 320 vezes maior que as células parentais. Além disso, estas células apresentam diferenças fenotípicas como pigmentação, velocidade de crescimento em cultura, agregação e capacidade metastática (Oba-Shinjo e col., 2006).

Assim, este modelo confere uma vantagem excepcional para elucidar quais mecanismos estão envolvidos no início da tumorigênese e quais deles são responsáveis pela sua progressão. Isso porque foram estabelecidas tanto linhagens celulares não tumorigênicas, correspondentes às etapas que levam à transformação dos melanócitos melan-a, como linhagens de melanoma com diferentes níveis de agressividade, sendo que todas elas, bem como a linhagem parental melan-a, têm uma origem genética comum.

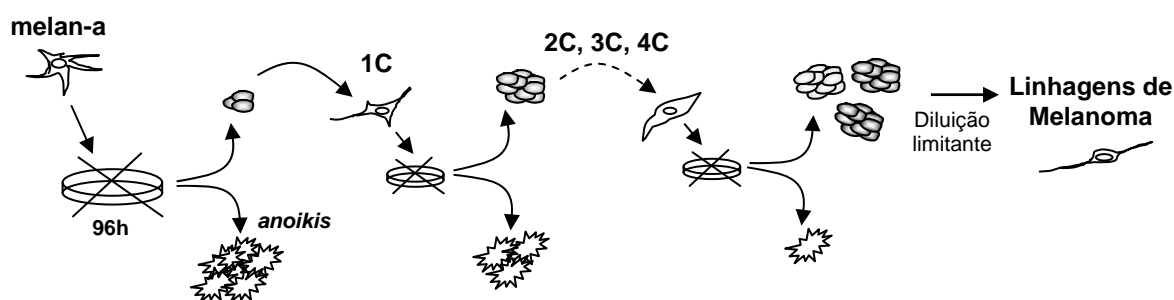


Figura 7. Modelo de transformação maligna de melanócitos associado à resistência ao anoikis.

Representação esquemática do protocolo experimental que resulta na transformação dos melanócitos melan-a. Melanócitos não tumorigênicos da linhagem melan-a foram submetidos a ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem. Os esferóides formados após submeter estas células ao 5º ciclo de bloqueio de ancoragem foram clonados e todos os clones, selecionados aleatoriamente, foram tumorigênicos quando inoculados subcutaneamente em camundongos singenêicos. Desta forma, diferentes linhagens de melanoma foram obtidas, apresentando diferentes taxas de proliferação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de diferentes padrões de pigmentação. 1C, 2C, 3C e 4C: células melan-a submetidas, respectivamente, a 1, 2, 3 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem; 96h: tempo de cultivo em condição de bloqueio de ancoragem em horas.

Objetivos

Objetivo geral:

- Analisar a evolução cariotípica ao longo da transformação maligna de melanócitos melan-a induzida pelo bloqueio de adesão ao substrato e avaliar o papel da instabilidade telomérica e centromérica neste contexto.

Objetivos específicos:

- Verificar o tamanho telomérico ao longo do modelo, identificar aberrações envolvendo essas estruturas e sua possível relação com o processo de transformação maligna de melanócitos murinos.
- Avaliar a expressão do gene Tert e da enzima telomerase e relacionar estes resultados ao *status* telomérico observado ao longo da transformação maligna de melanócitos.
- Avaliar a contribuição centromérica na formação dos rearranjos estruturais observados ao longo da transformação maligna.
- Avaliar um possível papel da proteína c-Myc na formação das translocações Robertsonianas em nosso modelo.

Material

1. Comitê de Ética em Pesquisa

O desenvolvimento deste projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, sob o processo de número 0738/07.

2. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, do sexo feminino, com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura e iluminação (ciclo 12/12 horas claro/escuro), sem restrição alimentar. A manipulação e manutenção dos animais estiveram de acordo com procedimentos padrão definidos no Guia Internacional de Princípios para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (CIOMS, Genebra, 1985).

3. Anticorpos

- Anticorpo primário policlonal produzido em coelho, direcionado à seqüência de aminoácidos 1 a 262 do gene *c-Myc* humano, reativo para amostras de camundongo, rato e humano, procedente da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (*San Diego, CA, USA*);

- Anticorpo secundário policlonal produzido em cabra, direcionado a IgG de coelho, conjugado com Alexa 488, procedente da Molecular Probes (*Eugene, OR, USA*).

4. Drogas e reagentes

- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), cloreto de sódio (NaCl), citrato trissódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), formamida deionizada, *polyoxyethilenesorbitan monolaurate* (Tween 20), procedentes da Amresco (*Solon, Ohio, USA*);

- *4'-6-Diamidino-2-phenylindole* (DAPI), Corante tetrazólico amarelo solúvel *3-(4,5,-dimethylthiazol)-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT), procedentes da Calbiochem (*Darmstadt, Germany*);

- Ácido acético glacial, ácido clorídrico 37% (HCl), azul de bromofenol, cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol absoluto, formaldeído 37%, isopropanol, xilol e xileno cyanol, procedentes da Merck (*Darmstadt, Germany*);

- Ácido bórico, bicarbonato de sódio, meio de cultura RPMI 1640, penicilina-estreptomicina, soro fetal bovino, procedentes da Gibco (*Carlsbad, CA, USA*);

- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES), brometo de etídeo, *diethylpyrocarbonate* (DEPC), *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), *phorbol 12-myristate13-acetate* (PMA), procedentes da Sigma-Aldrich Co. (*St. Louis, MO, USA*);

- agarose (*DNA typing grade*), dNTP Mix, DTT, *tris [hydroxymethyl]aminomethane* (Tris base), *tris [hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride* (Tris-HCl), *TRizol*[®], procedentes da Invitrogen (*Carlsbad, CA, USA*);

- Reagente *Bio-Rad protein assay dye reagente concentrate*, procedente da *Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)*;

- Criotubos, filtros com membrana de 0,2 μm para meio de cultura celular Filtropur, placas de cultura celular de 100 mm e de 60 mm de diâmetro, placas plásticas de cultura celular contendo 6, 24 e 96 poços, ponteiras de micropipetas com capacidade de volume máximo de 0,1, 0,2 e 1 mL, tubos

para microcentrífuga com capacidade de volume máximo de 0,2, 0,5, 1,5 e 2,0 mL e tubos para centrífuga com capacidade de volume máximo de 15 e 50 mL, procedentes da Sarstedt AG & Co. (*Nümbrecht, Germany*);

- Marcadores de peso molecular para DNA, procedentes da Fermentas International Inc (*Ontario, Canada*);

- Solução de tripsina 0,25%/EDTA 0,5mM, procedente do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil);

- Kit de detecção de atividade da telomerase: *TRAPeze® Telomerase Detection Kit – S7700 – Chemicon (Billerica, MA, USA)*;

- Formaldeído para reações de FISH e pepsina procedentes da *Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada)*;

- Etanol e metanol para reações de FISH e SKY procedentes da *Fluka Analytical (Oakville, Ontario, Canada)*;

- *Rubber Cement* procedente da *Elmer's (Columbus, Ohio, USA)*;

- *Anti-fade Vectashield* procedente da *Vector Laboratories (Burlington, ON, Canada)*;

- *Kit* de SKY para camundongo procedente da *Applied Spectral Imaging, (Vista, CA, USA)*.

5. Enzimas

- DNase I (*Amplification Grade*), Ribonuclease A (RNase A), RNaseOUT™, *Superscript™ III*, procedentes da Invitrogen (*Carlsbad, CA, USA*);

- *Taq* DNA polimerase recombinante, procedente da *Fermentas International Inc. (Ontario, Canada)*.

6. Sondas

- Sonda pan-centromérica murina conjugada com FITC procedente da *Cambio (Dry Drayton, Cambridge, England)*;
- Sonda telomérica PNA procedente da DAKO (*Glostrup, Germany*);
- Sonda centromérica humana PNA procedente da Applied Biosystems, (Foster City, CA, USA).

7. Linhagens celulares

A linhagem de melanócitos melan-a (Bennett *et al.*, 1987) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Rabinovitch da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As demais linhagens (2C, 4C, 4C3, 4C11, Tm1 e Tm5) foram estabelecidas em nosso laboratório.

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi gentilmente cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, São Paulo.

8. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com base em seqüências publicadas no *Genbank* através do site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), e estão descritos abaixo.

Tabela 1 – Seqüências dos iniciadores:

<i>Tert</i> sense	5' CAT GGG TGC CAA GTC CTG CTC 3'
<i>Tert</i> antisense	5' CTG TGC AGG CGG AGC AAA TCC 3'
β - <i>actina</i> sense	5' CGA GGC CCA GAG CAA GAG AG 3'
β - <i>actina</i> antisense	5' AGG AAG AGG ATG CGG CAG TGG 3'

Oligo dT, Tert sense, Tert antisense, β -actina sense e β -actina antisense, procedentes da Invitrogen (*Carlsbad, CA, USA*).

9. Programas

Para a quantificação da intensidade dos pixels presentes na imagem das bandas geradas por eletroforese em gel de agarose 1%, foi utilizado o programa *Image Processing and Analysis in Java, ImageJ 1.38b* (*Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>*);

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 4.00 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com*).

Métodos

1. Modelo de estudo

Neste trabalho utilizamos um modelo de transformação maligna de melanócitos murinos (Oba-Shinjo e col, 2006; Campos e col, 2007) que consiste de diferentes linhagens de melanoma (4C3-, 4C11-, Tm1 e Tm5) estabelecidas após submeter à linhagem não tumorigênica de melanócitos murinos, melan-a (Bennett e col, 1987), a ciclos seqüenciais de impedimento da adesão ao substrato. Sublinhagens não tumorigênicas de melanócitos melan-a submetidos a 2, 3 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem (2C, 3C e 4C, respectivamente) também foram estabelecidas e representam fases distintas da progressão tumoral.

As linhagens 4C3+ e 4C11+ surgiram espontaneamente em cultura a partir das linhagens 4C3- e 4C11-, respectivamente.

2. Cultura primária de macrófagos

Macrófagos (MØs) residentes foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 por lavagem da mesma com 5 ml de meio RPMI 1640 gelado, estéril e isento de soro e antibiótico. As células do lavado foram dispostas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) contendo lamínulas circulares de vidro ou em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro.

Os MØs foram mantidos em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as culturas foram lavadas três vezes com PBS, a fim de remover células não aderentes.

3. Meios de cultura celular

A linhagem de melanócitos melan-a e as linhagens obtidas após os ciclos de bloqueio de ancoragem foram cultivadas em meio RPMI 1640 pH 6,9 suplementado com 5% de soro fetal bovino, acrescido de 10 mM de ácido N-2-hioxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico (HEPES), 24 mM de bicarbonato de

sódio e 10 ml/L de penicilina – estreptomicina (meio R5). Para a linhagem melan-a, 200 nM do éster de forbol (PMA) foi adicionado ao meio.

Macrófagos extraídos do peritônio de camundongos C57BL/6 e células de melanoma da linhagem B16F10 foram cultivados em meio RPMI pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio R10).

4. Cultura e manutenção dos estoques celulares

Todas as linhagens utilizadas neste trabalho foram cultivadas em monocamadas, em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro, em meio RPMI (5% ou 10%), até atingirem subconfluência.

O pH e a temperatura das culturas foram mantidos através de incubação em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C. Estoques celulares foram armazenados em criotubos, congelados em meio de congelamento (10% de dimetilsulfóxido em soro fetal bovino) e mantidos em nitrogênio líquido.

5. Tumorigênese *in vivo*

Camundongos singenéticos C57BL/6 foram inoculados subcutaneamente no flanco esquerdo com 2×10^5 células em 100 µl de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,03 mM e K₂HPO₄ 1,46 mM, pH 7,2 – 7,4). Cada grupo experimental consistiu de 5 animais.

Os tumores foram mensurados diariamente com o auxílio de paquímetro.

O volume foi calculado pela fórmula descrita a seguir:

$$\text{Volume em mm}^3 = \frac{(\text{diâmetro menor})^2 \times \text{diâmetro maior}}{2}$$

6. Ensaio de metástase experimental

Camundongos singenéticos C57BL/6 foram inoculados na veia lateral da cauda com $2,5 \times 10^5$ células (linhagens 4C3- e 4C3+) em 100 μ l de PBS. Foram utilizados 5 animais no grupo experimental da linhagem 4C3+ e 20 no grupo experimental da linhagem 4C3-.

Após 20, 40, 60 e 80 dias, grupos de cinco animais tiveram seus pulmões removidos cirurgicamente para a verificação da presença ou ausência de focos metastáticos.

7. Ensaio de proliferação celular

Para estudos de proliferação celular, as linhagens celulares foram dispostas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço/100 μ l de meio R5) e cultivadas por 24 horas em meio completo. Após diferentes tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas), o número de células viáveis foi estimado através do método colorimétrico baseado na redução metabólica do corante tetrazólico amarelo solúvel – MTT ($C_{18}H_{16}N_5SBr$), em formazan púrpura insolúvel, pela ação da succinil-desidrogenase mitocondrial (Mosmann, 1983).

8. Extração de RNA total

O RNA total das linhagens foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol®, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para a extração, as células foram cultivadas conforme descrito acima, lavadas em PBS, removidas da placa de cultura pelo tratamento com solução de tripsina 0,25%/ EDTA 0,5 mM, lavadas em meio R10 e mais uma vez em PBS. Ao final das lavagens, as células foram homogeneizadas em 500 μ l de TRIzol® e a suspensão, transferida para tubos de microcentrífuga. Para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, as amostras homogeneizadas foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 100 μ l de clorofórmio, os tubos agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000

rpm durante 15 minutos a 4°C, o que resultou na separação da solução em três fases distintas – a fase superior aquosa, contendo o RNA, foi transferida para tubos novos. O RNA foi precipitado com 250 µl de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 1 ml de etanol 75% e centrifugado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Os tubos ficaram abertos à temperatura ambiente até que todo o etanol evaporasse. O RNA foi então ressuspensão em água tratada com 1% de DEPC (dietilpirocarbonato) e imediatamente congelado a 80°C negativos.

Para a quantificação do RNA extraído, 2 µl da amostra foram utilizados. A concentração foi determinada por um espectrofotômetro (ND-1000 – *Thermo Fisher Scientific*, EUA) através da leitura da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 260 nm, obedecendo à proporção de 40 µg de RNA/ml por absorbância de 1 (Sambrook e col, 1989). Também foram efetuadas medidas a 280 nm para avaliar a pureza do RNA. A relação dos valores obtidos a 260 e 280 nm (razão DO₂₆₀/DO₂₈₀) deveria estar em torno de 1,9 para que o material fosse considerado puro o bastante para análise. Caso este valor não fosse atingido, o material era descartado e procedia-se nova extração de RNA.

A integridade do RNA total extraído das diferentes linhagens celulares foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão fosfato de sódio 10 mM, contendo 16% de formaldeído. Para 50 ml de gel, 0,75 g de agarose foi acrescentado a 37 ml de água DEPC e 5 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 (Na₂HPO₄ 77,4 mM e NaH₂PO₄ 22,6 mM). Após o aquecimento da solução para completa dissolução da agarose, 8 ml de formaldeído foram adicionados. Utilizou-se 5 µg de RNA total de cada amostra solubilizados em 3 vezes seu volume de tampão de amostra para RNA (750 µl de formamida, 90 µl de formaldeído, 150 µl de tampão fosfato 100 mM, 0,1 mg de azul de bromofenol e 135 µl de água DEPC) e 1 µl de brometo de etídio 1 mg/ml. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos, resfriadas em gelo e aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mM a 60 volts por 2 horas. A cada 20 minutos, o tampão era recirculado para equilibrar o pH. O gel foi visualizado em transiluminador de luz

ultravioleta acoplado a uma câmera e sua imagem, digitalizada por um sistema *Kodak* de imagens (ambos equipamentos procedentes da *Kodak digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*).

9. Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa

Para excluir a possibilidade de contaminação por DNA genômico, 4 µg de RNA total foram tratados com a enzima *DNase I*, seguindo as instruções do fabricante. O volume da solução de RNA foi ajustado para 21 µl com água DEPC. Foram acrescentadas 1 unidade da enzima *DNase I* e 20 unidades do inibidor de ribonuclease, *RNaseOUT™*, em uma solução contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi inativada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8,0), seguida de incubação a 65°C por 10 minutos. O volume final da reação foi de 25 µl.

Aproximadamente 1 µg do RNA total tratado com *DNase I* (6,25 µl) foi incubado a 65°C por 5 minutos em solução contendo 500 ng de Oligo (dT) Iniciador e 1,5 mM de *dNTP Mix* em um volume de 6,5 µl, e imediatamente em gelo por 2 minutos. Depois que a reação chegou à temperatura ambiente, foram acrescentados 7 µl de uma solução contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 40 unidades de *RNaseOut™* e 200 unidades da transcriptase reversa *Superscript™ III* e a reação realizada a uma temperatura de 25°C por 5 minutos, seguidos de 60 minutos a 50°C e mais 60 minutos a 55°C, finalizando com 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram estocados a 20°C negativos.

Para a verificação da síntese e integridade da primeira fita do cDNA, o produto sintetizado por RT-PCR foi amplificado com iniciadores específicos para o gene da *β-actina* (**Tabela 1**). Nesta reação, adicionou-se 1 µl do cDNA sintetizado, tampão contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,36 mM de *dNTP Mix* (0,36 mM de cada dinucleotídeo), 0,36 mM de cada iniciador, e 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante. A reação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94°C por

5 minutos; seguida de 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão de 72°C por 10 minutos. As amostras de RNA total, antes e depois de serem tratadas com *DNase I*, também foram submetidas a esta reação para descartar a hipótese da amplificação do gene ser decorrente de uma contaminação por DNA genômico. Este controle positivo sempre era feito quando se utilizava um cDNA pela primeira vez e quando nova alíquota do mesmo era feita a partir do estoque. Além deste controle, em todas as PCRs realizadas, utilizamos como controle negativo, reações sem a adição de cDNA, para garantir que os reagentes utilizados estavam livres de contaminação.

As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts, em tampão TBE, até que as amostras alcançassem 2/3 da extensão total do gel. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado a uma câmera e sua imagem, digitalizada por um sistema *Kodak* de imagens (ambos equipamentos procedentes da *Kodak digital Science-Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*)..

10. RT-PCR semiquantitativo

Diversas ciclagens foram utilizadas para a amplificação do gene *Tert* e da β - actina (controle interno da reação). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L, utilizando-se 1 μ L da primeira fita de cDNA, tampão contendo 75 mM de Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 20 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,36 mM de *dNTP Mix*, 0,36 mM de cada oligonucleotídeo, e 1 unidade de DNA polimerase. Todas as reações foram realizadas em termociclador *Personal Eppendorf (Hamburg, Germany)*. Para análise semiquantitativa da expressão de *Tert*, foram realizadas três reações para cada amostra tendo apenas o número de ciclos diferentes entre elas. As condições de ciclagem utilizadas foram iniciadas com desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguida de 29, 32 e 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão de 72°C por 10 minutos. Para o gene da β -

actina foi utilizada ciclagem iniciada pela desnaturação a 94°C por 5 minutos, 19, 22 e 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e preparado em tampão TBE. O gel foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e a imagem, capturada por um sistema automático *Kodak* (ambos equipamentos procedentes da *Kodak digital Science-Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120*). A intensidade emitida pelas bandas foi quantificada através do programa *ImageJ1.38b*. Os resultados foram normalizados através da relação dos valores obtidos na amplificação dos dois genes (razão da expressão de Tert/ β -actina).

11. Ensaio da Telomerase (TRAP assay)

A atividade da enzima telomerase foi analisada utilizando-se o kit TRAPeze® S7700. Aproximadamente 10^6 células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, o pellet foi então lavado em 1xPBS e após nova centrifugação o pellet foi ressuspenso em 200 μ l de tampão de lise CHAPS (fornecido no kit) contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidina, 5 mM β -mercaptoetanol, 0.5% CHAPS e 10% Glicerol. As amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos, e precipitadas por centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então recuperado e transferido para tubos novos. A concentração protéica foi determinada através do reagente *Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate*, em leitor de ELISA em comprimento de onda de 570 nm e a mesma quantidade protéica (0.1 μ g do extrato protéico total) de cada amostra foi utilizada no ensaio.

A metodologia utilizada neste *kit* é baseada no método descrito por Kim e colaboradores (1994) e consiste em um sistema de duas enzimas e um tampão que utiliza a tecnologia de PCR. Em um primeiro momento, a telomerase presente nos extratos celulares adiciona certo número de repetições teloméricas (GGTTAG) na ponta 3' de um oligonucleotídeo (TS) oferecido como substrato. Após incubação por 30 minutos a 30°C, os diferentes

produtos criados pela extensão deste substrato são amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores TS e RP (iniciador reverso), gerando uma escala crescente de produtos com 6 bases de diferença, começando em 50 nucleotídeos (50, 56, 62, 68, etc).

Para a análise das amostras, 5 µl de tampão de amostra foram adicionados a cada 25 µl de reação, e os produtos foram então separados em gel de poliacrilamida 12%, a 200 V por 2 horas em 0.5 x TBE. Como controles negativos foram utilizadas a mesma quantidade de extrato (0.1 µg) de cada amostra aquecida por 10 minutos a 85°C (inativando a telomerase) e uma reação sem adição de extrato celular.

As imagens foram capturadas usando uma câmera digital *FinePix S9000* (Fujifilm, Minato, Tokio, Japan).

12. Preparação de lâminas para análise de núcleos interfásicos

Todas as linhagens foram cultivadas em placas plásticas de cultura de 100 mm de diâmetro, em meio R5, até atingirem subconfluência. As células então foram tripsinizadas e 2×10^5 células de cada linhagem foram ressuspensas em 500 µl de meio R5 e dispostas sob uma lâmina de vidro em uma placa de cultura de 100 mm de diâmetro. As placas foram então incubadas por 4 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, 10 ml de meio R5 foram adicionados a cada uma das placas e estas foram mantidas na estufa até atingirem subconfluência.

13. Preparação de metáfases

Culturas subconfluentes foram tripsinizadas e divididas em 2 placas 24 horas antes de serem utilizadas para a preparação dos cromossomos em metáfase. As células foram removidas das placas, lavadas em 1 × PBS, ressuspensas em 5 ml de solução hipotônica (0,075 M KCl) em um tubo cônico de 15 ml e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

A suspensão de células foi centrifugada a 800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e, a cada dois minutos, 5 gotas de uma solução fixadora (3:1 metanol/ácido acético) foi adicionada ao *pellet* celular. Este procedimento foi repetido até que o volume da solução atingisse 5 ml. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensão na própria solução fixadora com a ajuda de uma pipeta Pasteur, as células foram centrifugadas sob as mesmas condições descritas acima e o sobrenadante, descartado. Cinco ml de fixador foram então adicionados, o *pellet* foi ressuspensão e a solução, incubada a temperatura ambiente por 10, 20 e 30 minutos. Após nova centrifugação, 2 a 5 ml de fixador foram adicionados e as lâminas foram montadas.

14. Peptide-nuclei-acid (PNA)-FISH (hibridação *in situ* fluorescente) em núcleo interfásico

As lâminas foram retiradas das placas de cultura e imediatamente incubadas em uma solução de 3,7% formaldeído/ 1 × PBS por 20 minutos para que as células fossem fixadas. As lâminas foram então lavadas em 1 × PBS e incubadas por 10 minutos em 0.01 N HCl/ 50 µg/ml pepsina a 37°C. Em seguida, foram lavadas com 1 × PBS e mais uma vez fixadas em solução de 3,7% formaldeído por 10 minutos a temperatura ambiente.

Uma nova lavagem em 1 × PBS foi realizada para remover traços de formaldeído e uma série de soluções de etanol (70%, 90% e 100%) foi utilizada para a desidratação dos espécimes.

Em cada lâmina foram aplicados 5 µl da sonda PNA e uma lamínula de 15 × 15 mm foi colocada sobre ela e selada com *Rubber Cement*. As lâminas foram colocadas no sistema *Hybrite™* (*Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL*), onde sofreram desnaturação por 3 minutos a 80°C, e subsequente hibridização por 2 horas a 30°C. O *Rubber Cement* e as lamínulas foram delicadamente removidos, e as lâminas foram lavadas 2 vezes por 15 minutos em uma solução de 70% formamida/ 2 × SSC (0,3M de cloreto de sódio, 30mM de citrato trissódico, pH 7.0), seguida de uma lavagem em 2 × SSC/ 0.05% Tween 20 por 5 minutos a 55°C, antes da aplicação de 50 µl de DAPI (0.1 µg/ml). Finalmente, foi aplicada uma gota de *anti-fade* Vectashield e novas

lamínulas foram adicionados às lâminas, que foram então estocadas a -20°C por 12 horas para evitar mudanças nas condições da imagem.

15. Aquisição de Imagem 3D

Foram adquiridas imagens de 30 núcleos interfásicos por linhagem celular, usando o microscópio Axiolmager Z1 e a câmera Zeiss Axio Cam HRm. As imagens foram capturadas com o auxílio de uma objetiva de $63\times/1.4$ oil (todos os equipamentos procedentes da Carl Zeiss Inc. Canadá) e o tempo de exposição para Cy3 (telômero) foi de 100 ms e de 15-45 ms para DAPI (núcleo).

Para cada núcleo, 100 planos foram adquiridos a uma distância $xy:107\text{nm}$ e $z: 200\text{nm}$. O *software Axiovision 4.6* e o algoritmo *constrained iterative* (Schaefer e col., 2001) foram usados para a deconvolução das imagens.

Os sinais teloméricos a uma distância de 200 nm são detectados como um único sinal (Vermolen e col, 2005).

16. Análise das imagens 3D pelo *software Teloview*

As imagens *Z-stack* foram convertidas para arquivos tif e então lidas pelo *software TELOVIEW*. Cada imagem foi processada de acordo com o descrito anteriormente por Louis e colaboradores (2005) e Vermolen e colaboradores (2005). A medida dos telômeros foi obtida utilizando-se o *software TELOVIEW*. Através da escolha de um *threshold* para os telômeros, uma imagem binária é produzida. Baseado nisso, o centro de gravidade das intensidades é calculado para cada objeto, resultando em uma série de coordenadas (x, y, z) que define a posição das cruzes que aparecem na tela. A intensidade integrada de cada telômero é então calculada, já que ela é proporcional ao comprimento do telômero. A região de integração é determinada através do crescimento de uma esfera no topo da coordenada encontrada. Depois de cada etapa de crescimento (*iteration*), a soma deste volume (o telômero) é subtraída pela soma das regiões ao redor dele

(*background*). Quando o processo de crescimento da esfera não contribui para um aumento integrado de intensidade, o algoritmo pára, uma correção automática de *background* é obtida e a nova intensidade integrada do telômero é calculada.

Uma vez que todas as análises foram concluídas, os dados foram transferidos para um arquivo Excel e gráficos foram construídos para demonstrar a distribuição da intensidade dos telômeros em cada linhagem celular.

17. PNA-FISH em metáfases

PNA-FISH foi realizado em metáfases 2D derivadas das diferentes linhagens celulares. Sonda centroméricas humanas PNA foram sintetizadas com as seqüências listadas abaixo.

Seqüência 1: (N-terminal)Flu-OEE-ATTCGTTGGAAACGGGA-EE(C-terminal)

Seqüência 2: (N-terminal)Flu-OEE-CACAAAGAAGTTTCTGAG-EE(C-terminal)

Seqüência 3: (N-terminal) Flu-OEE-CAGACAGAAGCATTCTCA-EE(C-terminal)

Seqüência 4: (N-terminal)Flu-OEE-TGCATTCAACTCACAGAG-EE(C-terminal)

Este coquetel de sondas hibrida em todos os centrômeros de camundongo como já demonstrado por Guffei e colaboradores (2007). As sondas centroméricas foram desnaturadas a 55°C por 10 minutos e então adicionadas nas lâminas em conjunto com a sonda PNA telomérica. As lâminas foram desnaturadas a 80°C por 3 minutos, subseqüenciamente hibridadas por duas horas a 30°C usando o *Hybrite™* (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), e então lavadas em 70% formamida/ 2 × SSC.

Por fim, uma solução de DAPI (0.1 mg/ml) foi aplicada, e uma gota de *anti-fade Vectashield* foi adicionada à lâmina. Todas as imagens foram capturadas imediatamente ao final do experimento para evitar mudanças nos parâmetros de obtenção das mesmas. Foram adquiridas imagens de, no mínimo, 20 metáfases por linhagem celular (melan-a, 4C3- e 4C3+), usando o microscópio *Axioplan 2* e a câmera Zeiss Axio Cam HRm. As imagens foram

capturadas com o auxílio de uma objetiva de 63×/1.4 *oil* (todos os equipamentos procedentes da *Carl Zeiss Inc.* Canadá).

18. Spectral Karyotyping Analysis (SKY)

SKY foi realizado usando o *kit* para camundongo da ASI, como descrito abaixo.

As lâminas preparadas com as metáfases foram incubadas em 2 x SSC por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 100 µl de uma solução 100 µg/ml de RNAase A em 2 x SSC foram aplicados sobre a lâmina, essas foram então cobertas por uma lamínula e incubadas por 1 hora a 37°C em estufa umidificada. Após incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução 2 x SSC sob agitação a temperatura ambiente e então incubadas por 12 minutos a 37°C em uma solução 0.01 M de HCl pré-aquecida contendo 50 µg/ml de pepsina.

Um volume igual a 5 µl por lâmina da solução contendo as sondas cromossômicas (tubo 1) foi transferido para um eppendorf e então denaturado a 85°C por 5 minutos e depois incubado por uma hora a 37°C. Durante essa incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 1 x PBS por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação, e depois mais uma vez em 1 x PBS/ 50mM MgCl₂. As lâminas foram então fixadas por 10 minutos a temperatura ambiente em uma solução de 1% formaldeído/ 1 x PBS/ 50 mM MgCl₂ recém preparada. Posteriormente, foram lavadas em 1 x PBS e desidratadas através da incubação por 3 minutos em uma série de diluições de etanol (70%, 90% e 100%).

As lâminas foram então pré-aquecidas por 5 minutos a 70°C no forno de hibridação e imediatamente transferidas para uma solução já aquecida (70°C) de 70% formamida em 2 x SSC pH 7.0 e incubadas por 2 minutos a 70°C. Após essa incubação, foram imediatamente transferidas para uma nova série de diluições de etanol gelado (-20°C), e deixadas secar por 5 minutos em temperatura ambiente.

Em cada lâmina, foi adicionado 5 µl da solução do tubo 1 (após denaturação), uma lamínula de 22 x 22 mm foi colocada sobre ela e selada

com *Rubber Cement* e, então, as lâminas foram incubadas em uma estufa umidificada por 36 horas a 37°C.

Após a incubação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas, lavadas três vezes, sob agitação, por cinco minutos em uma solução pré-aquecida (45°C) de 50% formamida em 2 × SSC e posteriormente lavadas por mais duas vezes em 1 x SSC sob as mesmas condições.

O reagente de bloqueio (80 µl) (tubo 2) foi aplicado sobre a lâmina, uma lamínula de 22 × 22 mm foi colocada sobre a mesma e as lâminas, incubadas por mais 30 minutos a 37°C em estufa umidificada. Após a incubação, 80 µl de anti-Digoxigenina (tubo 3) foram adicionados às lâminas, novas lamínulas foram colocadas sobre elas e as lâminas, novamente incubadas por 45 minutos sob as mesmas condições anteriores.

Terminada a incubação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes de cinco minutos em uma solução de 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 a 45°C, sob agitação. Oitenta microlitros de Cy5 e Cy5.5 (tubo 4) foram adicionados por lâmina, uma lamínula colocada sobre ela e estas incubadas por mais 45 minutos a 37°C em estufa umidificada. Novas lavagens com de 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 foram feitas sob as mesmas condições acima descritas. Finalmente, 20 µl de uma solução de DAPI/*Antibleach* (tubo 5) foram adicionados às lâminas e lamínulas de 22 × 22 mm foram colocadas sobre as mesmas.

Para a análise, foi utilizado o *Spectra Cube* (ASI) no microscópio *Axioplan 2* (*Carl Zeiss, Inc.* Canadá) com uma objetiva 63×/1.4 *oil* e o *Case Data Manager 4.0 software* (ASI) para PC. Pelo menos 40 metáfases foram capturadas, sendo 20 examinadas para cada linhagem celular.

A média e o número de cada cromossomo foi observado e comparado entre as diferentes linhagens através da análise de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

Além disso, análises estatísticas utilizando os mesmos testes citados acima foram realizadas para a ocorrência de translocações, quebras e fusões de cromossomos. Valores de P iguais a 0.05 foram considerados significantes.

19. FISH centromérico em metáfases

Depois das imagens decorrentes da técnica de SKY serem capturadas e analisadas, as mesmas lâminas foram lavadas três vezes, por cinco minutos, em 1 × PBS sob agitação a temperatura ambiente, para remoção da marcação anterior e posterior hibridação com uma nova sonda. Neste experimento, foi utilizada uma sonda pan-centromérica murina conjugada com FITC para marcação dos centrômeros.

Após retirada a marcação do SKY, as lâminas foram lavadas a temperatura ambiente sob agitação em 1 × PBS/ 50mM MgCl₂ e então fixadas por 10 minutos a temperatura ambiente em uma solução recém preparada de 1% formaldeído/ 1 × PBS/ 50 mM MgCl₂. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em 1 × PBS e desidratadas através da incubação por 3 minutos em uma série de diluições de etanol (70%, 90% e 100%) e secas em temperatura ambiente.

As lâminas foram aquecidas a 70°C por 5 minutos no forno de hibridação e transferidas imediatamente para uma solução contendo 70% formamida/ 2 x SSC pH7.0 a 70°C e incubadas por dois minutos. Posteriormente, foram transferidas para uma nova série de diluições de etanol gelado (-20°C), e secas por 5 minutos em temperatura ambiente.

A sonda centromérica foi denaturada por 5 minutos a 95°C e depois mantida no gelo até que fosse utilizada. A sonda (20 µl) foi então aplicada às lâminas secas, lamínulas de 22 × 22 mm foram colocadas sobre as mesmas e seladas com *Rubber Cement*. As lâminas foram levadas à estufa umidificada e mantidas a 37°C por 16 horas.

Após a incubação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas, lavadas três vezes, sob agitação, por cinco minutos em uma solução pré-aquecida (45°C) de 50% formamida em 2 × SSC e, em seguida, lavadas por mais 3 vezes de cinco minutos em uma solução de 4 × SSC/ 0.1% Tween 20 a 45°C, sob agitação.

Finalmente, foram adicionados 50 µl de uma solução 0.1 µg/ml de DAPI, o volume coberto por uma lamínula de 24 × 60 mm e as lâminas, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água deionizada, uma gota de antifade foi aplicada à lâmina, novas lamínulas de 22

× 22 mm foram colocadas sobre a área de interesse as lâminas, levadas para captura e análise das imagens.

As imagens foram capturadas em um microscópio *Axioplan 2* (*Carl Zeiss, Inc. Canadá*) com uma objetiva de 63×/1.4 *oil* e as mesmas metáfases capturadas para a análise de SKY foram adquiridas para análise comparativa dos fragmentos encontrados. O intuito desse experimento foi confirmar que os cromossomos marcadores observados pela técnica de SKY eram originados de centrômeros.

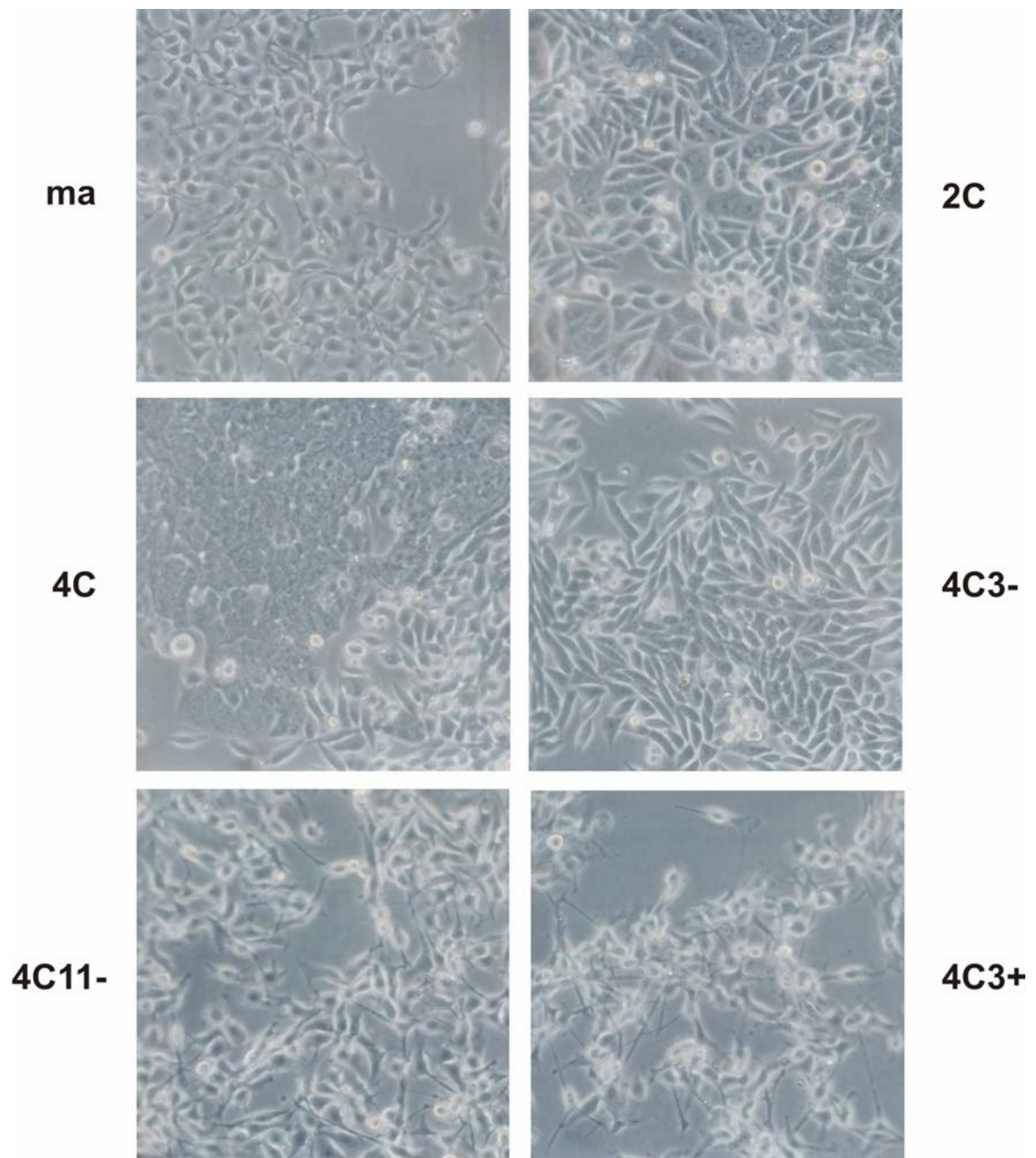
Resultados

1. Características do modelo

As linhagens celulares obtidas após os ciclos seqüenciais de impedimento de ancoragem da linhagem de melanócitos, melan-a, foram analisadas simultaneamente quanto à morfologia, taxa de proliferação *in vitro*, capacidade de formar tumores *in vivo* e capacidade metastática.

1.1 Morfologia das linhagens ao longo da transformação maligna.

Como observado na Figura 4, as linhagens 2C e 4C já apresentam modificações marcantes em sua morfologia, tendo um aspecto fusiforme, diferente da linhagem parental melan-a, que apresenta morfologia mais dendrítica. Essa morfologia apresentada pelas linhagens derivadas de melan-a muito se assemelha a das linhagens de melanoma 4C3- e 4C11-, a qual muda drasticamente quando comparada àquela apresentada pelas linhagens de melanoma 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5, de aspecto dendrítico e com menos pontos de adesão ao substrato, semelhante à apresentada pela linhagem de melanoma B16F10 (**Figura 6**).



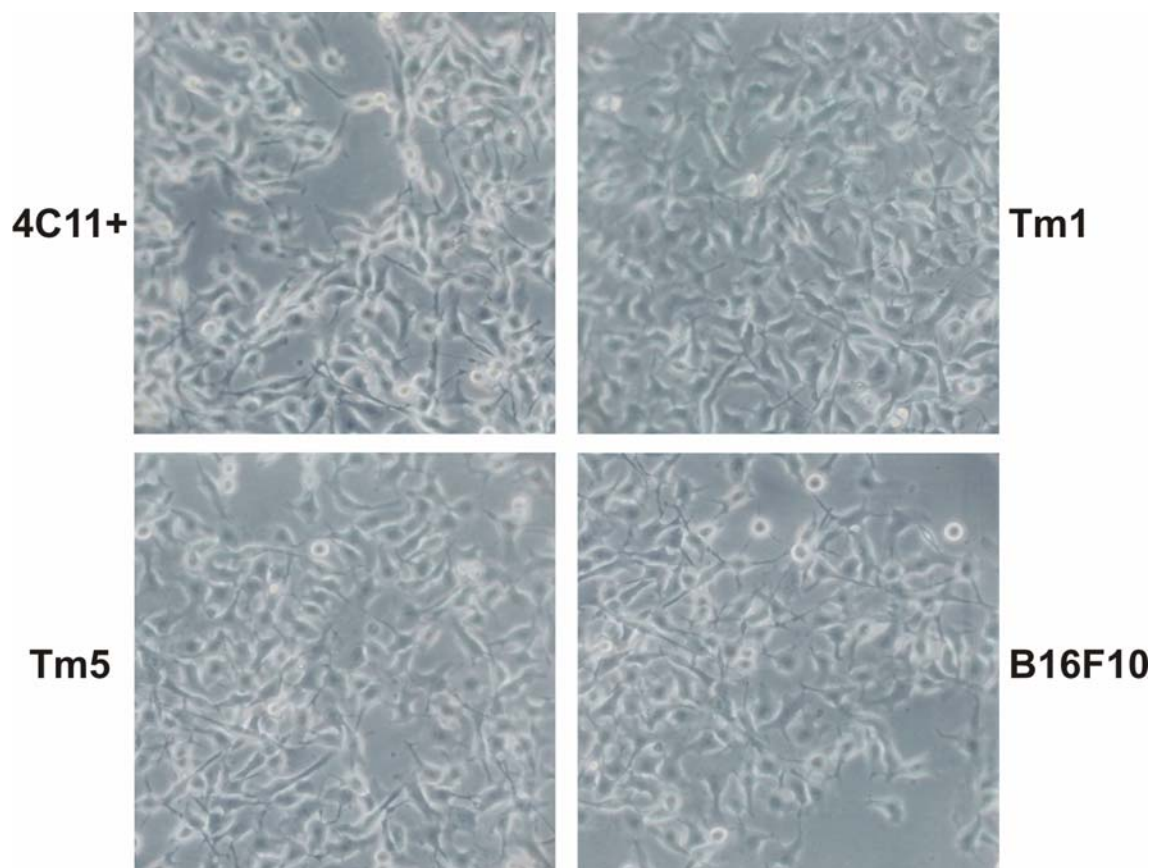


FIGURA 6. Morfologia dos melanócitos melan-a e das linhagens obtidas após ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem. As diferentes linhagens celulares foram cultivadas em placas plásticas de cultura em meio completo e fotomicrografadas utilizando microscópio invertido (Zeiss). As fotomicrografias foram obtidas em aumento de 20X. Três padrões morfológicos distintos são observados nestas linhagens: 1) melanócitos melan-a: padrão dendrítico com corpo celular bem espalhado na superfície da placa; 2) linhagens não tumorigênicas 2C e 4C e linhagens de melanoma de crescimento lento, 4C3- e 4C11-: padrão fibroblastóide com aspecto fusiforme e corpo celular bem espalhado na superfície da placa; 3) linhagens de melanoma de crescimento rápido, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: padrão dendrítico com corpo celular pouco aderido à superfície da placa. ma: melanócitos melan-a; 2C e 4C: melanócitos melan-a submetidos a 2 e 4 ciclos de bloqueio de ancoragem, respectivamente; 4C3- e 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma metastático; B16F10: linhagem estabelecida de melanoma metastático.

1.2 Análise da proliferação celular *in vitro* e tumorigenicidade *in vivo* da linhagem melan-a e suas derivadas.

Para avaliar o índice de proliferação das diferentes linhagens celulares do modelo, foi utilizado o método colorimétrico baseado na redução metabólica do corante tetrazólico amarelo solúvel (MTT). A linhagem de melanócitos melan-a não apresentou diferenças significativas em relação às linhagens 2C e 4C, em nenhum dos tempos estudados (24, 48, 72 e 96 horas), da mesma maneira que não houve diferença entre as taxas proliferativas das linhagens 2C e 4C. As linhagens de melanoma 4C3- e 4C11- apresentaram menor taxa de proliferação *in vitro* quando comparadas às linhagens 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 ($p < 0.05$). No entanto, a maior diferença foi encontrada quando comparamos as linhagens melan-a, 2C e 4C às linhagens 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 ($p < 0.001$) (**Figura 7**).

Além disso, ensaios de tumorigenicidade confirmaram que as linhagens melan-a, 2C e 4C não foram capazes de formar tumores, enquanto que as linhagens que apresentaram menor velocidade de proliferação *in vitro*, 4C3- e 4C11-, foram capazes de formar melanomas de crescimento lento após longos períodos de latência para seu aparecimento. Por outro lado, a inoculação das linhagens que apresentaram maior velocidade de proliferação *in vitro*, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5, resultou em tumores de crescimento bastante rápido, palpáveis após curto tempo de latência (**Figura 8**).

Estes dados mostraram que as linhagens tumorigênicas neste modelo murino de melanoma podem ser classificadas basicamente em dois grupos, onde as células 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5 apresentam características de um fenótipo agressivo *in vivo*, enquanto que as células 4C3- e 4C11- se comportam como linhagens de melanomas indolentes.

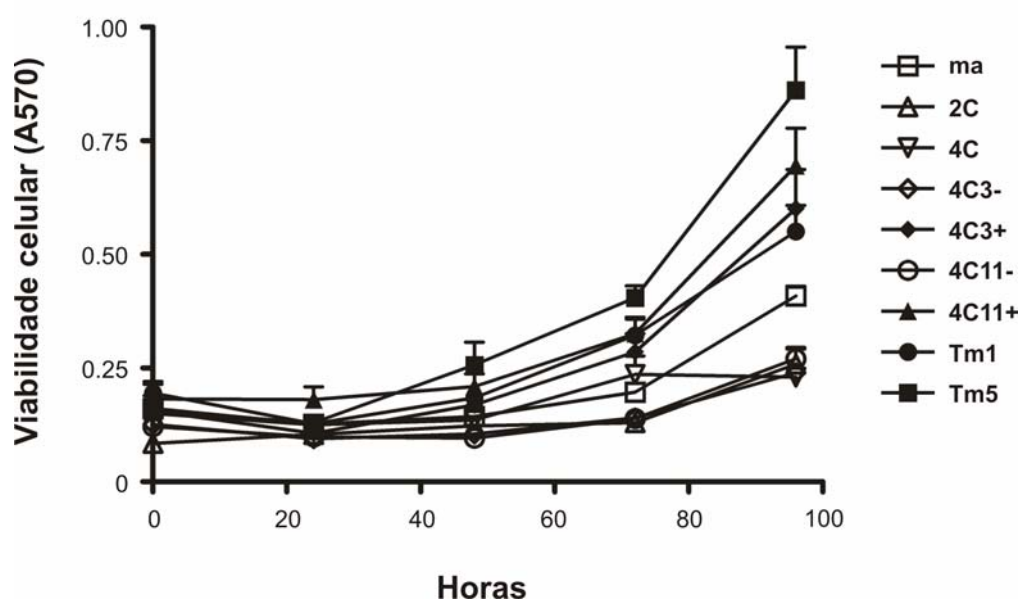


FIGURA 7. Proliferação celular *in vitro*. A taxa de proliferação das diferentes linhagens celulares utilizadas neste trabalho foi avaliada por ensaio de MTT. As linhagens celulares foram inicialmente cultivadas em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^3$ células/poço/200 μ L de meio R5), sendo o número de células estimado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido (símbolos pretos). Os valores representam a média \pm o desvio padrão dos valores obtidos de sextuplicatas.

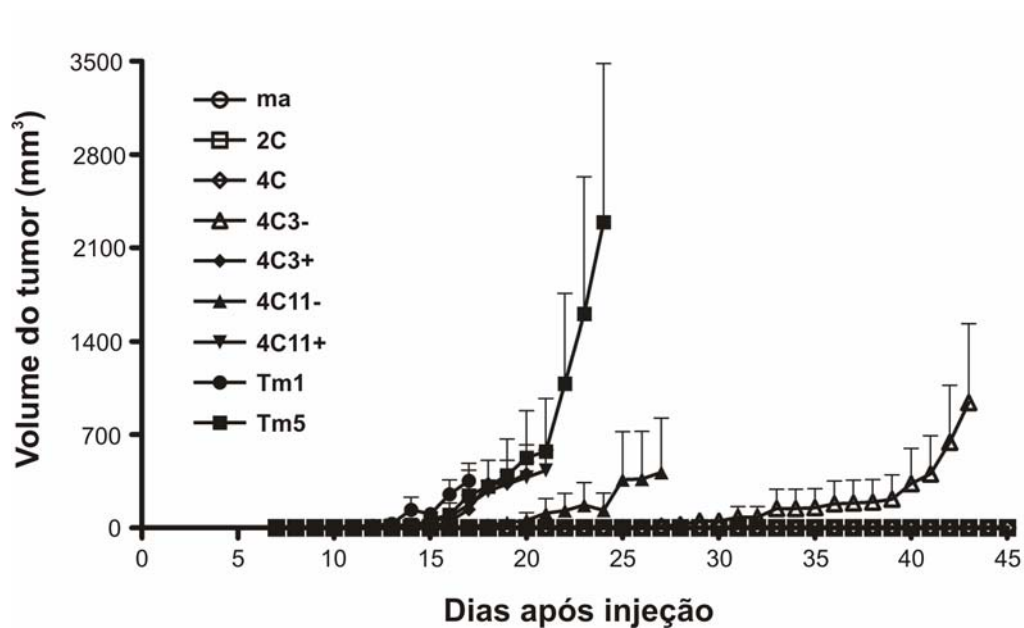


FIGURA 8. Tumorigenicidade *in vivo* das linhagens derivadas dos melanócitos melan-a.

A capacidade das diferentes linhagens celulares derivadas de melan-a de formar tumores *in vivo* foi avaliada pela inoculação de 10^6 células no tecido subcutâneo do dorso direito de camundongos fêmeas singenéticos C57BL/6. Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de tumores palpáveis. O volume dos tumores foi calculado pela fórmula $[(\text{menor diâmetro})^2 \times \text{maior diâmetro}]/2$. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido. Os valores representam a média \pm o desvio padrão dos valores obtidos de um grupo de cinco animais.

1.3 Análise da capacidade metastática das linhagens de melanoma obtidas a partir da linhagem de melan-a.

As diferenças nos tempos de latência e velocidade de crescimento tumoral encontradas entre as diferentes linhagens de melanoma do modelo nos levaram a investigar a capacidade metastática dessas células. Para isso, 2×10^5 células das linhagens 4C3- e 4C3+ foram inoculadas por via intravenosa em camundongos C57Bl6. Cada grupo experimental consistiu de cinco animais. Após 20 dias, os pulmões dos camundongos inoculados foram retirados para verificar a existência de focos metastáticos. Todos os animais inoculados com 4C3+ apresentaram focos metastáticos em seus pulmões e pericárdios (**Figura 7A**). No entanto, nenhum animal inoculado com a linhagem 4C3- apresentou focos metastáticos durante após este período. Em seguida, outros quatro grupos experimentais foram inoculados novamente com a linhagem 4C3-. Os animais desses grupos foram sacrificados após 20, 40, 60 e 80 dias para verificar a possibilidade de uma metastatização mais tardia dessa linhagem, mas mesmo após 80 dias da inoculação, nenhum animal apresentou focos metastáticos em seus pulmões (**Figura 9B, C e D**).

Resultados anteriores do laboratório mostravam resultados similares para as demais linhagens do modelo, onde as linhagens que apresentavam crescimento tumoral mais rápido *in vivo* apresentavam capacidade de metastatizar (4C11+, Tm1 e Tm5), enquanto que aquela que apresentava uma velocidade mais lenta não (4C11-).

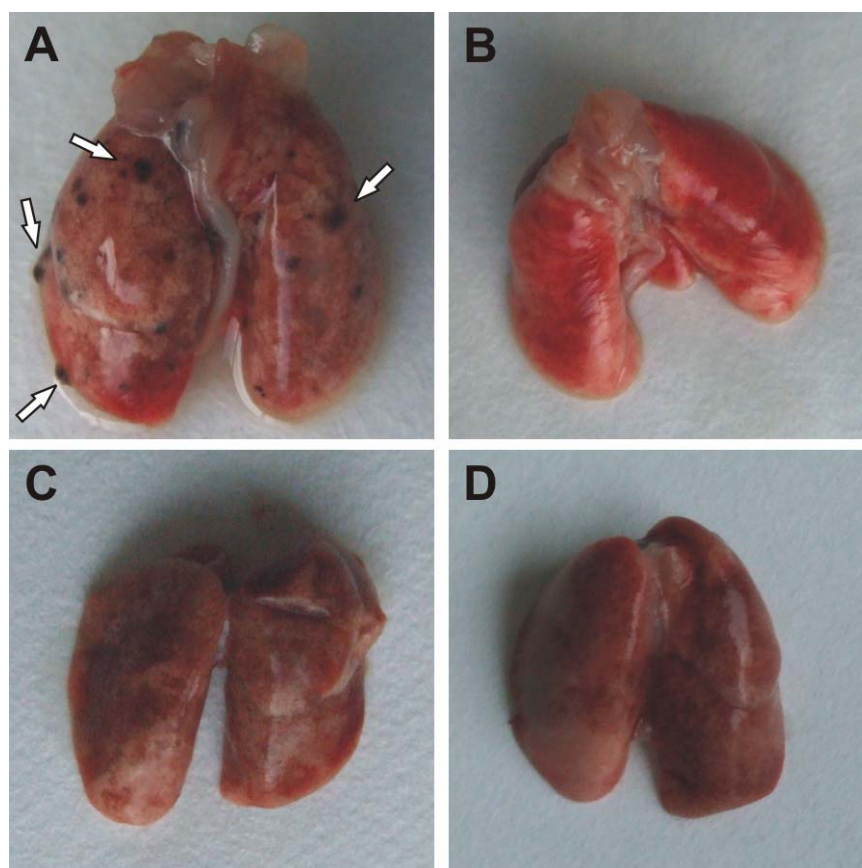


FIGURA 9 - Ensaio de metástase experimental. Inóculos de 2×10^5 células 4C3+ (A) e 4C3- (B, C e D) foram injetados via veia da cauda em camundongos fêmeas C57Bl6. Os animais foram sacrificados 20 (A and B), 40 (C) e 80 (D) dias depois da inoculação. Os pulmões foram removidos e focos metastáticos foram identificados – alguns estão indicados por setas brancas no painel.

2. Evolução cariotípica no modelo experimental de melanoma

Com base nas mudanças fenotípicas e no aumento da agressividade encontrada ao longo do modelo de transformação de melanócitos, decidimos avaliar o cariótipo destas linhagens e verificar possíveis alterações cromossômicas relacionadas às características fenotípicas já encontradas. A técnica de cariótipo espectral (SKY) foi então realizada para melan-a e todas suas sublinhagens (**Figura 10**).

Os tipos e frequências de aberrações cromossômicas espontâneas foram examinados em pelo menos 20 metáfases e estão descritos na **Tabela 2**. A mediana da ploidia de todas as linhagens celulares também está descrita na **Tabela 2**. Um aumento no número individual de cromossomos foi observado durante a transformação maligna e está mostrado na **Tabela 3**.

A célula parental melan-a aparece neste trabalho como sendo quase triplóide com uma média de 54 cromossomos por núcleo celular, o que provavelmente é consequência do tempo em cultura, uma vez que esta linhagem celular foi descrita pela primeira vez como apresentando cariótipo normal diplóide (Bennett et al, 1987). É importante ressaltar que a linhagem de melanócitos melan-a, apesar de não apresentar cariótipo diplóide normal nesta análise, também não apresentou nenhum tipo de alteração cromossômica estrutural.

Todas as demais linhagens, mesmo as não tumorigênicas, apresentaram alterações estruturais, como mostrado nas **Figuras 10, 11A e Tabela 2**.

Correlações entre as mudanças no cariótipo e o fenótipo foram observadas. Note que determinados rearranjos são mantidos entre as linhagens celulares não tumorigênicas (2C e 4C) e os melanomas não metastáticos (4C3- e 4C11-) como, por exemplo, T(8;14), T(14;8) e Fus(8,6). O fenótipo tumorigênico coincide com o surgimento de uma translocação adicional T(5,18) e T(7,X) nas linhagens 4C3- e 4C3+ respectivamente.

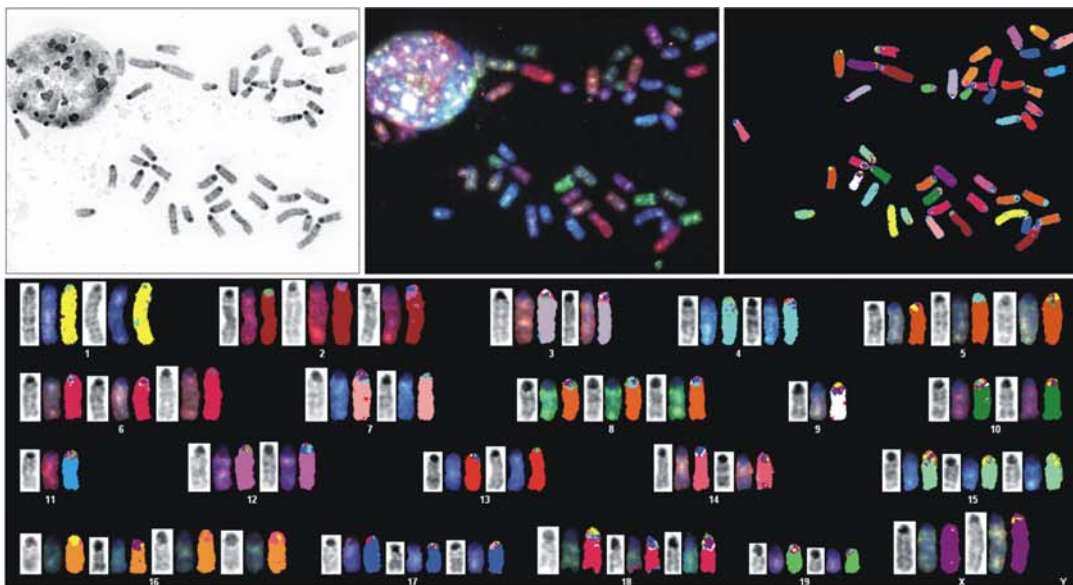
A manutenção de determinados rearranjos ao longo da transformação também acontece entre os melanomas metastáticos (4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5), mesmo com cariótipos mais complexos, indicativo de que uma maior

instabilidade ocorre nessas células. Estas linhagens ainda apresentam determinados rearranjos em comum, entre eles translocações Robertsonianas envolvendo os cromossomos 8 e 12 (**Tabela 2 e 4 e Figura 11B**). Além do aumento significativo no número de aberrações estruturais, um aumento significativo da ploidia celular foi também observado nas linhagens de melanoma metastático ($p < 0,001$) (**Figura 11C**).

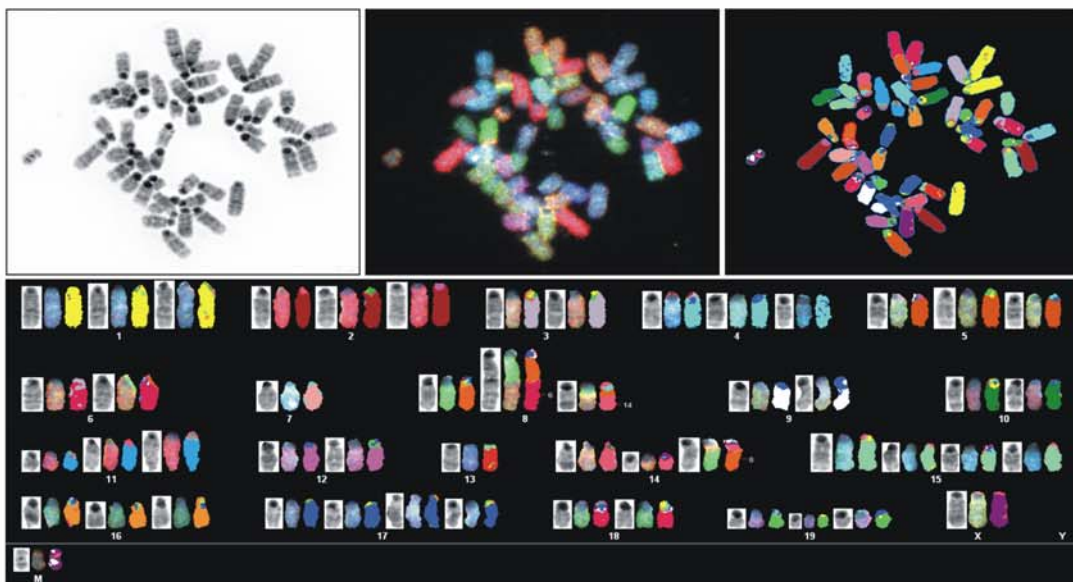
Diferenças nos tipos de aberrações estruturais também foram notadas ao longo da progressão. Enquanto nas linhagens não tumorigênicas e nos melanomas indolentes prevaleciam translocações recíprocas e fusões, nas linhagens metastáticas as translocações robertsonianas caracterizaram o fenótipo (**Tabela 2**).

Além de alterações cromossômicas como translocações e fusões, a presença constante de estruturas não classificadas (marcadores) entre as linhagens nos chamou a atenção. Estas estruturas estavam presentes em todas as linhagens, sendo mais numerosas nas linhagens de melanoma indolentes e quase desaparecendo nas linhagens tumorigênicas (**Tabela 2**), além disso, quando analisadas por banda DAPI invertida apresentavam características de heterocromatina, sugerindo uma origem centromérica que mais tarde foi confirmada por FISH (**Figura 12**).

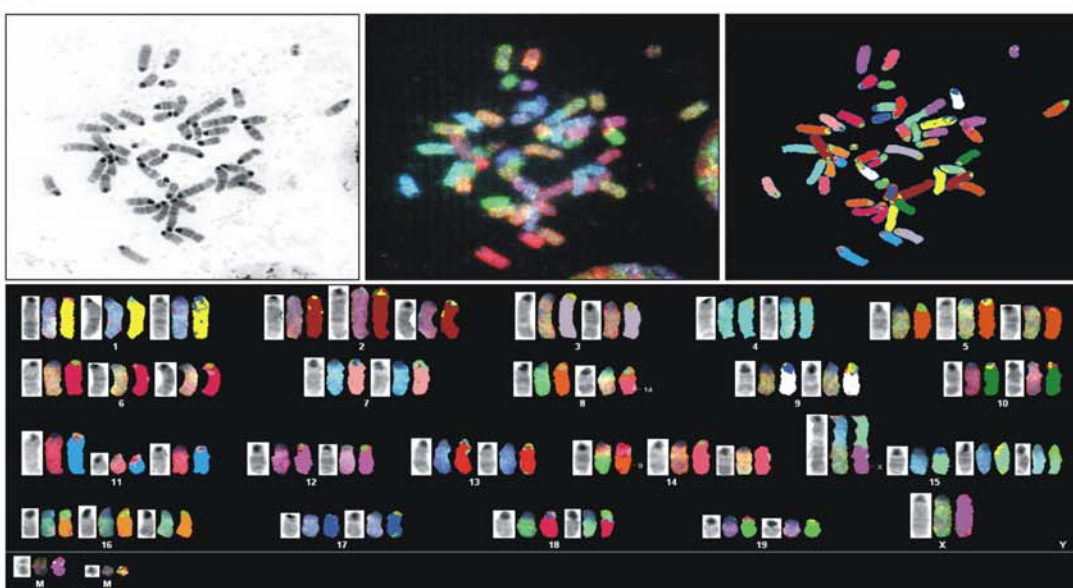
melan-a



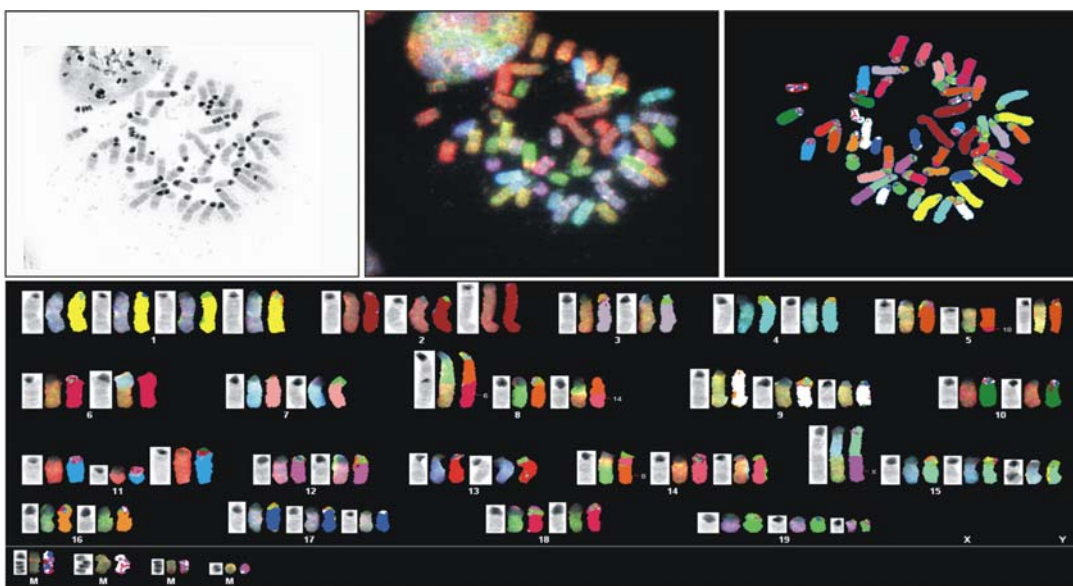
2C



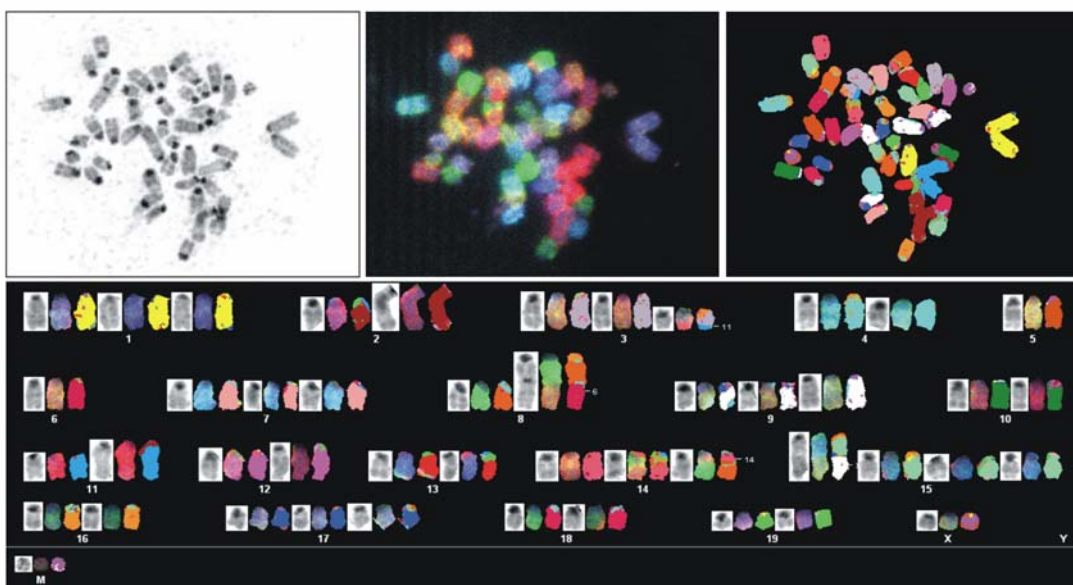
4C



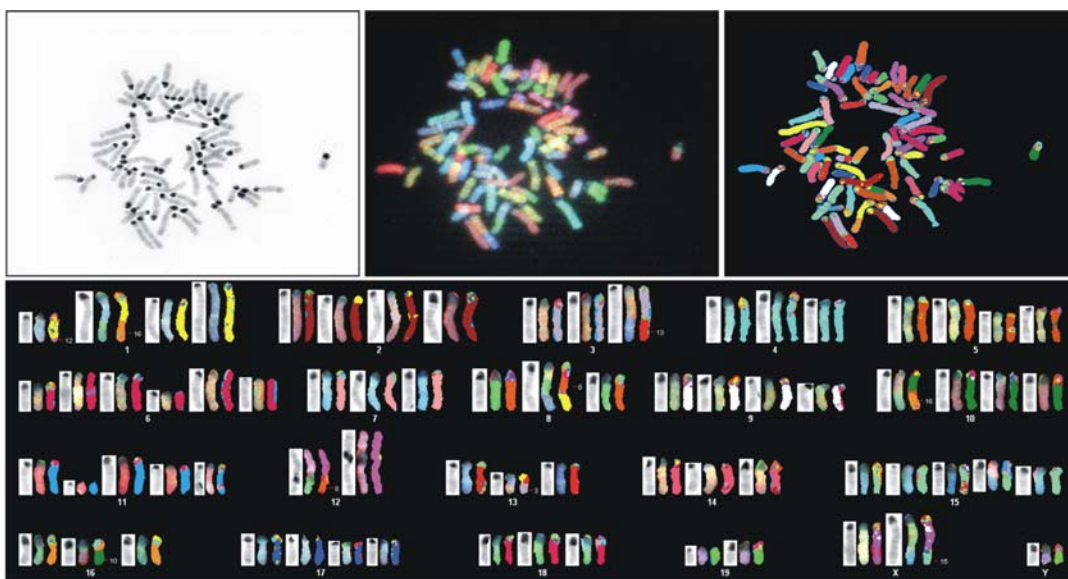
4C3-



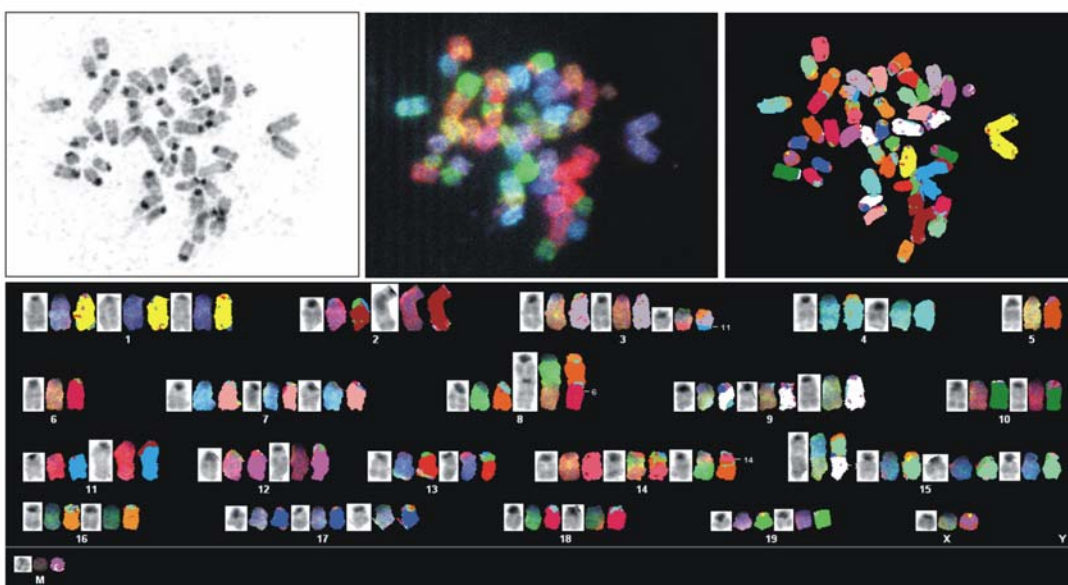
4C11-



4C3+



4C11+



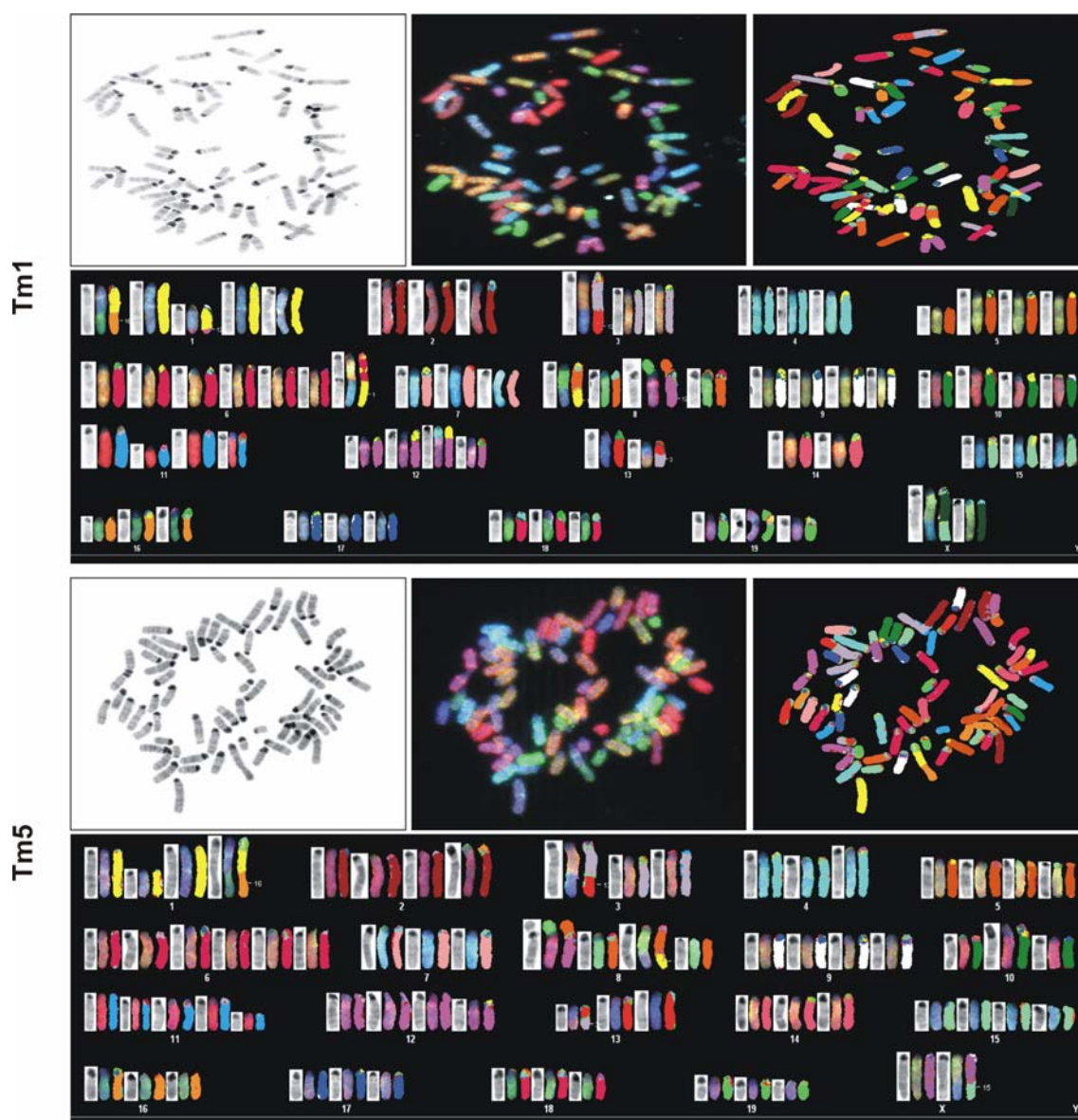


FIGURA 10 – Evolução cariotípica – Imagens representativas da técnica de SKY para cada uma das linhagens celulares do modelo. Note o aumento no número de anormalidades cromossômicas durante a progressão tumoral no modelo e o aumento no número de cromossomos a partir da linhagem 4C3+. Painel esquerdo: banda DAPI invertida; painel central: imagem espectral; painel direito: imagem com cores classificatórias determinadas pelo software de análise SKYView e painel maior: cariótipo espectral. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

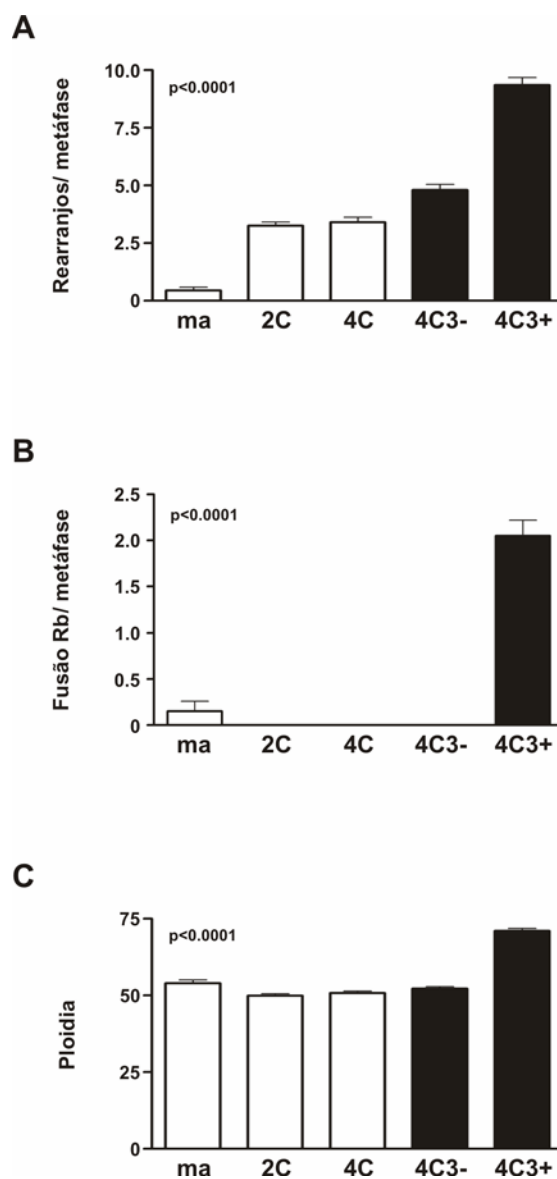


FIGURA 11 – Rearranjos cromossômicos. Um total de 20 metáfases foi examinado para cada linhagem celular. A: Número de rearranjos encontrados em cada linhagem celular por metáfase; B: Número de cromossomos Robertsonianos encontrados por metáfase do modelo de melanoma; C: Variação na ploidia encontrada durante a progressão tumoral no modelo. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

Tabela 2. Sumário dos rearranjos encontrados no modelo de melanoma.

Linagem celular	Número de cromossomos*	Fragmentos centroméricos**	Aberrações estruturais
melan-a	54	sim [21]	nenhuma
2C	51	sim [24]	T(8;14)[13] / T(14;8)[20] / F(8;6)[19] / Del(11)[18]
4C	51	sim [31]	T(8;14)[19] / T(14;8)[21] / T(15;X)[18] / F(8;6)[4] / Del(11)[18]
4C3-	53	sim [51]	T(8;14)[18] / T(14;8)[21] / T(5;18)[9] / T(15;X)[18] / F(8;6)[15] / Del(11)[17]
4C11-	51	sim [31]	T(8;14)[13] / T(14;8)[14] / T(7;X)[6] / T(15;X)[11] / F(8;6)[19] / Del(11)[16]
4C3+	72	sim [8]	T(1;16)[18] / T(8;1)[17] / T(1;12)[15] / T(3;13)[20] / T(13;3)[20] / T(X;15)[19] / T(10;16)[16] / Rb(8.12)[15] / Rb(12.12)[26] / Del(1)[18] / Del(6)[12] / Del(11)[20]
4C11+	70	sim [5]	T(1;16)[19] / T(8;1)[20] / T(1;12)[10] / T(3;13)[19] / T(13;3)[15] / T(X;15)[15] / Rb(8.12)[14] / Rb(12.12)[30] / Del(1)[18] / Del(11)[16]
Tm1	71	não	T(1;16)[19] / T(8;1)[18] / T(1;12)[14] / T(3;13)[19] / T(13;3)[18] / T(X;15)[16] / F(6;15)[14] / Rb(8.12)[13] / Rb(12.12)[18] / Rb(19.19)[16] / Del(1)[18] / Del(11)[17] / Del(8)[6] / Del(6)[6]
Tm5	69	sim [3]	T(1;16)[14] / T(8;1)[17] / T(1;12)[7] / T(3;13)[19] / T(13;3)[17] / T(X;15)[15] / Rb(8.12)[13] / Rb(12.12)[30] / Del(1)[18] / Del(11)[16]

Os dados acima são derivados da análise de 20 metáfases. Os colchetes indicam o número de vezes que determinado rearranjo foi visto no total de 20 metáfases. Somente rearranjos encontrados mais de duas vezes estão descritos na tabela. * Média do número de cromossomos de 20 metáfases. ** Ausência ou presença de fragmentos centroméricos nas metáfases. Os colchetes indicam o número de fragmentos encontrados na análise. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

Tabela 3. Aumento do número individual de cromossomos no modelo de melanoma

Cromossomo	Ma	2C	4C	4C3-	4C11-	4C3+	4C11+	Tm1	Tm5
1	2	3	4	4	4	5	4	5	5
2	3	3	3	3	3	4	4	3	3
3	2	2	2	2	2	3	3	3	3
4	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	4	4	4	4
6	4	3	3	3	2	6	6	7	6
7	2	2	2	2	3	3	3	3	3
8	3	3	2	3	3	4	4	4	4
9	2	2	2	2	2	4	4	4	4
10	2	2	2	2	2	4	4	4	4
11	2	3	3	3	3	5	5	5	5
12	2	2	2	2	2	5	4	4	4
13	2	2	2	2	2	3	3	3	3
14	3	3	3	3	3	3	3	3	4
15	3	4	4	4	4	4	4	3	4
16	4	3	3	2	2	3	3	3	3
17	3	3	3	3	3	4	4	4	4
18	3	2	2	2	2	3	3	3	3
19	4	2	2	3	3	3	3	3	3
X	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Os números apresentados correspondem à mediana da análise de 20 metáfases.

Tabela 4 – Resumo dos cromossomos envolvidos na formação translocações Robertsonianas nas linhagens metastáticas do modelo de melanoma.

Linhagem celular	cromossomo	Número de vezes envolvidos em		P
		cromossomos Rb		
4C3+	8	15	<0.01	
	12	67	<0.001	
4C11+	8	14	<0.01	
	12	74	<0.001	
Tm1	8	13	<0.01	
	12	49	<0.001	
	19	32	<0.001	
Tm5	8	13	<0.01	
	12	73	<0.001	

Os números apresentados são derivados da análise de 20 metáfases. Toda as metáfases carregavam pelo menos um cromossomo Robertsoniano. O envolvimento de cada cromossomo na formação de translocações robertsonianas é indicado, assim como sua respectiva significância. 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido

3. Instabilidade e fragmentação centromérica

Para confirmar a origem das estruturas marcadoras observadas por SKY, uma sonda centromérica específica para camundongo foi utilizada sob as mesmas lâminas utilizadas anteriormente na análise de SKY. Desta maneira, foi possível obter imagens das mesmas metáfases capturadas anteriormente e então confirmar como centroméricos os fragmentos marcadores.

A linhagem 4C3- foi escolhida para este experimento por apresentar o maior número de fragmentos centroméricos por metáfase. A figura 9 mostra o resultado do FISH centromérico. É possível visualizar o fragmento marcador sob a fluorescência DAPI (**Figura 12A**), e a marcação centromérica sob a fluorescência FITC (**Figura 12B**).

Apesar de presente em praticamente todas as linhagens (com exceção da linhagem Tm1), o número de fragmentos centroméricos aumentava ao longo da transformação maligna, das linhagens não tumorigênicas aos melanomas indolentes, tornando-se insignificante nos melanomas metastáticos ($p < 0,0001$) (**Figura 12C**).

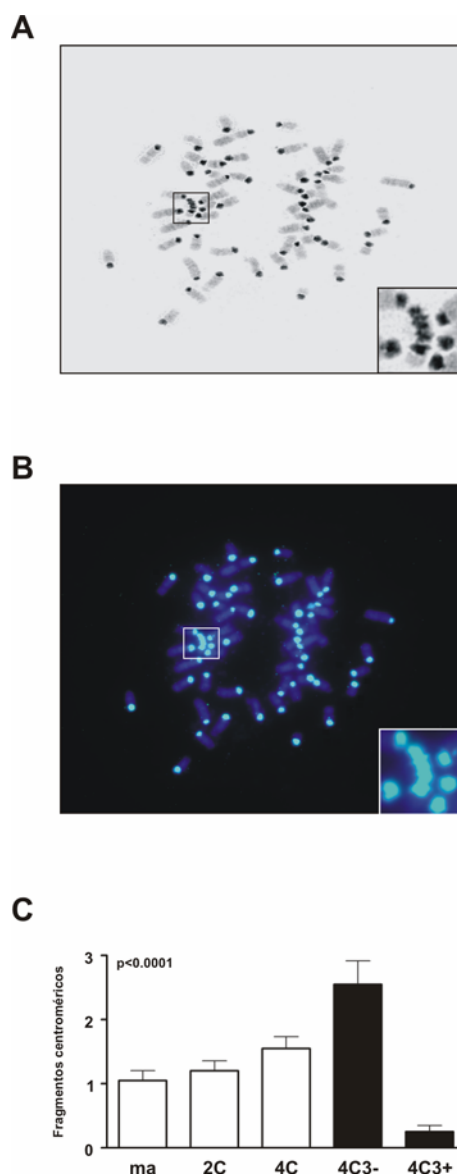


FIGURA 12 – Fragmentação centromérica – Cromossomos multicêntricos e fragmentos centroméricos identificados por FISH. Metáfases da linhagem celular 4C3- foram hibridadas usando uma sonda pan-centromérica específica para camundongo conjugada com FITC (verde) (Cambio, UK). A: DAPI invertido; B: sonda centromérica. Os quadrados brancos mostram os fragmentos centroméricos. C: número de fragmentos centroméricos encontrados nas diferentes linhagens celulares. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a dois e quatro ciclos de bloqueio da adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-, 4C11-: linhagens de melanoma de crescimento lento; 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5: linhagens de melanoma de crescimento rápido.

4. Avaliação do perfil telomérico no modelo de transformação maligna de melanócitos

O encurtamento telomérico crítico, assim como defeitos na funcionalidade destas estruturas podem gerar instabilidade genética através dos ciclos de quebra, fusão e ponte cromossomal. Estes ciclos iniciam-se com a fusão terminal das cromátides irmãs, que formam uma ponte e posteriormente se fragmentam com a separação dos centrômeros. Desta forma, uma das células filhas adquire um cromossomo com duplicação final, enquanto a outra fica com uma deleção terminal. Em decorrência da falta de telômeros, nas próximas divisões as cromátides continuam se fundindo e se fragmentando, a não ser que as cromátides adquiram novos telômeros, tornando-se novamente estáveis (Murnane, 2006). Sendo assim, decidimos avaliar o status telomérico das linhagens celulares estudadas e verificar o papel dos telômeros na evolução cariotípica identificada durante a progressão tumoral em nosso modelo. Analisamos, portanto, o tamanho telomérico, a atividade da enzima telomerase e a expressão do gene *Tert* na linhagem parental melan-a e suas linhagens derivadas.

A partir daqui, dado à semelhança entre algumas das linhagens e por motivos didáticos, somente as linhagens melan-a, 2C, 4C, 4C3- e 4C3+ foram avaliadas.

3.1 Diminuição no tamanho absoluto e variabilidade do comprimento telomérico ao longo do modelo de transformação maligna de melanócitos.

Para analisar o status telomérico das diferentes linhagens no nosso modelo de melanoma, foi utilizada a técnica de hibridação fluorescente *in situ* quantitativa (Q-FISH). Um total de 30 núcleos interfásicos, fixados de maneira a preservar sua integridade estrutural, foram analisados para cada linhagem celular.

Foi observada progressiva redução do tamanho telomérico cada vez que ciclos de impedimento de ancoragem ao substrato eram realizados. Ou seja, à medida que as células avançavam em direção a um fenótipo maligno, seus telômeros eram encurtados (**Figura 13A**). A linhagem celular imortalizada, melan-a, e as linhagens celulares não tumorigênicas (2C, 4C) mostraram grande variação no tamanho telomérico e um tamanho absoluto maior em comparação às linhagens tumorigênicas (4C3- e 4C3+), onde a variação assim como o tamanho absoluto eram menores. Em comparação com a linhagem parental (melan-a), a variação no comprimento telomérico foi significativa quando comparado às linhagens 2C ($P < 0,0005$), 4C ($P < 0,009$), 4C3- e 4C3+ ($P < 0,0001$). Em todos os casos, as diferenças no comprimento telomérico em relação à linhagem celular de melanoma metastático (4C3+) foram altamente significativas ($P < 0,0001$).

Visto que existiam diferenças entre as linhagens quanto ao comprimento telomérico, decidimos avaliar a atividade da enzima telomerase no modelo. Todas as linhagens celulares apresentaram atividade da telomerase, como mostrado pelo ensaio TRAP (**Figura 13B**). Devido à má resolução deste ensaio, utilizamos a quantificação do gene Tert por RT-PCR para avaliar possíveis diferenças nos níveis de expressão da telomerase no modelo. Embora indireta, a quantificação da subunidade Tert tem sido sugerida como um indicador da atividade da telomerase, uma vez que a transcrição deste gene parece ser o principal fator limitante da atividade desta enzima.

O nível de expressão do gene Tert foi quantificado para todas as linhagens celulares envolvidas neste estudo e nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as linhagens (**Figura 13C**).

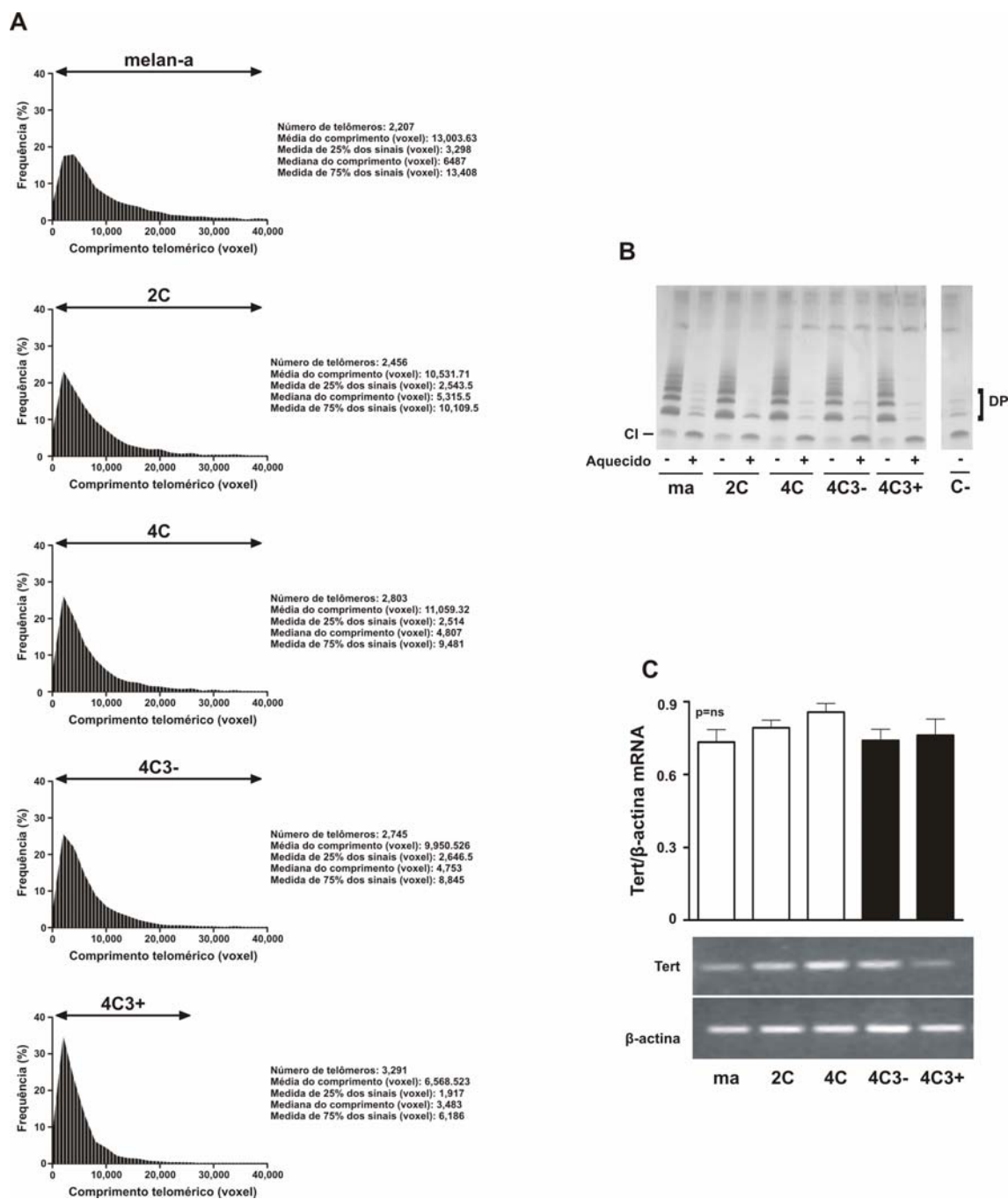


FIGURA 13 – Encurtamento telomérico na presença de telomerase – A: Distribuição dos tamanhos dos telômeros nas diferentes linhagens do modelo determinada por Q-FISH. As linhas verticais e as setas indicam diminuição da heterogeneidade dos comprimentos teloméricos através do modelo de transformação de melanócitos. B: Atividade da telomerase no modelo determinada pelo ensaio TRAP. (-) extrato celular não aquecido, (+) extrato celular aquecido, Cl: controle interno da PCR, C-: controle negativo e DP: dímeros de primer. C: Expressão de Tert analisada em melan-a e suas linhagens derivadas por RT-PCR, a expressão da β -actina foi usada como controle de normalização. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras. ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a 2 e 4 ciclos de bloqueio de adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática.

3.2 Análise da perda completa de seqüências teloméricas.

Como já discutido, além do encurtamento telomérico, outra característica de células com disfunção telomérica é a perda completa das seqüências dos telômeros. A fim de analisar possíveis perdas teloméricas durante o modelo de progressão, foi realizada a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), utilizando uma sonda telomérica em lâminas preparadas com células em metáfase. Como controle normal, utilizamos fibroblastos de rato T38Ha procedentes de cultura primária onde praticamente 100% dos cromossomos analisados apresentavam quatro sinais distintos em suas extremidades. O experimento foi realizado também nas células melan-a e nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+ (**Figura 14**).

Todas as linhagens tumorigênicas exibiram acentuada perda de sinais teloméricos, quando comparados ao controle normal ($p < 0,0001$). O maior número de extremidades livres de sinal foi observado na linhagem 4C3+, onde mais de 30% das extremidades não apresentava sinal telomérico detectável ($p < 0,001$). A linhagem tumorigênica 4C3-, por sua vez, mostrou perda de sinais em 15% ($p < 0,001$) de todas as extremidades e a linhagem parental melan-a mostrou extremidades livres de sinais em 9% dos potenciais sítios teloméricos ($p < 0,05$).

Os fragmentos centroméricos identificados anteriormente por FISH e SKY são também visíveis por esta técnica e alguns deles aparecem como mini cromossomos contendo quatro sinais teloméricos nas pontas (**Figura 14 G, H, I**) e são provavelmente resultado de fusão e quebra de centrômeros de cromossomos distintos. Por outro lado, nenhum sinal telomérico foi observado sob o ponto de fusão centromérico das translocações Robertsonianas (Rb) (**Figura 14 J, K, L**).

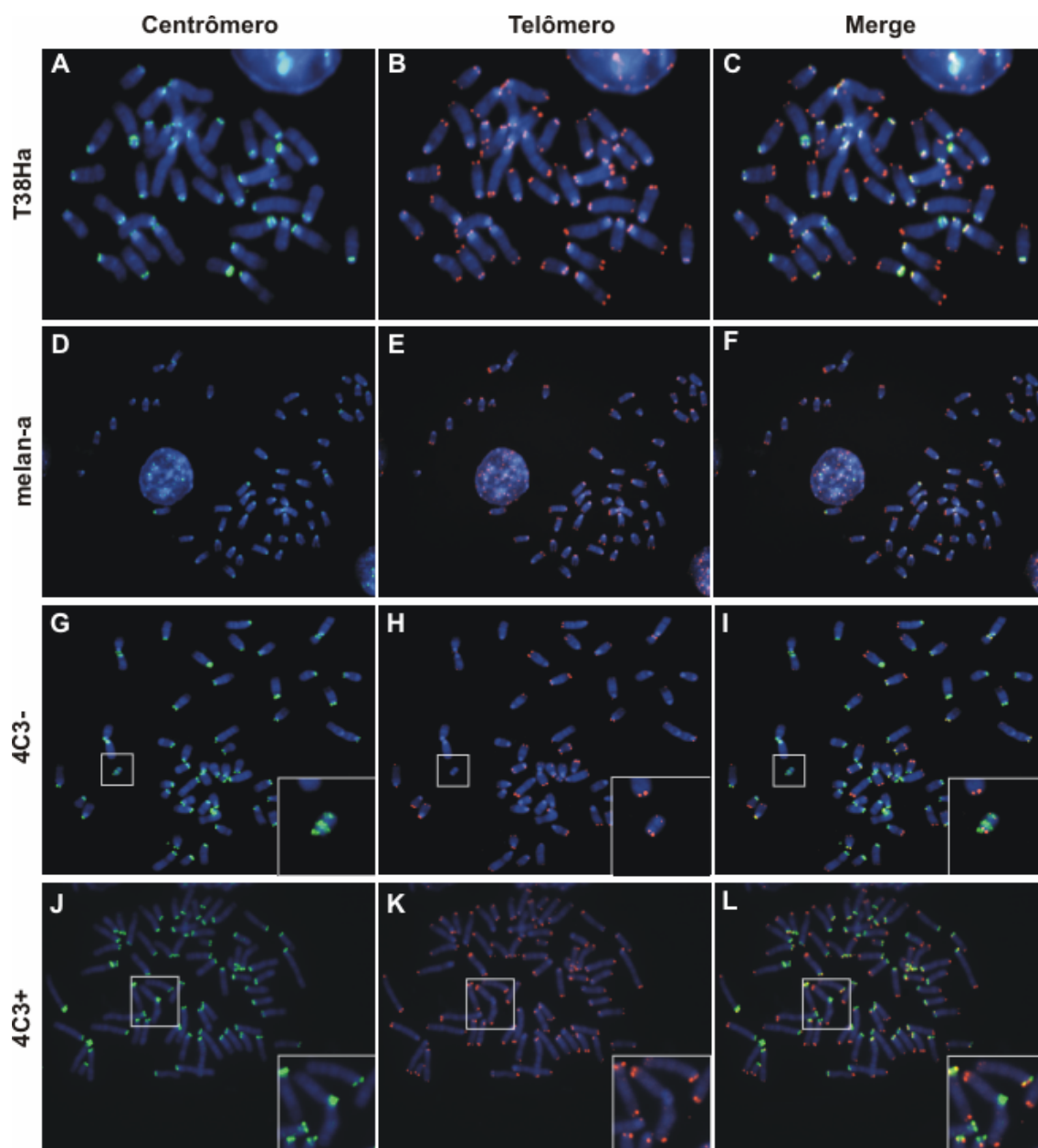


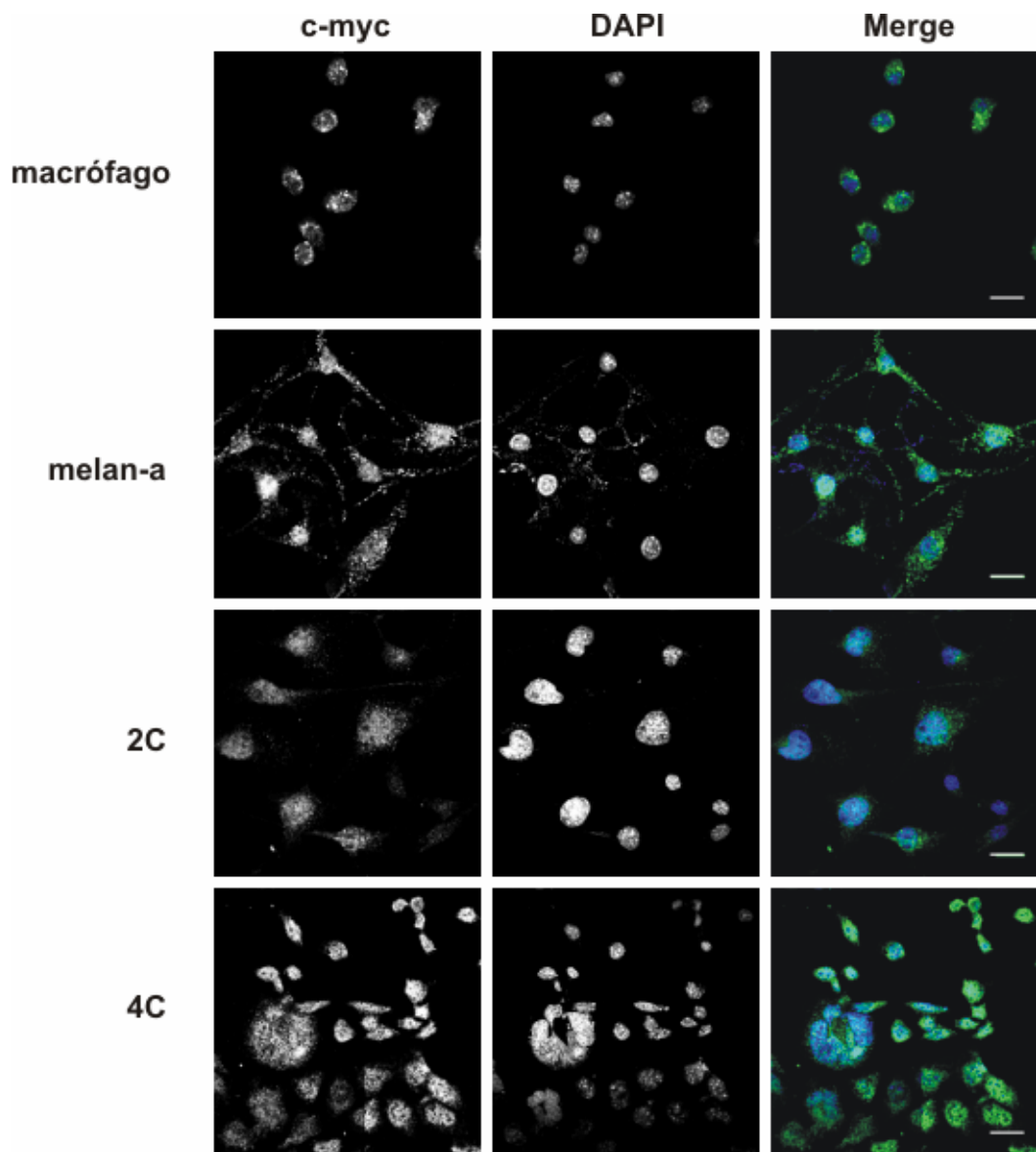
FIGURA 14 – Translocações robertsonianas e outras anormalidades centroméricas – Imagens representativas de fibroblastos normais de camundongos T38Ha e das linhagens celulares melan-a, 4C3- e 4C3+. Células em metáfases hibridadas com sondas contra seqüências centroméricas e teloméricas. Nos painéis G, H e I, está representada a linhagem celular 4C3-. Note os fragmentos centroméricos na imagem ampliada no canto direito inferior do painel G e os quatro sinais teloméricos no inserto do painel H. Nos painéis J, K e L, são mostradas metáfases representativas da linhagem 4C3+. Uma translocação robertsoniana é mostrada no inserto do painel J. Atenção ao fato de que sob o ponto de fusão centromérico não há nenhum sinal telomérico. Note que em todas as linhagens celulares existem cromossomos com ausência de sinais teloméricos nas terminações dos cromossomos, mas a linhagem 4C3+ apresenta a maior porcentagem de cromossomos com esta característica. T38Ha: fibroblastos normais de camundongos T38Ha; melan-a: células melan-a; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática.

4. Expressão de c-Myc é desregulada no modelo de melanoma

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a expressão anormal do gene c-Myc induz rearranjos cromossômicos e agregações teloméricas através da remodelação do núcleo interfásico das células (Louis e col., 2005; Mai & Garini, 2005; Caporali e col., 2007), e também sugerem que o modo de ação pelo qual tais rearranjos são estabelecidos envolve a regulação do complexo protéico que protege e envolve os telômeros (Louis e col., 2005). Além disso, sugerimos que c-Myc medeia a formação de translocações robertsonianas em células murinas através da promoção de fusões teloméricas (Guffei e col., 2007). A expressão constitutiva do gene c-Myc devido a translocações cromossômicas, mutação ou amplificação contribui para o desenvolvimento e progressão de muitos cânceres (Nesbit e col., 1999; Potter & Marku, 1997; Kuttler & Mai, 2006). É sabido que 70% dos cânceres humanos mostram expressão desregulada deste gene, o que coloca c-Myc entre os mais importantes proto-oncogenes humanos (Kuttler & Mai, 2006).

Em nosso estudo, todas as células estudadas apresentaram expressão constitutiva deste gene, representada pela marcação nuclear nos ensaios de imunofluorescência com anticorpo anti-c-Myc em células não sincronizadas. Este tipo de marcação é um indicativo de expressão aberrante de c-Myc, uma vez que este gene é expresso de maneira transiente ao longo do ciclo celular de células normais (**Figura 15**) (Kuttler & Mai, 2006).

Embora exista expressão aberrante da proteína c-Myc nas linhagens que compõe o nosso modelo, aparentemente o mecanismo responsável pelos rearranjos cromossômicos encontrados em nossas células difere daquele descrito anteriormente pelo nosso grupo (Guffei e col., 2007).



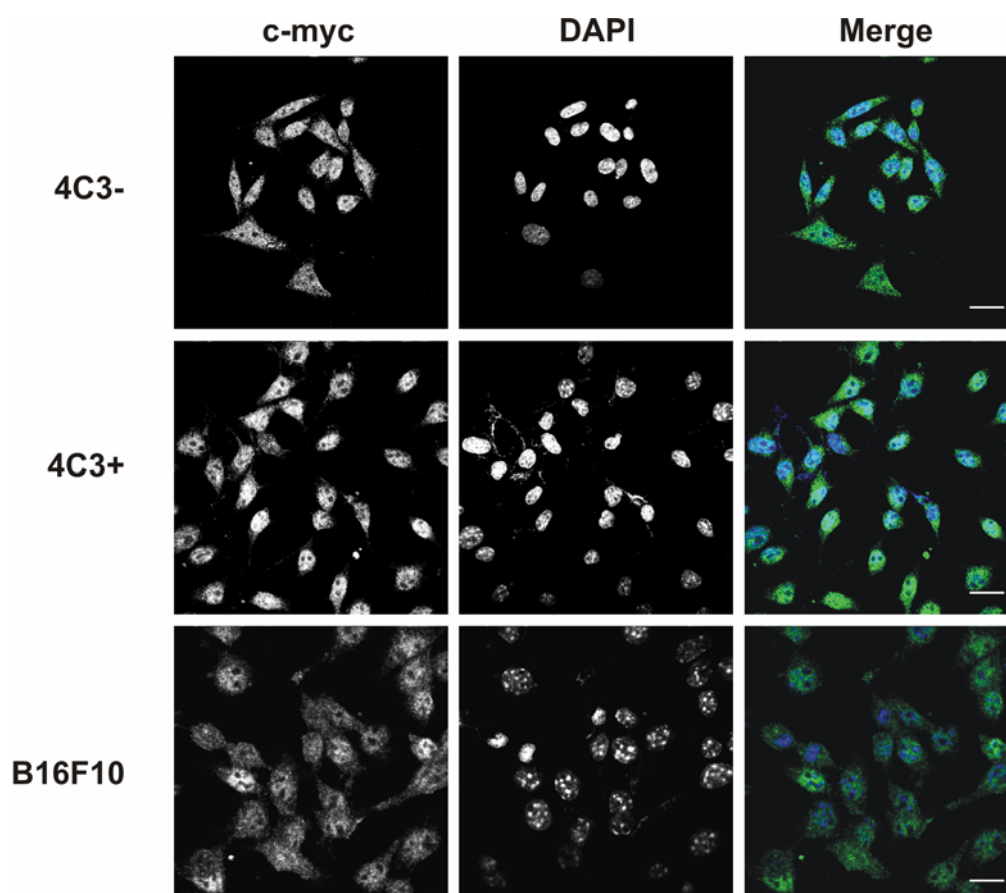


FIGURA 15 – Expressão de c-Myc. Cada painel mostra uma imagem representativa para cada linhagem celular. Coluna da esquerda: marcação da proteína c-Myc (Alexa 488, Molecular Probes), coluna central: marcação nuclear (DAPI), Coluna da direita: imagens sobrepostas. Macrófagos: macrófagos extraídos de cultura primária de peritônio de camundongos C57Bl6; ma: células melan-a; 2C e 4C: células melan-a submetidas a 2 e 4 ciclos de bloqueio de adesão ao substrato, respectivamente; 4C3-: linhagem de melanoma de crescimento lento; 4C3+: linhagem de melanoma metastática. B16F10: linhagem de melanoma metastática. Barras: 20 μ m.

Discussão

Caracterização do modelo

Nosso grupo desenvolveu recentemente um modelo de transformação maligna de melanócitos murinos onde a linhagem não tumorigênica, melan-a, foi submetida a ciclos seqüenciais de bloqueio de adesão ao substrato, processo que resultou no estabelecimento de sublinhagens não tumorigênicas de melan-a e várias linhagens de melanoma (Correa e col., 2006; Oba-Shinjo e col., 2005).

No melanoma, a possibilidade de uma correlação patológica específica com uma correspondente alteração genética permite o estudo experimental das diferentes fases da progressão deste tumor. No entanto, amostras de fases iniciais são geralmente indisponíveis para estudo, impedindo a identificação de eventos iniciais associados à transformação maligna. E neste contexto que o estudo de modelos como o nosso se torna relevante.

Desta forma, estas células têm sido utilizadas como representativas de etapas correspondendo a diferentes fases da gênese do melanoma, onde melan-a, 2C e 4C poderiam corresponder às fases de nevo a nevo displásico, as linhagens de melanoma 4C3- e 4C11- corresponderiam a melanomas pouco agressivos e as demais linhagens de melanoma, a melanomas mais agressivos ou de fase de crescimento vertical e metastático, já que são capazes de levar à formação de metástases à distância (**Figura 9A**).

Diversas características nos levam a fazer tais associações: a linhagem parental melan-a foi inicialmente descrita por Bennett e colaboradores (1987) como tendo um cariótipo normal diplóide ($2n=40$) (Bennett e col., 1987) como o nevo comum, que normalmente não apresenta mudanças genéticas e/ou alterações citogenéticas. Embora neste estudo melan-a apresente um cariótipo quase triplóide (**Tabela 2**), acreditamos que este aumento na ploidia tenha sido causado pelo tempo em que estas células permaneceram em cultura. As linhagens derivadas de melan-a denominadas 2C e 4C não são capazes de formar tumores *in vivo* (**Figura 8**), mas assim como os nevos displásicos já apresentam anormalidades cromossômicas estruturais (**Figura 11 A, B e Tabela 2**). Linhagens distintas de melanoma (4C3-, 4C11-, 4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5) obtidas a partir da diluição limitante de esferóides de células 4C são capazes de crescer como tumores quando injetadas subcutaneamente em

camundongos singenêicos, com diferentes tempos de latência para o aparecimento de tumores (**Figura 8**), e as mais agressivas apresentam morfologia semelhante à linhagem estabelecida de melanoma murino B16F10 (**Figura 6**) e cariótipos bem mais complexos (**Tabela 2**). Como pode ser observado na **Figura 7**, há uma diferença marcante na proliferação celular *in vivo* entre as diversas linhagens de melanoma, separando-as em linhagens de crescimento lento, menos agressivas (4C3- e 4C11-), e linhagens de crescimento rápido, mais agressivas (4C3+, 4C11+, Tm1 e Tm5). Além dessas modificações, alterações graduais na morfologia das linhagens estabelecidas após submeter os melanócitos melan-a a ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem foram observadas (**Figura 6**).

Evolução cariotípica

A teoria da evolução clonal do tumor sugere que a instabilidade genética precede a progressão tumoral. Células originadas de um mesmo clone subseqüentemente podem adquirir alterações genéticas adicionais que permitem a seleção dos subclones com maior vantagem de crescimento em detrimento àqueles que poderiam não ser viáveis. Este processo de múltiplas etapas levaria ao estabelecimento de um clone predominante até que novos eventos mutacionais causassem uma próxima evolução clonal (revisto em Nowell, 1986).

Em nosso modelo, é clara a existência de aberrações clonais (**Tabela 2**). Os rearranjos observados na linhagem 2C são mantidos pelas linhagens sucessoras até alcançarem o fenótipo metastático, onde o cariótipo se torna muito mais complexo. Essas observações são consistentes com a idéia de que cariótipos clonais possuem as vantagens de crescimento necessárias para a sobrevivência. Embora seja verdade que um genoma primariamente clonal possua a informação genética necessária para crescimento e sobrevivência, a adição de novos rearranjos tem importantes implicações na evolução/progressão tumoral. Nota-se neste modelo que a cada ciclo de impedimento de adesão realizado uma nova translocação era adicionada ao genoma da linhagem obtida (**Tabela 2**).

Além disso, apesar destas células apresentarem um número anormal de cromossomos (aproximadamente 50 cromossomos por núcleo), nenhum aumento significativo na ploidia foi observado ao longo da progressão, com exceção das linhagens metastáticas (**Figura 11C e Tabela 2**).

Nossos achados estão de acordo com diversos outros estudos feitos em tumores epiteliais que indicam que lesões inicialmente diplóides normalmente apresentam alguns rearranjos numéricos e estruturais antes de tornarem-se tetraplóides e apresentarem cariótipos citogeneticamente complexos (revisto em Bayani e col., 2007).

Aberrações recorrentes em melanomas humanos

A tumorigênese do melanoma em humanos envolve uma série de deleções alélicas em diversos cromossomos, incluindo 1p, 6q, 9p ou 10q, 11q e 17q. Um ou mais dos genes de susceptibilidade ao melanoma atuam como supressores tumorais, e sua mutação ou perda provavelmente contribui com o desenvolvimento desta neoplasia. Dentre estes genes estão CMM, p16 e CDK4, localizados nas regiões 1p36, 9p21 e 12q14, respectivamente (revisto em Hussein, 2004 e 2007).

Além das deleções alélicas, outros tipos de alterações como translocações e fusões também são freqüentes em melanomas humanos. O banco de dados Mitelman (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) traz uma relação das alterações recorrentes em diversos tipos de câncer, entre eles o melanoma humano (**Tabela 5**).

Ainda que nenhuma das técnicas utilizadas neste estudo nos informe a localização exata dos pontos de quebra e fusão, podemos sugerir que genes importantes no desenvolvimento do melanoma, localizados nos cromossomos envolvidos em rearranjos em nosso modelo, possam ter tido sua expressão comprometida (perdida ou super expressa) pelas alterações estruturais existentes. Desta maneira, os estudos de ortologia entre humanos e camundongos podem nos ajudar a relacionar as alterações encontradas no nosso modelo com aquelas descritas em melanomas humanos (**Figura 16**).

Sob este contexto podemos citar o oncogene BRAF, que age na via de sinalização das MAP quinases/ERKs, e afeta a divisão celular, diferenciação e

secreção. A mutação deste gene é um dos eventos mais precoces e comuns descritos em melanoma humanos (Thomas, 2006). Em camundongos, BRAF está localizado no cromossomo 6 e, em nosso modelo, alterações estruturais envolvendo o cromossomo 6 também são eventos iniciais e parecem ser importantes na aquisição do fenótipo maligno, visto que tal rearranjo é mantido até que as células adquiram um fenótipo tumorigênico (**Tabela 2**). Embora não possamos afirmar que BRAF esteja ativado em nosso modelo, e muito menos que a fusão cromossômica seja a causa desta ativação, análises comparativas como esta podem apontar candidatos interessantes para estudos futuros.

Ainda sob o mesmo ponto de vista, nós analisamos alterações envolvendo o gene supressor tumoral p53, localizado na região terminal do cromossomo 11 em camundongos. Em nosso modelo, deleções aparentemente terminais acontecem precocemente, e poderiam levar à perda deste importante supressor tumoral. No entanto, diferentemente de BRAF, resultados prévios do laboratório mostram que todas as linhagens celulares estudadas com exceção das metastáticas apresentam expressão de p53. Com base nestes resultados, é plausível supor que a deleção parcial do cromossomo 11 não afeta o locus onde está localizado o gene p53 nas linhagens não metastáticas, mas pode ser a causa da perda de expressão deste gene nas linhagens metastáticas.

Outro gene interessante localizado também nos cromossomos que sofrem alterações estruturais em nosso modelo é o gene c-Myc localizado no cromossomo 15 em camundongos. A expressão constitutiva de c-Myc pode ocorrer como resultado de translocações, mutações ou ampliações, e contribui para o desenvolvimento e progressão de muitos tipos de câncer (Potter & Marcu, 1997; Nesbit e col., 1999). Em humanos, mais de 70% de todos os tumores apresentam expressão alterada de c-Myc, fazendo deste gene um dos mais importantes proto-oncogenes (Kutler & Mai, 2006). Em nosso modelo, a expressão de c-Myc é desregulada em todas as linhagens celulares, incluindo a parental melan-a. Estudos recentes mostram que a super expressão de c-Myc em lesões iniciais de melanoma pode ser associada à supressão da senescência induzida pela ativação de BRAF (Zhuang e col., 2008), este mesmo mecanismo pode ter ocorrido nas células melan-a uma vez que estas células foram imortalizadas espontaneamente. Além disso, a

translocação entre os cromossomos X e 15, encontrada a partir da linhagem 2C, pode ter um papel na manutenção desta expressão ao longo do modelo.

Estudos mais detalhados são necessários para avaliar o verdadeiro papel das alterações estruturais sobre a expressão gênica celular em nosso modelo.

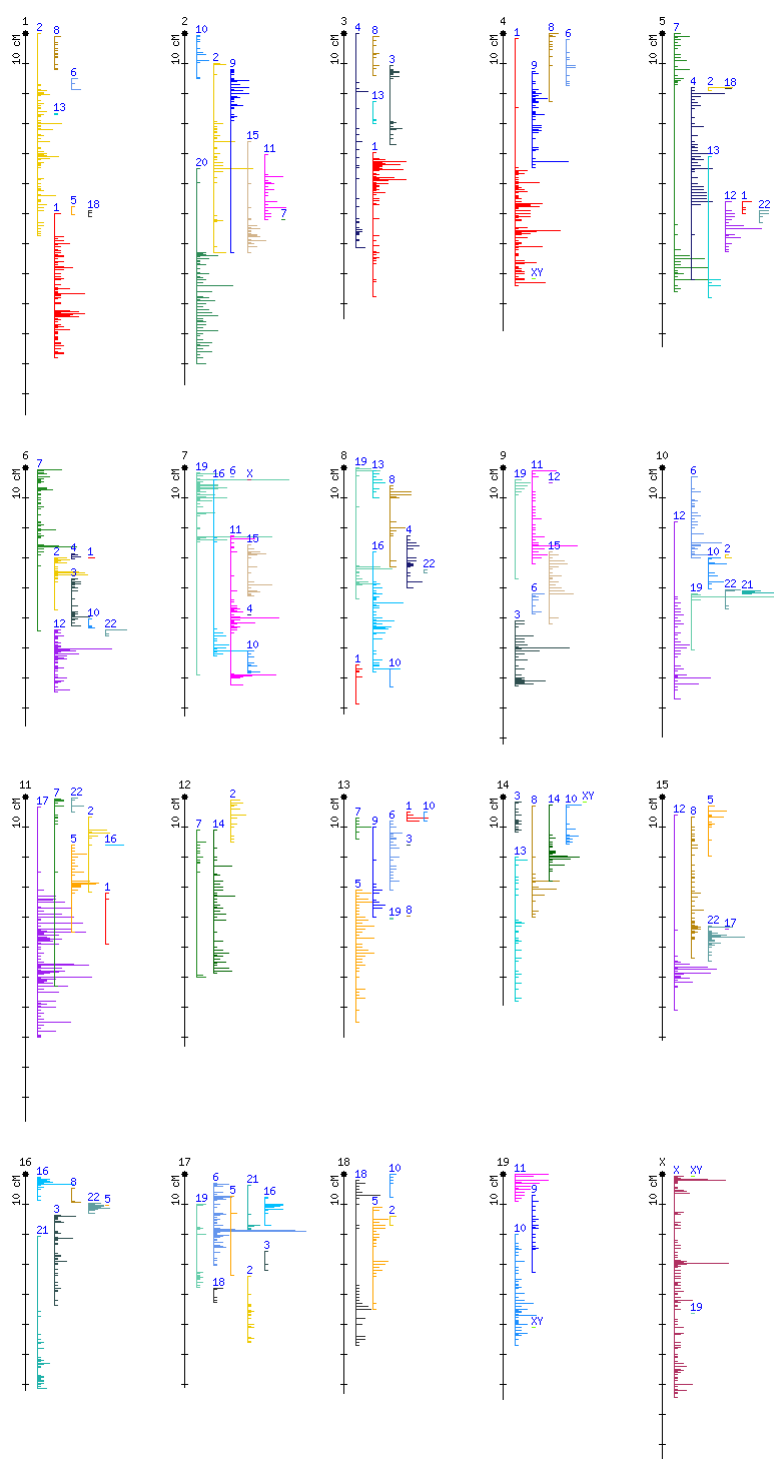


Figura 16 – Mapa de ortologia do genoma: genoma humano sob o genoma de camundongo. Este mapa nos fornece um panorama das informações de ortologia gênica entre humanos e camundongos. Ao lado de cada cromossomo murino existe uma série de histogramas que correspondem a cromossomos humanos. O número de cada cromossomo é mostrado logo acima do histograma. Cada barra no histograma é posicionada na localização em que os ortólogos se localizam. O comprimento da barra indica o número de ortologias encontradas na região (extraído de Mouse Genome Database - http://www.informatics.jax.org/reports/homologymap/mouse_human.shtml).

Tabela 5 – Alterações estruturais frequentes em melanomas humanos

<i>Translocações Balanceadas</i>	
Banda	Anormalidade
1q11	t(1;6)(q11;q11)
1q12	t(1;19)(q12;p13)
1q21	t(1;14)(q21;q32)
6q11	t(1;6)(q11;q11)
14q32	t(1;14)(q21;q32)
19p13	t(1;19)(q12;p13)
<i>Translocações Não-Balanceadas</i>	
Banda	Anormalidade
1p11	del(1)(p11)
1p13	del(1)(p13)
1p22	del(1)(p22)
1q10	i(1)(q10)
1q11	del(1)(q11)
1q32	del(1)(q32)
1q42	del(1)(q42)
2p11	del(2)(p11)
2p21	del(2)(p21)
2q11	del(2)(q11)
3p14	del(3)(p14p22)
3p22	del(3)(p14p22)
3p25	add(3)(p25)
4q21	del(4)(q21)
6p10	i(6)(p10)
6p21	del(6)(p21)
6q13	del(6)(q13)
6q14	del(6)(q14)
6q15	del(6)(q15)
6q21	del(6)(q21)
6q23	add(6)(q23)
7p11	der(7)t(7;9)(p11;q11)
7q10	i(7)(q10)
8p21	del(8)(p21)
8q10	i(8)(q10)
9p11	del(9)(p11)
9p11	der(9)del(9)(p11)del(9)(q22)
9p21	del(9)(p21)
9p22	del(9)(p22)
9q11	der(7)t(7;9)(p11;q11)
9q22	der(9)del(9)(p11)del(9)(q22)
11p15	add(11)(p15)
11q23	del(11)(q23)
12q21	add(12)(q21)
16q24	del(16)(q24)
17p13	del(17)(p13)

Alterações estruturais recorrentes em melanomas humanos, segundo o Banco de Dados Mitelman (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Del: deleção; Add: adição; der: derivativo, i: inserção, t: translocação.

Avaliação telomérica

O encurtamento telomérico e a ativação da telomerase são as aberrações mais prevalentes em lesões pré-cancerosas (Raynaud e col., 2008). Anormalidades no comprimento telomérico foram descritas em lesões pré-invasivas da mama (Meeker & Argani, 2004), pâncreas (van Heek e col., 2002), próstata (Joshua e col., 2008; Vukovic e col., 2007; Meeker e col., 2002), e muitos outros tipos de lesões precursoras de tumores epiteliais humanos (Meeker e col., 2004). Do mesmo modo, atividade de telomerase foi detectada no início de carcinogênese de diversos tecidos (Lantuejoul e col., 2005; Gulmann e col., 2005; Lancelin e col., 2000).

Para estudar o momento da ocorrência do encurtamento telomérico durante a transformação maligna de melanócitos, analisamos em nosso modelo, o perfil telomérico por Q-FISH e constatamos que, em comparação com a linhagem celular parental (melan-a), todas as demais linhagens apresentaram seus telômeros diminuídos (**Figura 13A**). Além disso, a variação entre o comprimento telomérico nas linhagens diminuiu significativamente à medida que novos ciclos de bloqueio de adesão eram realizados, direcionando o perfil telomérico destas células para uma distribuição característica de células tumorais (telômeros curtos e com pouca variação em tamanho). Estes achados estão em concordância com a idéia de que anormalidades no comprimento telomérico parecem ser uma das primeiras alterações genéticas adquiridas durante o processo de transformação maligna (Raynaud e col., 2008; Vukovic e col., 2007; Meeker & Argani, 2004).

Em nosso modelo, observamos o encurtamento telomérico ocorrendo em paralelo com a instabilidade genômica, e na presença de atividade da telomerase (**Figura 13B**). Essas observações são consistentes com o fato de que altas taxas de perda telomérica são freqüentemente observadas em tumores humanos e linhagens celulares tumorais que expressam telomerase, sugerindo que, mesmo quando as células tumorais mantêm ativamente seus telômeros, eles continuam a mostrar defeitos fundamentais que promovem perda de parte de suas seqüências (Lo e col., 2002; Chin e col., 2004) e que, embora a telomerase seja responsável pela adição de seqüências teloméricas nas pontas dos cromossomos a cada ciclo celular, uma infinidade de outras

proteínas também desempenha papéis importantes na regulação do comprimento telomérico, na sua manutenção e na formação de um complexo protetor que impede fusão cromossômica e erosão telomérica (de Lange, 2005; de Lange, 2002). Adicionalmente a isso, várias linhas de evidência sugerem também uma função protetora para telomerase, além do seu papel no alongamento telomérico (Kim e col., 2003; Zhu e col., 1999). Em recente trabalho, Xu e Blackburn (2007) descreveram uma classe distinta de telômeros extremamente curtos denominados *t-stumps* em células de câncer humano com telomerase ativa e ausência de expressão de alguns *checkpoints* do ciclo celular. Tais estruturas, além de serem toleradas por essas células, parecem também serem protegidas por pelo menos um componente da telomerase.

Muitos estudos em telômeros têm sido feitos em cromossomos metafásicos, e o estudo dessas estruturas permitiu aos pesquisadores identificar alterações cromossômicas, como translocações não balanceadas, cromossomos dicêntricos e deleções terminais, associadas a telômeros disfuncionais (Artandi e col., 2000; Gisselsson e col., 2001; Lo e col., 2002; Louis et al., 2005).

No nosso modelo, o estudo dos cromossomos em metáfase de algumas das linhagens mostra um aumento na frequência de extremidades livres de sinais teloméricos (**Figura 14**) ao longo da progressão, juntamente com o aumento de alterações cromossômicas estruturais que, como discutido acima, já foram anteriormente associadas à disfunção telomérica. Além disso, o aumento gradual de alterações associadas aos telômeros vista no nosso modelo parece concordar com a proposta feita por Tussel e colaboradores (2008) de que, nos estágios iniciais da progressão onde a disfunção telomérica é limitada, fusão intracromossômica seria o evento principal e causaria somente ampliações e deleções nos cariótipos das células filhas. Mais tarde, visto que os telômeros encurtam progressivamente a cada ciclo de replicação, a disfunção telomérica afetaria mais terminais cromossômicos, levando a fusões intercromossômicas que, por sua vez, produziriam rearranjos mais complexos.

Tem sido proposto que em câncer rearranjos cromossômicos resultantes de perdas teloméricas resultariam primariamente da extensiva fusão cromossômica que ocorre quando os telômeros se tornam extremamente

curtos ou instáveis durante a crise. Estas fusões ocorreriam através de eventos denominados BFB (breakage/fusion/bridge) (de Lange, 2002).

Ao que tudo indica somente uma célula que tenha deficiência dos *checkpoints* de ciclo celular ou apoptose escaparia da entrada na senescência e participaria de ciclos BFB. Em outras palavras, a ausência da expressão de genes *checkpoints* para ciclo celular e apoptose, como *Rb*, *p53*, *p21* e *p16*, por exemplo, precederia o processo de perda telomérica (Guney & Sedivy, 2006; Herbig & Sedivy, 2006; Bailey & Murnane, 2006).

No nosso modelo, a linhagem 4C3+ parece ter alcançado o estágio de crise. Estas células são caracterizadas por um tamanho muito diminuído de telômero, uma pequena variabilidade intratelomérica e um cariótipo repleto de translocações não balanceadas e deleções terminais. Dados do laboratório mostram que o fenótipo telomérico de crise encontrado nestas células coincide com a perda de expressão de um dos mais importantes *checkpoints* celulares, o gene *p53* (dados não mostrados).

Contudo, o encurtamento telomérico ou *uncapping* e a ativação da telomerase parecem ter tanto um papel supressor tumoral como oncogênico: a instabilidade genômica gerada pelo encurtamento telomérico poderia gerar sinais pró-apoptóticos que levariam a célula em questão à morte, agindo assim como um mecanismo de supressão tumoral. Por sua vez, a ativação da telomerase poderia levar à manutenção da instabilidade genômica, pela estabilização dos telômeros extremamente curtos e diminuição da variação do comprimento, perpetuando cariótipos complexos (Hackett & Greider, 2002).

Instabilidade centromérica

Além de anomalias teloméricas, uma das mais notáveis características deste modelo é a abundância de instabilidade centromérica que se manifesta através de fragmentos e fusões centroméricas (**Figura 12 e Figura 14J**). Esses fragmentos podem conter apenas heterocromatina e não serem capazes de produzir nenhuma anormalidade na célula, no entanto outros fragmentos podem transportar material eucromático, podendo causar instabilidade genética através da expressão dos genes que poderiam estar neles presentes.

Esses fragmentos aumentam durante o modelo de melan-a até 4C3-, quase desaparecendo na linhagem de melanoma 4C3+, onde as fusões Rb estão presentes (**Figura 11B**). A perda desses fragmentos é possivelmente associada à alta taxa de replicação destas células, visto que se tratam de estruturas muito pequenas, que poderiam ser facilmente perdidas durante a replicação de células que já não detêm todos os *checkpoints* de ciclo celular.

Visto que os telômeros são estruturas especializadas responsáveis pela integridade e estabilidade cromossômica, um pré-requisito para a formação de translocações robertsonianas poderia ser tanto a eliminação como a inativação telomérica. É sabido que existem na natureza camundongos de laboratório que possuem translocações Rb em seus cariótipos e, ainda, que a maioria dos fetos humanos naturalmente abortados apresenta esse mesmo tipo de rearranjo. No entanto, tendo em visto que células germinativas apresentam atividade de telomerase, espera-se que o padrão telomérico nestas células seja mantido e não haja encurtamento dessas regiões. Sendo assim, deve haver outro mecanismo pelo qual as translocações Rb são formadas nestes casos.

Sob este contexto Slijepcevic discute em uma revisão publicada em 1998 que existem três mecanismos possíveis de formação de translocações Robertsonianas: encurtamento, eliminação e disfunção telomérica.

Os cromossomos dos camundongos (com exceção do cromossomo Y) são classificados citogeneticamente como acrocêntricos. No entanto, até hoje nenhuma seqüência codificadora de DNA foi encontrada entre os centrômeros e os telômeros do braço curto destes cromossomos, o que os torna telocêntricos. Os telômeros dos braços curtos dos cromossomos de camundongos são menores do que os dos braços longos (Zijlmans e col., 1997) e, já que se espera que a taxa de encurtamento telomérico seja a mesma para todos os terminais cromossomos (4.8Kb por geração), os braços curtos dos cromossomos são mais sensíveis à perda de seqüências teloméricas que os braços longos, levando a maiores taxas de translocações Rb do que fusões terminais envolvendo dois braços longos (revisto em Slijepcevic, 1998). Além disso, o encurtamento telomérico resultante da inativação da telomerase leva a um aumento na freqüência de fusões Robertsonianas em células de camundongos (Blasco e col., 1997).

A disfunção telomérica também parece ter um papel na formação das fusões Rb. Recentes trabalhos do nosso grupo demonstraram que a expressão constitutiva de c-Myc pode mediar a formação de fusões Robertsonianas através do remodelamento centromérico no núcleo interfásico e subsequente promoção de fusões teloméricas em cromossomos de camundongos sem afetar o comprimento telomérico (Guffei e col., 2007).

Em camundongos, a formação de fusões Rb pela eliminação completa dos telômeros dos braços curtos também já foi descrita. Neste caso, eventos de quebra nas seqüências *minor* centroméricas levariam à completa perda dos telômeros dos braços curtos, facilitando a formação de fusões centroméricas (Garagna e col., 1996; Nanda e col., 1995).

Em nosso modelo, as fusões Rb identificadas não apresentaram sinais teloméricos sob ponto de fusão centromérica (**Figura 14K, L**), e todos os fragmentos centroméricos encontrados apresentam sinais teloméricos associados, alguns deles aparecem como mini cromossomos contendo quatro sinais teloméricos nas suas extremidades e, provavelmente, foram produzidos pela fusão de dois fragmentos centroméricos individuais (**Figura 14G, H, I**).

Tendo em vista o que foi discutido acima, um mecanismo similar ao descrito por Garagna e colaboradores e Nanda e colaboradores em 1995 poderia estar acontecendo nas células do nosso modelo. As quebras nas regiões centroméricas poderiam explicar não só a formação das translocações Robertsonianas em nosso modelo, mas também o aumento no número de fragmentos centroméricos (**Figura 12C**) e o concomitante aumento na taxa de extremidades livres de seqüências teloméricas encontradas linhagem 4C3-.

As translocações Robertsonianas em humanos constituem a mais comum das anomalias genéticas estruturais em fetos abortados e recém-nascidos (Kim & Shaffer, 2002; Nielsen & Wohrlet, 1991; Jacobs, 1981). Além disso, estas estruturas foram encontradas em cânceres hematológicos (Welborn, 2004; Qian e col., 2002), em tumores sólidos (Bayani e col., 2003; Padilla-Nash e col., 2001), e em fases iniciais da leucemia mielóide aguda (Shimokawa e col., 2004). A presença de translocações Robertsonianas no nosso modelo correlaciona-se com o fenótipo metastático, visto que a única linhagem celular a apresentar tais estruturas é também a única linhagem do modelo a apresentar tal característica.

A instabilidade cromossômica demonstrada nas diferentes linhagens que compõem o nosso modelo de transformação maligna de melanócitos murinos sugere que a progressão das aberrações cromossômicas e a conseqüente evolução cariotípica é mediada por instabilidade centromérica e telomérica. Este fenótipo parece depender do processo de impedimento de adesão ao substrato e dos insultos genômicos e/ou epigenômicos submetidos à linhagem de melanócitos imortalizados, melan-a, e estes dois tipos de instabilidade parecem ser eventos precoces na progressão maligna de melanócitos murinos.

Referências

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York and London, Garland Science.

Alkan C, Ventura M, Archidiacono N, Rocchi M, Sahinalp SC, Eichler EE (2007). Organization and evolution of primate centromeric DNA from whole-genome shotgun sequence data. *PLoS Comput Biol.* **3**,1807-1818.

Amati BB, Gasser SM (1988). Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* **54**, 967-978.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2007* (2007). Atlanta, American Cancer Society.

Amor DJ, Choo KH (2002). Neocentromeres, role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet.* **71**, 695-714.

Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Choo KH (2004). Building the centromere, from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.* **14**, 359-368.

Armstrong BK, Krickler A (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* **63**, 8-18.

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641-645.

Baerlocher GM, Lansdorp PM (2003). Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* **55**,1-6.

Bailey SM, Murnane JP (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2408-2417.

Bartholdi MF (1991). Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci.* (Pt 2): 255-263.

Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA. Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells (2007). *Cancer Biol.* **17**, 5-18.

Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7-16.

Baylin SB, Ohm JE (2006). Epigenetic gene silencing in cancer- a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **6**, 107-116.

Beheshti B, Karaskova J, Park PC, Squire JA, Beatty BG (2000). Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of

prostate cancer cell lines by sequential giemsa banding and spectral karyotyping. *Mol Diagn.* **5**, 23-32.

Beil M, Dürschmied D, Paschke S, Schreiner B, Nolte U, Bruel A, Irinopoulou T (2002). Spatial distribution patterns of interphase centromeres during retinoic acid-induced differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cytometry* **47**, 217-225.

Beil M, Fleischer F, Paschke S, Schmidt V (2005). Statistical analysis of the three-dimensional structure of centromeric heterochromatin in interphase nuclei. *J Microsc.* **217**, 60-68.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* **39**, 414 – 418.

Bickmore WA, Oghene K (1996). Visualizing the spatial relationships between defined DNA sequences and the axial region of extracted metaphase chromosomes. *Cell* **84**, 95-104.

Bidau CJ, Giménez MD, Palmer CL, Searle JB (2001). The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* **87**,305-313.

Bjerling P, Ekwall K (2002). Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 499-507.

Blackburn EH (1992). Telomerases. *Annu Rev Biochem.* **61**: 113–129.

Blackburn EH (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661–673.

Blackburn EH, Gall JC (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* **120**, 33–53.

Blasco MA (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* **6**,611-622.

Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.

Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO* **14**, 4240-4248.

Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG (2007). Oxidative stress modulates DNA methylation

during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* **9**, 1111-1121.

Caporali A, Wark L, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398-1406.

Casolari JM, Brown CR, Drubin DA, Rando OJ, Silver PA (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev.* **19**, 1188-1198.

Chammas R. Melanoma cutâneo. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 1. São Paulo, SP: ATHENEU, 2004. Cap 22, p. 231-240.

Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW, Lockett SJ (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet.* **36**, 984-988.

Choo KH (1997). Centromere DNA dynamics, latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet.* **61**, 1225-1233.

Choo KH (1998). Why is the centromere so cold? *Genome Res.* **8**, 81-82.

Choo KH (2000). Centromerization. *Trends Cell Biol.* **10**, 182-188.

Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2004). The threedimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* **3**, 2 – 12.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M (1984). A study of tumor progression, the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* **15**, 1147-1165.

Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, and Jasiulionis MG (2005). Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer* **114**, 356-363.

Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, and Cerutti JM (2002). TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 65-68.

Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK, Chiorazzi N (2004). Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* **103**, 375-382.

- Darai E, Kost-Alimova M, Kiss H, Kansoul H, Klein G, Imreh S (2005). Evolutionarily plastic regions at human 3p21.3 coincide with tumor breakpoints identified by the "elimination test". *Genomics* **86**, 1-12.
- de Lange T (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540.
- de Lange T (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110.
- der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londoño-Vallejo JA (2004). The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **23**, 1221-1228.
- Esteller M, Capellà G, Ribas M, Peinado MA. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* **66**, 8462-8468.
- Evans, E.P.: Standard normal chromosomes, pp. 1446-1449. In: *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Lyon, M.F., Rastan, S., and Brown, S.D.M. (eds.), Third Edition, Volume 2, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- Fleisig HB, Wong JM (2007). Telomerase as a clinical target: current strategies and potential applications. *Exp Gerontol.* **42**, 102-112.
- Flores I, Benetti R, Blasco M (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol.* **18**, 254-260.
- Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO* **4**, 575 – 580.
- Gaggioli C, Sahai E (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* **20**, 161-172.
- Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, Kelly ZD, Nolan IM, Fox EJ, Culhane AC, McArdle L, Fraga MF, Hughes L, Currid C A, O'Mahony F, Byrne A, Murphy AA, Moss C, McDonnell S, Stallings RL, Plumb JA, Esteller M, Brown R, Dervan PA, Easty DJ (2005). Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation, insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* **26**, 1856-1867.
- Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci.* **114**, 4429 – 4434.
- Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* **36**, 94-99.

Gardner RJM and Sutherland GR (2004). Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling Oxford University Press, Cary, North Carolina, U.S.A., 2004.

Gazave E, Catalan J, Ramalhinho Mda G, Mathias Mda L, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, Auffray JC (2003). The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* **81**, 33-42.

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* **340**,1341-8.

Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, Strömbeck B, Dal Cin P, Höglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,12683-12688.

Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* **8**, 416-424.

Greaves IK, Rangasamy D, Ridgway P, Tremethick DJ (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 525-530.

Greider CW (1996). Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* **65**, 337–365.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-14.

Guerry D 4th, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D (1993). Lessons from tumor progression, the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* **100**, 342S-345S.

Guffei A, Lichtensztejn Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, and Mai S (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**, 578-588.

Gulmann C, Lantuejoul S, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E (2005). Telomerase activity in proximal and distal gastric neoplastic and preneoplastic lesions using immunohistochemical detection of hTERT. *Dig Liver Dis.* **37**, 439-445.

Guney I, Sedivy JM (2006). Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle* **5**, 2319-2323.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M (2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **18**,150-159.

Hackett JA, Greider CW (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 619-626.

Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Méhes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet.* **36**, 1159-1161.

Hathcock KS, Kaech SM, Ahmed R, Hodes RJ (2003). Induction of telomerase activity and maintenance of telomere length in virus-specific effector and memory CD8+ T cells. *J Immunol.* **170**,147-152.

Hede, K (2005). Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. *J Natl Cancer Inst.* **97**, 87-89.

Herbig U, Sedivy JM (2006). Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev.* **127**, 16-24.

Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, Michel L, Mittal V, Gerald W, Benzera R, Lowe SW, Cordon-Cardo C (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* **430**, 797-802.

Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Säll T, Mitelman F, Horsman D (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* **108**, 57-65.

Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* **44**, 235-246.

Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. 2004. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr. Biol.* **14**, 1621–31.

Houghton NA, Polsky D (2002). Focus on melanoma. *Cancer Cell* **2**,275-278.

Howell PM Jr, Liu S, Ren S, Behlen C, Fodstad O, Riker AI (2009). Epigenetics in human melanoma. *Cancer Control.* **16**, 200-218.

Hsu MY, Meier F, Herlyn M (2002). Melanoma development and progression, a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**,522-536.

Hug N, Lingner J (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma* **115**, 413-425.

Hultdin M, Rosenquist R, Thunberg U, Tobin G, Norrback KF, Johnson A, Sundström C, Roos G (2003). Association between telomere length and V(H) gene mutation status in chronic lymphocytic leukaemia: clinical and biological implications. *Br J Cancer.* **88**,593-598.

- Hussein MR (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol.* **57**, 797-801.
- Hussein MR, Sun M, Roggero E, Sudilovsky EC, Tuthill RJ, Wood GS, Sudilovsky O (2002). Loss of heterozygosity, microsatellite instability, and mismatch repair protein alterations in the radial growth phase of cutaneous malignant melanomas. *Mol Carcinog.* **34**, 35-44.
- Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet.* **33**, 44-54.
- Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005). Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* **161**, 159-163.
- Johnson JP (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 345-357.
- Joshua AM, Evans A, Van der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, Squire JA (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim Biophys Acta.* **1785**, 156-181.
- Kalitsis P, Griffiths B, and Choo AKH (2006). Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8786– 8791.
- Kastan MB, Bartek J(2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
- Katakura Y (2006). Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**, 1076-1081.
- Khalil, A. et al (2007). Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Res.* **15**, 899-916.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat.Genet.* **23**, 405–12
- Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, Misteli T (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res.* **105**, 292-301.
- Kim SR, Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test.* **6**, 163-168.
- Kolodner RD (1995). Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* **20**, 397-401.

Komarova NL, Lengauer C, Volgestein B, Nowak MA (2002). Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* **1**, 685-692.

Kraemer KH, Greene MH (1985). Dysplastic nevus syndrome. Familial and sporadic precursors of cutaneous melanoma. *Dermatol Clin.* **3**, 225-237.

Kuttler F and Mai S (2006). c-Myc, genomic instability and disease. In Vol 1: Genome dynamics. *Genome and Disease*. J-N Volff (Ed). Karger Publishers, Wuerzburg, Germany, pp. 171-191.

Lancelin F, Anidjar M, Villette JM, Soliman A, Teillac P, Le Duc A, Fiet J, Cussenot O (2000). Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *BJU Int.* **85**, 526-531.

Lancôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* **8**, 104-115.

Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* **11**, 2074-2082.

Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-7.

Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE, Leachman AS, Dirk Noyes R, Wittwer CT, Perreard L, Bernard OS (2005). Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Cancer* **104**, 1678-1686.

Li B, de Lange T. 2003. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol. Biol. Cell* **14**, 5060–5068.

Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* **20**, 8125-8135.

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* **2**, 169-174.

Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, et al. 2004. PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat. Cell Biol.* **6**, 673–680.

Lo AW, Sabatier L, Fouladi B, Pottier G, Ricoul M, Murnane JP. DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line (2002). *Neoplasia* 4, 531-538.

Loeb LA (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* **61**, 3230-3209.

Londoño-Vallejo JA (2004). Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett.* **212**,135-144.

Louis, S.F., Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Guffei, A., Lichtensztein, Z., Kuttler, F., Chuang, T.C., Moshir, S., Mougey, V., Chuang, A.Y., Kerr, P.D., Fest, T., Boukamp, P. and Mai, S. (2005) c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9613-9618.

Madame Curie Bioscience Database, 2009 (NCBI) [Electronic Book] www.landesbioscience.com/curie/

Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire (Eds). Oxford University Press,Oxford. pp. 55 – 67.

Mai S, and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327-1331.

Mancianti ML, Györfi T, Shih IM, Valyi-Nagy I, Levensgood G, Menssen HD, Halpern AC, Elder DE, Herlyn M (1993). Growth regulation of cultured human nevus cells. *J Invest Dermatol.* **100**, 281S- 287S.

Mann MB, Hodges CA, Barnes E, Vogel H, Hassold TJ, Luo G (2005). Defective sister-chromatid cohesion, aneuploidy and cancer predisposition in a mouse model of type II Rothmund-Thomson syndrome. *Hum Mol Genet.* **14**, 813-825.

McClintock B (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234-282.

McCormack SJ, Weaver Z, Deming S, Natarajan G, Torri J, Johnson MD, Liyanage M, Ried T, Dickson RB (1998). Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16**, 2755-2766.

McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M (2002). Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* **1**, 459-465.

Meaburn, K.J.; Misteli, T.; Soutoglou, E (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol.* **17**, 80-90.

-
- Medic S, Pearce RL, Heenan PJ, Ziman M (2007). Molecular markers of circulating melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **20**, 80-91.
- Meeker AK, Argani P (2004). Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 285-296.
- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* **10**, 3317-3326.
- Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, De Marzo AM (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* **62**, 6405-6409.
- Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu MY, Schittek B, Garbe C, Herlyn M (1998). Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci.* **3**, D1005-D1010.
- Merico V, Pigozzi MI, Esposito A, Merani MS, Garagna S (2003). Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet Genome Res.* **103**, 321-329.
- Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA (2005). Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol.* **15**, 484-493.
- Miller AJ, Mihm MC Jr (2006). Melanoma. *N Engl J Med.* **355**, 51–65.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* **15**, 417-474.
- Mitelman, F (2000). Recurrent chromosome aberration in cancer. *Mutat Res* **462**, 247-253.
- Modrich P (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* **272**, 24727-24730.
- Monaghan P, Haussmann MF (2006). Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol Evol.* **21**, 47-53.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55 – 63.
- Mufson RA, Fisher PB, and Weinstein IB (1979). Effect of phorbol ester tumor promoters on the expression of melanogenesis in B-16 melanoma cells. *Cancer Res.* **39**, 3915-3919.

- Murata S, Nakazawa T, Ohno N, Terada N, Iwashina M, Mochizuki K, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Ohno S, Katoh R. (2007). Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. *Thyroid* **17**, 489-496.
- Murnane JP (2006). Telomeres and Chromosome instability. *DNA Repair (Amst)* **5**,1082-1092.
- Nachman MW and Searle JB. (1995) Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* 10: 397-402.
- Nanda I, Schneider-Rasp S, Winking H, Schmid M (1995). Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Res.* **3**,399-409.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004-3016.
- Neumann AA, Reddel RR (2002). Telomerase maintenance and cancer – look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* **2**, 879-884.
- Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* **87**, 81-83.
- Nowell PC (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* **46**, 2203-2207.
- Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, and Jasiulionis MG (2006). Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* **8**, 231-241.
- Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schröck E, Hilgenfeld E, Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 349-363.
- Palm W, de Lange T (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* **42**, 301-334.
- Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G, Lissia A, Tanda F, Castello G (2003). Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res.* **13**, 167-170.
- Parris CN, Jezzard S, Silver A, MacKie R, McGregor JM, Newbold RF (1999). Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer* **79**, 47-53.

Pedram M, Sprung CN, Gao Q, Lo AW, Reynolds GE, Murnane JP (2006). Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol Cell Biol.* **26**, 1865-1878.

Petrova NV, Yakutenko II, Alexeevski AV, Verbovoy VA, Razin SV, Iarovaia OV (2007). Changes in chromosome positioning may contribute to the development. *J Cell Physiol.* **213**, 278-283.

Pidoux AL, Allshire RC (2000). Centromeres, getting a grip of chromosomes. *Curr Opin Cell Biol.* **12**, 308-319.

Pidoux AL, Allshire RC (2005). The role of heterochromatin in centromere function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**, 569-579.

Potter M, Marcu KB (1997). The c-myc story: where we've been, where we seem to be going. *Curr Top Microbiol Immunol.* **224**, 11-17.

Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* **132**, 79-80.

Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 695-701.

Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausson KA, and Soria JC (2008). Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol.* **66**, 99-117.

Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Rothhammer T, Bosserhoff AK (2007). Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* **20**, 92-111.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Sarkar R, Guffei A, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Alterations of centromere positions in nuclei of immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry A.* **71**, 386-392.

Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O (2000). A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* **88**, 440-453.

Sawyer JR, Swanson CM, Koller MA, North PE, Ross SW (1995). Centromeric instability of chromosome 1 resulting in multibranching chromosomes, telomeric fusions, and "jumping translocations" of 1q in a human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* **76**, 1238-1244.

Schaefer LH, Schuster D, Herz, H (2001) Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Microsc.* **204**, 99-107.

Schulten HJ, Gunawan B, Otto F, Hassmann R, Hallermann C, Noebel A, Füzési L (2002). Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet Cytogenet.* **133**, 134-141.

Seabright MA (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**, Y971-Y972.

Shaw CJ, Lupski JR (2004). Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* **13** Spec No 1:R57-64.

Shay JW, Bachetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**, 787-791.

Shay JW, Wright WE (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**,867-874.

Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, Takeyama H (2004). Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med.* **43**, 508-11.

Smalley KS, Brafford P, Haass NK, Brandner JM, Brown E, Herlyn M (2005). Upregulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *Am J Pathol.* **166**,1541-1554.

Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1659–68.

Stewart SA, Weinberg RA (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**, 531-557.

Thomas NE (2006). BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* **16**, 97-103.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* **351**, 998–1012.

Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M (2000). DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet.* **89**, 121-128.

Ueda Y, Okano M, Williams C, Chen T, Georgopoulos K, Li E (2006). Roles for Dnmt3b in mammalian development, a mouse model for the ICF syndrome. *Development* **133**,1183-1192.

van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH,

- Maitra A(2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* **161**,1541-1547.
- van Steensel B, de Lange T (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**, 740–743.
- Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC, Chuang AY, Wark L, Young IT (2005) Characterizing the Three-Dimensional Organization of Telomeres. *Cytometry A.* **67**, 144-150.
- Vig BK, Sternes KL, Paweletz N (1989).Centromere structure and function in neoplasia.*Cancer Genet Cytogenet.* **43**,151-178.
- Villa A, Navarro-Galve B, Bueno C, Franco S, Blasco MA, Martinez-Serrano A (2004). Long-term molecular and cellular stability of human neural stem cell lines. *Exp Cell Res.* **294**,559-570.
- Villasante A, Abad JP, Méndez-Lago M (2007). Centromeres were derived from telomeres during the evolution of the eukaryotic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10542-10547.
- Vukovic B, Beheshti B, Park PC, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA (2007).Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotypic evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* **116**, 1-11.
- Wagner, RP; Maguire, MP; Stallings, RL. Chromosome Organization. In: Wagner, RP; Maguire, MP; Stallings, RL. *Chromosomes: a synthesis.* 2. Wiley-Liss, New York.pp.66-111.
- Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* **12**, 1769-1774.
- Wascher RA, Morton DL, Kuo C, Elashoff RM, Wang HJ, Gerami M, Hoon DS (2003). Molecular tumor markers in the blood, early prediction of disease outcome in melanoma patients treated with a melanoma vaccine. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2558–2563.
- Weaver, B.A.A.; Cleveland, D.W (2007). Aneuploidy: Instigator and Inhibitor of Tumorigenesis. *Cancer Res.* **67**, 10103-10105.
- Weimer R, Haaf T, Krüger J, Poot M, Schmid M (1992). Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0, G1, S, G2, G1, and early S' phase in human lymphocytes. *Hum Genet.* **88**, 673-682.
- Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **151**,14-35.
- Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA (2005). Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* **118**(Pt 17):3861-8.

Xu L, Blackburn EH (2007). Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Mol Cell*. **28**, 315-327.

Yue Y, Grossmann B, Ferguson-Smith M, Yang F, Haaf T (2005). Comparative cytogenetics of human chromosome 3q21.3 reveals a hot spot for ectopic recombination in hominoid evolution. *Genomics* **85**, 36-47.

Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3723-3728.

Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA, Berman AE, Giordano TJ, Prochownik EV, Soengas MS, Nikiforov MA (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **7**, 6623-6634.

Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7423-7428.

Abstract

Aneuploidy and chromosomal instability are hallmarks of most solid tumors. These alterations may result from inaccurate chromosomal segregation during mitosis, which can occur through several mechanisms including defective telomere metabolism, centrosome amplification, dysfunctional centromeres and/or defective spindle checkpoint control. In this work, we used an *in vitro* murine melanoma model that utilizes the cell adhesion blockade as a transforming factor to characterize telomeric and centromeric alterations that accompany melanocyte malignant transformation. To study the timing of the occurrence of telomere shortening during the transformation model, we analyzed the profile of telomere length by Q-FISH and found that telomere length significantly decreased as additional rounds of cell adhesion blockages were performed. Together with it, increase in telomere free ends and karyotype complexity were also found, which includes Robertsonian fusions in 100% of metaphases of the metastatic melanoma cells. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation and that telomere abnormalities result in telomere aggregation, breakage-bridge-fusion cycles and chromosomal instability. Another remarkable feature of this model is the abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Taken together, our results illustrate for this melanoma model chromosomal instability with a structural signature of centromere breakage and telomeric loss.

Anexos

Telomere-centromere-driven genomic instability contributes to karyotype evolution in a mouse model of melanoma.

Amanda Gonçalves dos Santos Silva^{1,2}, Herbert Alexander Graves¹, Amanda Guffei¹, Tatiana Iervolino Ricca², Renato Arruda Mortara³, Miriam Galvonas Jasiulionis^{2, 4*} and Sabine Mai^{1*}

¹Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, CancerCare Manitoba, Winnipeg, MB, Canada; ²Department of Immunology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil; ³Department of Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil; ⁴Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil.

Running title: Telomere-centromere-driven genomic instability

Keywords: Telomere, centromere, genomic instability, carcinogenesis, melanoma.

Corresponding authors:

Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermot Avenue, Winnipeg MB R3E 0V9 CANADA, phone: 204-787-2135; FAX: 204-787-2190; e-mail: smai@cc.umanitoba.ca

Miriam Galvonas Jasiulionis, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, BRAZIL, phone: 11-5549-6073; FAX: 11-5572-3328; e-mail: mjasiulionis@unifesp.br

Requests for reprints: Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermot Avenue, Winnipeg, MB, Canada R3E 0V9.
E-mail: smai@cc.umanitoba.ca

Abstract

Aneuploidy and chromosomal instability are hallmarks of most solid tumors. These alterations may result from inaccurate chromosomal segregation during mitosis, which can occur through several mechanisms including defective telomere metabolism, centrosome amplification, dysfunctional centromeres and/or defective spindle checkpoint control (Bayani et al, Semin Cancer Biol., 2007). In this work, we used an *in vitro* murine melanoma model that utilizes a cellular adhesion blockade as a transforming factor to characterize telomeric and centromeric alterations that accompany melanocyte transformation. To study the timing of the occurrence of telomere shortening during the transformation model, we analyzed the profile of telomere length by Q-FISH and found that telomere length significantly decreased as additional rounds of cell adhesion blockages were performed. Together with it, increase in telomere free ends and karyotype complexity were also found, which includes Robertsonian fusions in 100% of metaphases of the metastatic melanoma cells. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation and that telomere abnormalities results in telomere aggregation, breakage-bridge-fusion cycles and chromosomal instability (Raynaud et al, Crit Rev Oncol Hematol., 2008). Another remarkable feature of this model is the abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Taken together, our results illustrate for this melanoma model chromosomal instability with a structural signature of centromere breakage and telomeric loss.

Abbreviations: CIN, chromosomal instability; BBF, breakage – bridge – fusion; FISH, fluorescence in situ hybridization; MIN, microsatellite instability; Rb, Robertsonian; SKY, spectral karyotyping.

Introduction

Melanoma is the most severe form of skin cancer. It is the sixth most common cancer in the United States and the most common fatal malignancy among young adults [1]. The incidence of cutaneous malignant melanomas is growing faster than any other cancer in the world. It is estimated that 68,720 people will be diagnosed with and 8,650 will die of melanoma in 2009 [2]. By 2010, current estimates indicate that one of every 50 people will be diagnosed with melanoma during their lifetime [3].

The progression of a transformed melanocyte to a malignant melanoma is a multistep process where the gradual acquisition of genetics and epigenetics alterations can generate loss of tumor suppressor genes, microsatellite instability, alterations of the mismatch repair pathway and chromosomal instability [4]. Malignant melanomas display both types of instability found in cancer, microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) [4,5]. MIN has been found at low levels in cutaneous melanoma [6-8], while CIN has been found in almost all cases analyzed by different cytogenetic methods [7,9,10].

Aneuploidy and chromosomal instability are hallmarks of most solid tumors [5,11-14]. These alterations may result from inaccurate chromosomal segregation during mitosis, which can occur through several mechanisms including defective telomere metabolism, centrosome amplification, dysfunctional centromeres and/or defective spindle checkpoint control [15,16].

The centromere is a unique and functional chromosomal domain responsible for the accurate segregation of chromosomes during cell division [17,18]. Insults to the centromeres may impact on the assembly of the kinetochore, leading to improper sister-chromatid segregation and chromosomal instability. Functional centromeres are therefore essential in maintenance of genetic stability. Pericentromeric regions are often hotspots for both recombination events during evolution [19] and in cancer [20,21].

There are several examples where defects in centromere function are associated with aneuploidy causing birth defects or with cancer. Pericentric inversions in humans are often associated with decreased male fertility [22-24], cancer [25-27], mental retardation [28,29] and other diseases.

Centromeres are dynamic structures that permit evolutionary remodeling of chromosomes, and this in turn facilitates speciation. The centromeres are also substrates for rearrangements that are associated with structural genetic abnormalities in cancer where, in the same fashion as evolution, selection occurs at the cellular level in an accelerated fashion (for review, see Gonçalves dos Santos Silva et al [30]).

Telomeres are nucleoprotein structures consisting of tandem repeats of short G-rich sequences that cap the ends of chromosomes, preventing them from being illegitimately recognized as DNA damage. Despite the high efficiency of the DNA replication machinery, telomeric DNA is not fully replicated; about 50–200 base pairs are lost every time a somatic human cell divides [31]. When replication continues until a critical length of telomeres is reached, it is possible that telomeres lose their protective functions, allowing for chromosomal fusions and “breakage-

fusion-bridge" (BFB) cycles [32,33] that contribute to chromosomal instability. Alternatively, it has been shown that dysfunction of the telomere capping proteins can lead to the uncapping of normal length telomeres. Uncapping of telomeres results in telomere aggregation, BFB cycles and CIN [34,35].

The global transcription factor and oncogene, c-Myc, has been shown to induce chromosomal rearrangements and telomeric aggregates through telomere remodeling in the interphase nucleus of cancer cells [35,36]. It has been suggested that c-Myc deregulation results in aberrant regulation of telomere capping proteins [34]. Additionally it has been implicated in mediating Robertsonian translocations in mouse cells through telomere fusions [37]. Deregulation of c-Myc may be a central contributing factor in genomic instability resulting from our model of anchorage blockage in melanocytes.

In this work, we used a murine model of melanoma, established by submitting a non-tumorigenic murine melanocyte lineage, melan-a [38], to sequential substrate adhesion impediment cycles. This process resulted not only in the establishment of non-tumorigenic melan-a sublines, but also different melanoma cell lines. 2C and 4C are non-tumorigenic melan-a sublines which could correspond to intermediate phases of tumor progression. 4C3- and 4C3+ are melanoma cell lines presenting an *in vitro* and *in vivo* slow and fast growing rate, respectively [39,40].

As previously reported, altered morphology was observed in all melan-a-derived cell lines, which demonstrated stable phenotypic characteristics and melanin production [39]. Although melan-a cells require phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) as a growth factor [38], all these lineages showed PMA-independent growth, as described for human melanoma cell lines [41]. Furthermore, all lineages obtained after five de-adhesion cycles were able to grow as tumors when injected subcutaneously in syngeneic mice, with different latency times for tumor appearance [39,40].

The melanocytic system encompasses a full range of lesion steps from benign naevi to metastatic malignancy [42], making melanoma an ideal model for studying the carcinogenic process, but until now, the majority of experimental models of tumorigenesis utilize chemical or environmental carcinogens and genetic manipulations to study the progression of this disease (for reviews, see Foijer [43] and Wu [44]). Here, we used an *in vitro* murine model [39] that utilizes a substrate adhesion blockade as a transforming factor to characterize alterations that accompany melanocyte transformation. We demonstrate that telomere length alterations, defects in centromere stability and karyotype evolution accompany melanocyte transformation.

Materials and Methods

Cells and Cell Culture Conditions

The nontumorigenic murine melanocyte lineage, melan-a was grown in RPMI (pH 6.9; Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 200 nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (PMA; Tocris, Ellisville, MO) at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. All the

other cell lines (2C, 4C, 4C3-, 4C3+) derived from melan-a cells after sequential cycles of substrate adhesion impediment were cultured in the same conditions, without PMA. Cells were maintained at a density of around 10^5 to 10^6 cells/ml.

Cell Fixation and Chromosome Preparations

Cells were directly harvested from cell culture. They were spun down at 800rpm for 10 minutes and for chromosome preparation they were resuspended in 5 ml of 0.075 M KCl for 30 minutes at room temperature. For chromosome fixation, the drop fixation method [45] was used. For the fixation of 3D interphase nuclei, all cells were cultured on glass slides until subconfluence and 3D fixed using 3.7% formaldehyde/phosphate-buffered saline for 15 minutes at room temperature.

Immunofluorescence (IF)

Different cell lines were cultured on glass coverslips (Glasst cnica, São Paulo, Brazil) until subconfluence and fixed in 1% paraformaldehyde in PBS. Fluorescent detection of c-Myc protein was performed as described in Garagna et al [46] by using a polyclonal anti-c-Myc antibody (N262; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and a goat anti-rabbit IgG FITC antibody, at a 1:100 and 1:1000 dilution respectively. Analysis was performed by using a Bio-Rad 1024 UV confocal system attached to a Zeiss Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada), with a 63x/1.4 oil objective lens.

Quantitative Fluorescence in Situ Hybridization (Q-FISH)

On slides with 3D interphase nuclei fixed, telomere FISH protocol was performed as described above by using Cy3-labeled peptide nucleic acid (PNA) probes (DAKO, Glostrup, Denmark). At least 30 nuclei were analyzed for each cell line. AXIOVISION 4.6 (Carl Zeiss, Inc. Canada) with deconvolution module was used. For every fluorochrome, the 3D image consists of a stack of 50 images with a sampling distance of 200 nm along the z and 107 nm in the xy direction. 3D Image acquisition was performed on at least 30 nuclei per cell line using an AxioImager Z1 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada). The constrained iterative algorithm option was used [47]. Note that telomeric signals at a distance of ≤ 200 nm will be detected as one signal [48]. Telomere measurements were done with TELOVIEWTM version 2.3 [49].

Dual-color FISH with PNA telomeric and centromeric probe

PNA-FISH was performed on two-dimensional (2D) metaphase samples derived from different cell lines (T38Ha fibroblast, melan-a, 4C3- and 4C3+). A PNA human centromeric probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was custom-made to the sequences listed below. The PNA centromere probe sequences used in this study are as follows:

Sequence 1: (N-terminus)Flu-OEE-ATTCGTTGGAAACGGGA- EE(C-terminus)

Sequence 2: (N-terminus)Flu-OEE-CACAAAGAAGTTTCTGAG- EE(C-terminus)

Sequence 3: (N-terminus)Flu-OEE-CAGACAGAAGCATTCTCA- EE(C-terminus)

Sequence 4: (N-terminus)Flu-OEE-TGCATTCAACTCACAGAG- EE(C-terminus).

This probe cocktail hybridized to all mouse centromeres [17]. A Cy3-labelled PNA telomeric probe was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). The PNA human centromeric probe was denatured at 80°C for 5 minutes and then added to slides in conjunction with the PNA telomeric probe. The slides were denatured at 80°C for 3 minutes, subsequently hybridized for 2 hours at 30°C using the Hybrite™ system (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), and then washed in 70% formamide/2xSSC. DAPI (0.1 µg/ml) was applied, and, finally, one drop of Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) was added. All slides were imaged right away to avoid changes in imaging conditions. 3D Image acquisition was performed on 20 metaphase per cell line using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63z/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada).

FISH with mouse pan centromeric probe

FISH experiments were carried out as described by Mai & Wiener [45]. Metaphase chromosomes were hybridized with a mouse pan-centromeric probe conjugated with FITC from Cambio (Dry Drayton, Cambridge, UK). Images were captured on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada).

Spectral Karyotyping (SKY) Analysis

SKY was performed using the ASI (Applied Spectral Imaging, Vista, CA, USA) kit for mice in accordance with the supplier's hybridization protocols. We used the Spectra Cube (ASI) on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63x/1.4 oil objective and the Case Data Manager 4.0 software (ASI) for PC to perform analyses. A minimum of 20 metaphases were examined for each cell line.

Proliferation Rates Index - MTT assay

For measurements of cell viability, 2.5×10^3 cells/100 µl medium were plated into each well of 96-well plates. After 24, 48, 72 or 96 h incubation, 10 µl MTT solution (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was added into each well, and plates were incubated for 4 h at 37°C, and 450 nm UV absorbance of each sample was measured in a microplate reader. The assay was done in triplicate wells and p values of <0.05 were considered significant.

Tumorigenicity Assay

Cells were harvested after trypsin treatment of subconfluent monolayers, counted, and then suspended in PBS. Melan-a cells and their derived clones (1×10^6 cells) were injected subcutaneously in the flank of syngeneic 6- to 8-week-old C57Bl/6 female mice and determined as follows: $[\text{maximum diameter} \times (\text{minimum diameter})^2]/2$. Animals were kept under 12-hour daylight cycles, without food or water restriction, and checked daily for tumor development. Each experimental group consisted of at least five animals (CEP 0738.07). The p value for the overall study was <0.001.

Experimental Metastasis Assay

Female 7-week-old C57Bl/6 mice were inoculated intravenously with 2×10^5 cells. Lungs were harvested 20, 40, 60 and 80 days later and metastatic foci in the lungs identified. The experimental groups consisted of fifteen animals for the 4C3- cell line and seven for the 4C3+ cell line.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

Telomerase activity of cell lysates was analyzed by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay with a TRAPEze® Telomerase Detection Kit – S7700 – Chemicon (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each reaction was carried out by using 0.05 µg of extract. PCR products were electrophoresed in a 12,5% acrylamide gel (0.5×TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer using the protean II xi gel system (Biorad, Hercules, CA, USA). Gels were silver stained according to the protocol described elsewhere [50]. Images were capture by using FinePix S9000 digital camera (Fujifilm, Minato, Tokio, Japan).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The total RNA was isolated from cells with TRizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). One microgram of RNA was reverse-transcribed to cDNA with Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The resulting single-strand cDNAs were amplified by PCR in a reaction mixture containing 75 mM Tris-HCl pH9.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.4 µM of each primer, 1 unit of BioTools DNA Polymerase - Recombinant from *Thermus thermophilus* (BioTools, Madrid, Spain). The thermal cycling conditions were as follows: initial 5 minutes at 94°C, followed by cycles (30 for Tert and 20 for beta-actin amplifications) of 94°C for 45 seconds, 65°C for 45 seconds and 72°C for 60 seconds. The beta-actin mRNA was used as control. PCR fragment amplification was confirmed by 1% agarose gel. The PCR primers were as follow: Tert Forward 5'CATGGGTGCCAAGTCCTGCTC3'; Tert Reverse 5'CTGTGCAGGCGGAGCAAATCC3'; Actin Forward 5'CGAGGCCAGAGCAAG AGAG3'; Actin Reverse 5'AGGAAGAGGATGCGGCAGTGG 3'.

Statistical Analysis

A Student's test with two tails was used to calculate the statistical significance of the observed differences in telomere length. To calculate the differences in c-Myc and Tert expression the bands intensity were quantified using ImageJ 1.38 software (Image Processing and Analysis in JAVA, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and *p* values were determined by One-way analysis of variance (ANOVA). To calculate the statistical significance of the proliferation index and tumorigenesis assay, one-way ANOVA was used with Tukey's post test. For the comparison of survival curves, Logrank test was performed. For chromosome rearrangements and changes in ploidy we used nonparametric Kruskal-Wallis with Dunn's post test. GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com, was used for the all calculations.

Results

Characterization of the model

To better evaluate the behavior of the cells lines studied we performed the MTT assay to analyze the proliferation rates of the cells. Apart from 4C3- and 4C3+, none of the cells showed significant differences in their proliferative ability. A significant difference in proliferation was observed between the two tumorigenic cell lines ($p < 0.05$), but in all other cases the differences in proliferation with respect to the metastatic melanoma cell line (4C3+) were the greatest ($P < 0.0001$) (Figure 1A). Since there were differences in the cell proliferation *in vitro*, we decided to evaluate their behavior *in vivo*. All cell lines were injected subcutaneously in syngeneic mice and tumor measurements were made daily. As predicted and previously described, melan-a, 2C and 4C did not cause tumor formation [39,40] whereas the injection of 4C3- cells led to tumor formation with slow growth when compared to tumors produced by the inoculation of 4C3+ cells (Fig 1B). The latency time for tumor development after inoculation of the 4C3- cell line was almost twice the time of 4C3+ being 25 and 14 days respectively. The survival curves showed that mice injected with the 4C3+ cell line started to die at day 20 with their average lifespan of 24 days compared to 46 days for the average lifespan of the 4C3- cell line injections (Figure 1C). Based on this data, 4C3+ showed *in vivo* characteristics of an aggressive phenotype, whereas 4C3- was considered indolent melanoma lineage.

Next we decided to determine the metastatic capacity of those cells. 2×10^5 cells were inoculated intravenously and lungs were harvested 20, 40, 60 and 80 days later to check for metastatic foci in the lungs. After just 20 days every animal that was inoculated with 4C3+ cell lines had several metastatic foci (indicated in the figure 1D by the white arrows) in their lungs (Figure 1D). Conversely, metastatic foci were not found in the lungs of animals that were inoculated with 4C3- cell line even after 80 days after injection (Figure 1E, F and G).

Telomere shortening in the presence of *TERT* expression and telomerase activity.

To analyze the telomere length on our model we performed quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) on 3D fixed interphase nuclei with a Cy3 telomeric PNA probe. To this end thirty nuclei were analyzed per cell line. The analysis of telomere length showed a progressive shortening of telomere through the melanoma genesis model represented by the column scatter graph on the Figure 2A. The immortalized cell line, melan-a, and the non-tumorigenic cell line (2C, 4C) showed a highly heterogeneous range of telomeres sizes in comparison with the tumorigenic ones (4C3- and 4C3+), where the range and the absolute sizes of telomeric signals were smaller. In comparison to the parental cell (melan-a) the variation in telomere length was very significant for 2C ($P < 0.0005$), significant for 4C ($P < 0.009$) and highly significant for 4C3- and 4C3+ ($P < 0.0001$). In all cases the differences in telomere length with respect to the metastatic melanoma cell line (4C3+) were highly significant ($P < 0.0001$).

The difference found in telomere length prompted us to analyze the telomerase activity in the model. All cell lines were positive for telomerase activity

as measured by the TRAP assay (Figure 2B). Because of the poor resolution of the TRAP assay no measurements were made to quantify telomerase activity for those cells. Since the Tert subunit seems to be the main rate-limiting determinant of telomerase and it has been suggested to be an indicator of its activity, we opted to analyze the expression of this gene by RT-PCR. Tert was then quantified for all cell lines involved on this study and no statistical difference among the cells was found (Figure 2C).

Loss of telomere-specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH) signal or “telomere-free end analysis” was examined using the telomere probe in metaphase spreads of primary cultures of mouse T38Ha fibroblasts (used as a normal control – data not shown), melan-a (data not shown) and on the non-metastatic and metastatic melanoma cell lines (4C3- and 4C3+ respectively) (Figure 3).

All cell lines but the normal control displayed marked loss of telomere-specific signals, when compared to the control ($p < 0.0001$). The highest number of signal free ends was observed in 4C3+ where more than 30% of the ends had no distinguishable telomere signal ($p < 0.001$). While melan-a showed telomere free ends on 9% of potential telomere signals ($p < 0.05$), the non-metastatic cell line 4C3-, showed telomere free ends on 15% ($p < 0.001$). All together, these results indicate an ongoing telomeric instability in this model.

C-Myc is disrupted in the melanoma model

Previous work from our group has shown that c-Myc induces chromosomal rearrangements and telomeric aggregates through telomere remodeling in the interphase nucleus of cells [34-36], and also has suggested that the mode of action results for aberrant regulation of telomere capping proteins [34]. Furthermore, we suggested that c-Myc mediates Robertsonian translocations in mouse cells through telomere fusions [37]. Constitutive expression of c-Myc due to chromosomal translocations, mutation, or amplification contributes to the development and progression of many cancers [51,52]. Indeed, up to 70% of human cancers show deregulated expression of c-Myc, placing the c-Myc gene among the most important human proto-oncogenes [53]. Analyses by immunofluorescence showed nuclei staining for all non-synchronized cell lines studied implying deregulation of this gene (Figure 4) as it is not present throughout the cell cycle of normal cells [53].

Centromere instability and fragmentation

In our work centromeric fragments were first observed by the dual-color FISH (Figure 3A) and by inverted DAPI during the SKY analysis (Figure 5). In order to confirm these observations, a more specific mouse centromeric probe was then hybridized against the same slides used for SKY. The centromere hybridization matched the structures previously identified by the inverted DAPI. The number of centromere fragments increases from melan-a to 4C3-, becoming negligible in 4C3+ ($p < 0.0001$) (Figure 6).

Some of the centromere fragments appeared like mini chromosomes containing four telomeric signals (Figure 3B). In addition, a specific Rb translocation was noted, indicating centromere instability (Figure 3D). The Rb

chromosomes identified in the 4C3+ cell line are present in a non-random manner where chromosome 8 and 12 are exclusively involved (Table 1).

Karyotype evolution

The types and frequencies of spontaneous chromosomal aberrations were examined using SKY (Table 2). An increase in number of individual chromosomes was seen in all stages of the model and is shown in Table 3. The total number of centromere fragments detected, as well as the median of ploidy of all cell lines is shown in Table 2. The melan-a cell line appears in this work as a near triploid cell with a median of 54 chromosomes, which is probably a result of the time in culture, since this cell line has been first described having a normal diploid karyotype [38]. While no chromosomal translocations of any kind were detectable in melan-a cell line, chromosomal translocations including breaks, translocations, fusions and centromere breakages were observed in all the other cell lines, as shown in Figure 7 and Table 2. The correlation between changes in karyotype and phenotype was also observed. Note that between the non-tumorigenic cell lines (melan-a, 2C and 4C) and the tumorigenic but non-metastatic melanoma lineage (4C3-), common rearrangements are kept such as T(8;14), T(14;8) and Fus(8.6), while the metastatic melanoma cell line (4C3+) has a more heterogeneous karyotype, indicative that higher instability occurs in those cells (Table 2). Supporting the case for increased genomic instability, Robertsonian fusions were found in 100% of metaphases analyzed from 4C3+ (Figure 7B), and a highly significant increase of the cell ploidy was also noticed ($p < 0.001$) (Figure 7C).

DISCUSSION

Our group has recently established a melanocyte malignant transformation model where a murine non-tumorigenic melanocyte lineage (melan-a) was submitted to sequential cycles of substrate adhesion blockade resulting in the establishment of non-tumorigenic melan-a sublines and several melanoma lineages [39,40].

In melanoma, the possibility of correlating a specific pathological stage with a corresponding genetic alteration has allowed the experimental study of different stages of tumor progression. However, samples from early stages are usually unavailable for the study, preventing the identification of initiating events in tumors. It is in this context that the study of models like ours becomes relevant.

Chromosomal instability is increasingly appreciated as a key component of tumorigenesis in mammals. It has been postulated that telomere dysfunction and cell-cycle checkpoint deficiency could play a causal role in early carcinogenesis by instigating chromosomal instability, thus promoting neoplastic transformation [54,55].

To study the timing of the occurrence of telomere shortening during melanocyte transformation, we analyzed in our model the profile of telomere length by Q-FISH and found that in comparison to the parental cell line (melan-a) that telomere length significantly decreased as additional rounds of cell adhesion blockages were performed. Additionally, variation among telomere length for individual cell lines significantly decreased in parallel with telomere length as

subsequent cell adhesion blockages were performed. These findings are in agreement with the idea that telomere length abnormalities appear to be one of the earliest genetic alterations acquired in the multistep process of malignant transformation.

Indeed, telomere shortening and telomerase activation are the most prevalent aberrations in pre-cancerous lesions [31]. Telomere length abnormalities have been described in pre-invasive breast lesions [56], pancreas [57], prostate [58-60], and many different types of human epithelial cancer precursor stages [61]. Likewise, telomerase activity has been detected early in carcinogenesis [62-64]. In addition, an *in vivo* study in human breast cancer found that cancer cells continue to experience telomere loss and anaphase bridges even after expression of telomerase. These results demonstrate that even when cancer cells actively maintain their telomeres, they continue to show fundamental defects that promotes telomere loss [65].

In our model, we observe telomere shortening in parallel to genomic instability in the context of telomerase positive cell lines. These observations are consistent with the fact that although telomerase is responsible for addition of telomeric sequences with every cell cycle, a plethora of other proteins also play important roles in the regulation of telomere length maintenance and in the formation of a protective end-cap that prevents chromosome fusion and telomere erosion [66,67]. Additionally to it, several lines of evidence also suggest a protective function for telomerase apart from its role in telomere elongation [68,69]. In recent work Xu and Blackburn (2007) [70] described a distinct class of extremely short telomeres (t-stumps) in human cancer cells with active telomerase and lacking checkpoints pathways. Those structures are not just tolerated by these cells, but at least one component of telomerase might have a protection function at them.

We previously showed that c-Myc can mediate the formation of Rb chromosomes during the remodeling of centromere positions and by telomere–telomere fusions at the telocentric termini of mouse chromosomes [37].

In contrast to our previous findings the Rb fusions identified in this work do not show telomere signals at the centromeric fusion points, but this does not exclude that a similar mechanism could be responsible for those rearrangements in our model. Apart from telomere abnormalities, one of the most remarkable features of this model is the abundance of centromeric instability manifested as centromere fragments and centromeric fusions. Those centromere fragments increase from melan-a to 4C3- almost disappearing in 4C3+ where the Rb fusions are present. Some of the centromere fragments appeared like mini chromosomes containing four telomeric signals, which were likely produced by the fusion of two individual centromere fragments or by the fusion followed by breakage of two chromosomes. In this case the shortening of telomeres would lead to a telocentric fusion that would appears in the cell karyotype as two chromosomes with terminal deletions and one centromere fragment with four telomeric signals. Later those unstable chromosomes could fuse and produce an Rb chromosome with no telomeres at the fusion point. This model is supported by the idea that the rate of telomere free ends increases as additional rounds of cell adhesion blockages are performed.

Some of those fragments are likely to contain only heterochromatin material and may not be able to produce any abnormalities in the cell, whilst other fragments carrying euchromatin material can cause genetic instability by the expressed genes they might be carrying.

Rb translocations in humans constitute the most common structural genetic abnormalities in aborted fetuses and newborns [71-73]. Moreover, human Rb translocation chromosomes have been found as acquired or constitutional genetic lesions in hematological cancers [74,75], in solid tumors [76,77], and at the onset of acute myelogenous leukemia [78]. The presence of Rb fusions in our model correlates with oncogenesis as the metastatic cell line is the only cell line with this structure.

Chromosome rearrangements resulting from telomere loss in cancer have been proposed to result primarily from the extensive chromosome fusion that occurs when telomeres become critically short or uncapped during a crisis event through breakage/fusion/bridge (BFB) cycles [67]. However, telomere loss is not confined to cell in crisis, since as discussed before many early passages in human tumor cells and cell lines demonstrate telomere instability.

Therefore, telomere shortening or uncapping and telomerase activation appear to have both tumor suppressive and oncogenic roles: the apparent tumor suppressive role of telomere shortening may help to initiate genomic instability generating pro-apoptotic signals in an apoptotically functioning cell. Conversely, the apparent oncogenic role of telomerase activation may help to stabilize genomic instability through telomere stabilization and decreased variation in telomere length for critically short telomeres [79].

Taken together, our results illustrate for our melanoma model chromosomal instability with a structural signature of centromere breakage and telomeric loss. This phenotype seems to depend on and dynamically develop during cell adhesion blockade signaling and initial genomic or epigenomics insults present in the immortalized melanocyte melan-a cell line.

Acknowledgements: We thank our granting agencies for financial support. These include the National Cancer Institute of Canada, The Canadian Cancer Society, CancerCare Manitoa Foundation, the Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training” and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References:

- [1] Weinstock, MA (1999). Do sunscreens increase or decrease melanoma risk: an epidemiologic evaluation. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **4**, 97-100.
- [2] Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009.
- [3] Jemal, A, Murray, T, Samuels, A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ (2003). Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* **53**, 5-26.
- [4] Hussein MR (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol.* **57**, 797-801.
- [5] Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649.
- [6] Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G, Lissia A, Tanda F, Castello G (2003). Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res.* **13**, 167-170.
- [7] Hussein MR, Sun M, Roggero E, Sudilovsky EC, Tuthill RJ, Wood GS, Sudilovsky O (2002). Loss of heterozygosity, microsatellite instability, and mismatch repair protein alterations in the radial growth phase of cutaneous malignant melanomas. *Mol Carcinog.* **34**, 35-44.
- [8] Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, Sudilovsky EC, Wood GS, Sudilovsky O (2004) Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. *J Cutan Pathol.* **28**, 343-350.
- [9] Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Säll T, Mitelman F, Horsman D (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* **108**, 57-65.
- [10] Schulten HJ, Gunawan B, Otto F, Hassmann R, Hallermann C, Noebel A, Füzesi L (2002). Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding. *Cancer Genet Cytogenet.* **133**, 134-141.
- [11] Albertson DG, Collins C, McCormick F, and Gray JW (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* **34**, 369-376.
- [12] Duesberg P, and Rasnick D (2000). Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**, 81-107.
- [13] Gebhart E, and Liehr T (2000). Patterns of genomic imbalances in human solid tumors. *Int J Oncol.* **16**, 383-399.
- [14] Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol.* **17**, 5-18.
- [15] Yuen KW, Montpetit B, and Hieter P (2005). The kinetochore and cancer: what's the connection? *Curr Opin Cell Biol.* **17**, 576-582.

- [16] Storchova Z, and Pellman D (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 45–54.
- [17] Cleveland DW, Mao Y, and Sullivan KF (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**, 407-421.
- [18] Henikoff S, Ahmad K, and Malik HS (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**, 1098-1102.
- [19] Yue Y, Grossmann B, Ferguson-Smith M, Yang F, Haaf T (2005). Comparative cytogenetics of human chromosome 3q21.3 reveals a hot spot for ectopic recombination in hominoid evolution. *Genomics* **85**, 36-47.
- [20] Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M (2005). Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet.* **161**, 159-163.
- [21] Shaw CJ, Lupski JR (2004). Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* **1**, R57-64.
- [22] Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP (2007). Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod.* **13**, 55-59.
- [23] Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B (2006). TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* **38**, 122-127.
- [24] Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2005). Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* **111**, 297-304.
- [25] Anelli L, Albano F, Zagaria A, Liso A, Cuneo A, Mancini M, Liso V, Rocchi M, Specchia G (2004). Pericentric chromosome 8 inversion associated with the 5'RUNX1/3'CBFA2T1 gene in acute myeloid leukemia cases. *Ann Hematol.* **84**, 245-249.
- [26] Pedrazzini E, Cerretini R, Noriega MF, Narbaitz M, Palacios MF, Negri P, Bengió R, Slavutsky I (2006). Inversions of chromosomes 2 and 6 in mantle cell lymphoma. Cytogenetic, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet.* **167**, 164-167.
- [27] Mathew S, Dalton J, Riedley S, Spunt SL, Hill DA (2002). Complex t(X;18)(p11.2;q11.2) with a pericentric inversion of the X chromosome in an adolescent boy with synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **132**, 136-140.
- [28] Ulucan H, Akin R, Kösem M, Gül D (2006). De novo pericentric inversion of chromosome 5 in a girl with mental retardation and unilateral ear malformation. *Am J Med Genet A.* **140**, 298-299.
- [29] Ramadevi AR, Naik U, Dutta U, Srikanth, Prabhakara K (2002). De novo pericentric inversion of chromosome 4, inv(4)(p16q12) in a boy with piebaldism and mental retardation. *Am J Med Genet.* **113**, 190-192.
- [30] Gonçalves dos Santos Silva A, Sarkar R, Harizanova J, Guffei A, Mowat M, Garini Y, and Mai S (2008). Centromeres in Cell Division, Evolution, Nuclear Organization and Disease. *J Cel Biochem.* **104**, 2040–2058.

- [31] Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausson KA, and Soria JC (2008). Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol.* **66**, 99-117.
- [32] Bailey S, and Murnane JP (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucl Acid Res.* **34**, 2408-2417.
- [33] Desmaze C, Soria JC, Freulet-Marriere MA, Mathieu N, and Sabatier L (2003). Telomere-driven genomic instability in cancer cells. *Cancer Lett.* **194**, 173-182.
- [34] Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z, Kuttler F, Chuang TC, Moshir S, Mougey V, Chuang AY, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9613-9618.
- [35] Mai S, and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327-1331.
- [36] Caporali A, Wark L, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398-1406.
- [37] Guffei A, Lichtensztein Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, and Mai S (2007). c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* **9**, 578-588.
- [38] Bennett DC, Cooper PJ, and Hart IR (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* **39**, 414 – 418.
- [39] Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, and Jasiulionis MG (2006). Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* **8**, 231-241.
- [40] Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, and Jasiulionis MG (2005). Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer* **114**, 356-363.
- [41] Mufson RA, Fisher PB, and Weinstein IB (1979). Effect of phorbol ester tumor promoters on the expression of melanogenesis in B-16 melanoma cells. *Cancer Res.* **39**, 3915-3919.
- [42] Clark WH, Jr (1967). A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In *Advances in the biology of the skin*. W Montagna, F Hu, Eds. Pergamon Press, New York, USA. pp. 621-647.
- [43] Foijer F, Draviam VM, Sorger PK (2008). Studying chromosomal instability in the mouse. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 73-82.
- [44] Wu X, and Pandolfi PP (2001). Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* **11**, S2-9.
- [45] Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire. Eds. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 55–67.

- [46] Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, and Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci.* **114**, 4429–4434.
- [47] Schaefer LH, Schuster D, and Herz H (2001). Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to threedimensional fluorescence microscopy. *J Microsc.* **204**, 99–107.
- [48] Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, and Mai S (2004). The threedimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* **3**, 2–12.
- [49] Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TC, Chuang AY, Wark L, Young IT (2005). Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A.* **67**, 144-150.
- [50] Dalla Torre CA, Maciel RM, Pinheiro NA, Andrade JA, De Toledo SR, Villa LL, and Cerutti JM (2002). TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. *Braz J Med Biol Res.* **35**, 65-68.
- [51] Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004-3016.
- [52] Potter M, Marcu KB (1997). The c-myc story: where we've been, where we seem to be going. *Curr Top Microbiol Immunol.* **224**, 11-17.
- [53] Kuttler F and Mai S (2006). c-Myc, genomic instability and disease. In Vol 1: Genome dynamics. *Genome and Disease.* J-N Volff (Ed). Karger Publishers, Wuerzburg, Germany, pp. 171-191.
- [54] Soler D, Genescà A, Arnedo G, Egozcue J, Tusell L (2005). Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* **44**, 339-350.
- [55] Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**, 641-645.
- [56] Meeker AK, Argani P (2004). Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 285-296.
- [57] van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH, Maitra A(2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* **161**,1541-1547.
- [58] Joshua AM, Evans A, Van der Kwast T, Zielenska M, Meeker AK, Chinnaiyan A, Squire JA (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim Biophys Acta.* **1785**, 156-181.
- [59] Vukovic B, Beheshti B, Park P, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA (2007). Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* **116**, 1-11.
- [60] Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, De Marzo AM (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* **62**, 6405-6409.

- [61] Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM (2004). Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* **10**, 3317-3326.
- [62] Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* **11**, 2074-2082.
- [63] Gulmann C, Lantuejoul S, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E (2005). Telomerase activity in proximal and distal gastric neoplastic and preneoplastic lesions using immunohistochemical detection of hTERT. *Dig Liver Dis.* **37**, 439-445.
- [64] Lancelin F, Anidjar M, Villette JM, Soliman A, Teillac P, Le Duc A, Fiet J, Cussenot O (2000). Telomerase activity as a potential marker in preneoplastic bladder lesions. *BJU Int.* **85**, 526-531.
- [65] Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo WL, Ljung BM, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW, Lockett SJ (2004). In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet.* **36**, 984-988.
- [66] de Lange T (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19**, 2100-2110.
- [67] de Lange T (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-540.
- [68] Kim M, Xu L, Blackburn EH (2003). Catalytically active human telomerase mutants with allele-specific biological properties. *Exp Cell Res.* **288**, 277-287.
- [69] Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3723-3728.
- [70] Xu L, Blackburn EH (2007). Human cancer cells harbor T-stumps, a distinct class of extremely short telomeres. *Mol Cell.* **28**, 315-327.
- [71] Kim SR, Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test.* **6**, 163-168.
- [72] Nielsen J, Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* **87**, 81-83.
- [73] Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet.* **33**, 44-54.
- [74] Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **151**, 14-35.
- [75] Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* **132**, 79-80.
- [76] Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7-16.

- [77] Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schröck E, Hilgenfeld E, Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 349-363.
- [78] Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, Takeyama H (2004). Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med.* 43, 508-511.
- [79] Hackett JA, Greider CW (2002). Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**, 619-626.

Figure and Tables legends.

Figure 1 – Characteristics of the model – **A**: Cell viability was determined by the MTT assay in triplicate. **B**: Tumorigenicity assay *in vivo*. Mice were subcutaneously injected with 2×10^5 cells. Bars: SD of the mean of 5 animals per group. *** $p < 0.0001$. **C**: Survival curves (100% x number of mice alive after each day/total number of mice at day 0) for mice inoculated with 4C3- and 4C3+. Experimental metastasis assay, 2×10^5 4C3+ cells (**D**) and 4C3- (**E**, **F**, and **G**) were injected via the caudal vein. Mice were sacrificed 20 (**D** and **E**), 40 (**F**) and 80 (**G**) days later, their lungs were removed and metastatic foci in the lungs were identified and some are indicated in the panel **D** by the white arrows. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 2 – Shortening of telomeres in the presence of telomerase activity – **A**: Telomere length distribution in the model as determined by PNA telomere Q-FISH. The vertical lines and the arrows highlight the decreased heterogeneity of telomere lengths through the melanoma genesis model. **B**: Telomerase activity in the model by the TRAP assay. (-) non-heated extract, (+) heated extract, IC: internal PCR control, C-: negative control and PD: primer dimmers. **C**: Tert expression analyzed in melan-a cells and melan-a-derived cell lines by RT-PCR, β -actin expression was used as a normalization control. No significant difference was observed between the samples. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 3 – Robertsonian Fusions and other Centromere Abnormalities - Representative FISH images of 4C3- and 4C3+ metaphases hybridized with probes against centromere and telomere. 4C3- cell line is shown in panels **A**, **B** and **C**. Note the centromere fragment in the magnification box, it shows under the centromere staining (**A**) four telomeric signals (**B**). In panels **D**, **E** and **F**, the representative metaphase of 4C3+ cell line. Rb fusion is shown on the magnification boxes. Attention to the fact that under the centromeric fusion point (**D**) there is no telomeric signals (**E**). **A** and **D**: centromeric signals only; **B** and **E**: telomeric signals only. Note that in both cell lines chromosomes with missing signals are present, but 4C3+ had the highest percentage of telomere free ends (see text). 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 4 – Indirect Immunofluorescence using a c-Myc-specific antibody. c-Myc staining in the melanoma model. Each panel shows a representative image for each cell type; however, the layout is kept constant. **Left column**: c-Myc staining (Alexa 488, Molecular Probes), **central column**: nuclear staining (DAPI), **right column**: merge images. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line. Bars: 20 μ m.

Figure 5 – Karyotype evolution - SKY of metaphases derived from cell lines corresponding to phases of melanocyte malignant transformation. Representative images from SKY are shown: Panel (A) melan-a; Panel (B) 2C; Panel (C) 4C; Panel (D) 4C3- and Panel (E) 4C3+. White arrows point to Rb fusion chromosomes. Note the increase of abnormalities through the model and the increase of chromosome number in the 4C3+ cell line. Each panel shows a representative image for each cell type; however, layout is the same for all. Left panel: the raw image of a metaphase; central panel: the classified image of the metaphase; right panel: the inverted DAPI-banded image of the metaphase; and larger panel: the karyotype table of the metaphase. ma: melan-a cells; 2C and 4C: melan-a cells submitted to 2 and 4 substrate adhesion blockade cycles, respectively; 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 6 – Centromere fragments - Multicentric chromosomes and centromere fragments are visible by FISH. Metaphases of 4C3- cell line were hybridized using a mouse pan-centromeric probe conjugated to FITC (green) (Cambio, UK). **A**: inverted DAPI image; **B**: pan-centromeric probe. White squares highlight the centromere fragments and they are shown on the magnification boxes in both panels. **C**: the number of centromere fragments in all the cell lines. Note that the number increase from melan-a to 4C3-, almost disappearing on 4C3+. 4C3-: slow-growing melanoma cell line; 4C3+: fast-growing melanoma cell line.

Figure 7 – Chromosome rearrangements. A total of 20 metaphases were examined for each cell line. **A**: Number of rearrangements found in each cell line per metaphase; **B**: Number of Rb chromosome found per metaphase in the melanoma model; **C**: Variation in ploidy found in the tumorigenesis model.

Table 1 - Summary of chromosomes involved in the formation of Rb chromosomes in 4C3+ cells in a non-random manner. The numbers given are derived from the analysis of 20 metaphases. All metaphases carried at least one Rb chromosome, fifteen of these 20 metaphases carried two or more Rb fusions. The involvement of each chromosome in the formation of Rb chromosomes is given, and the respective significance is indicated. Fifteen of twenty metaphases (75%) carried one Robertsonian fusion involving chromosomes 8 and 12, while 100% of the metaphases analyzed carried at least one Rb(12.12). For further details, see text and Material and Methods section.

Table 2. Summary of the rearrangements found throughout melanocyte malignant transformation. The data given are derived from the analysis of 20 metaphases. The braces indicate how often each rearrangement was seen in 20 metaphases. Only rearrangements that were present in more than 2 metaphases are presented here. * Median of chromosome number from 20 metaphases. ** Absence or presence of centromere fragments in the metaphases, braces represent the number of fragments found in the analysis.

Table 3. Increase of chromosome number in the melanocyte malignant transformation model. The numbers given are the median value derived from the analysis of 20 metaphases.

Table 1.

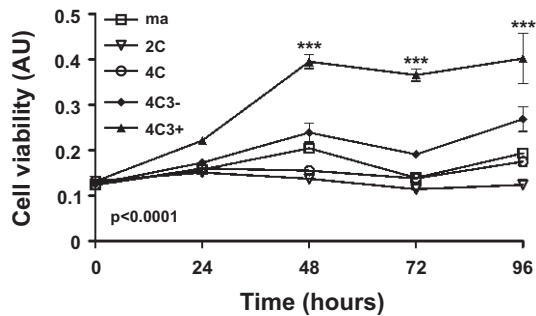
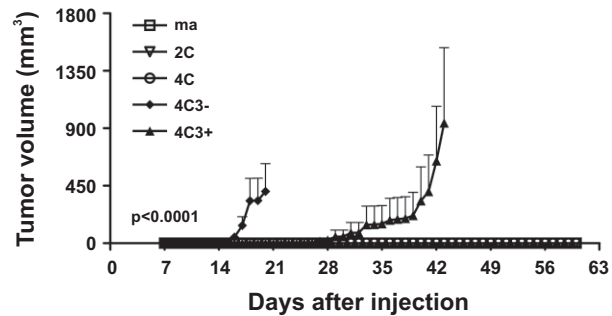
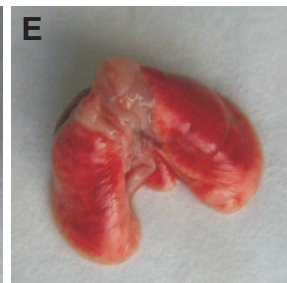
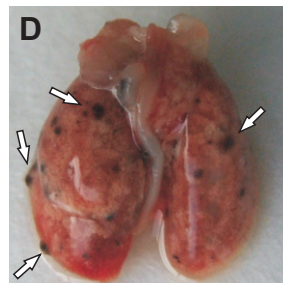
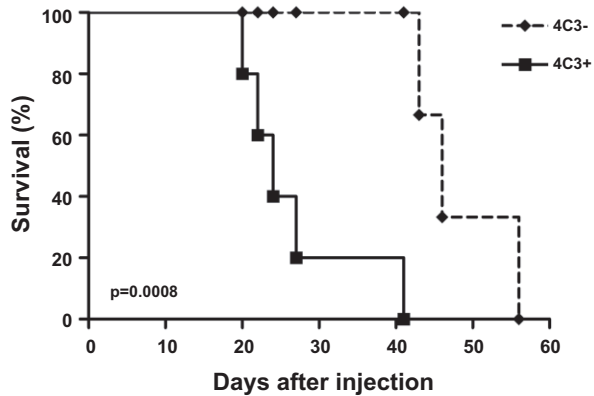
Chromosome Number	Times Involved in Rb Fusions	<i>P</i>
8	15	<0.01
12	67	<0.001

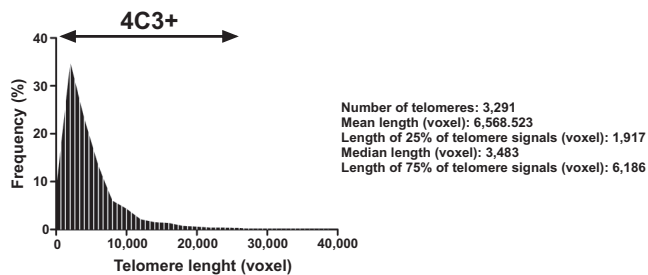
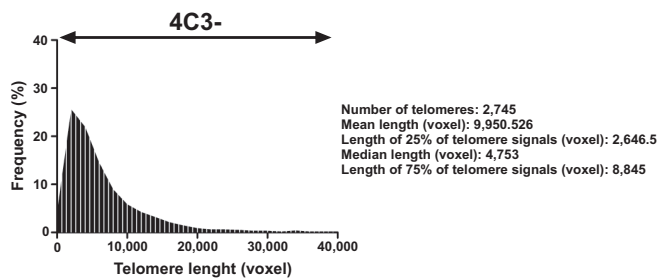
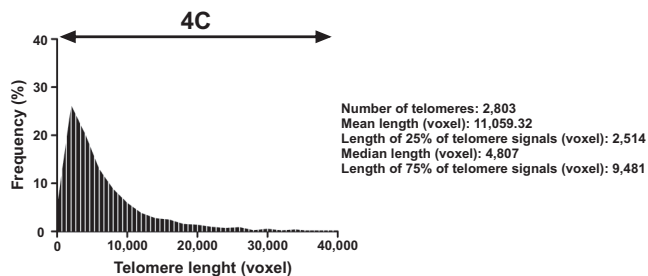
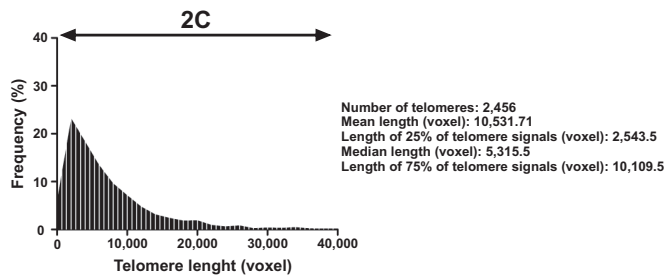
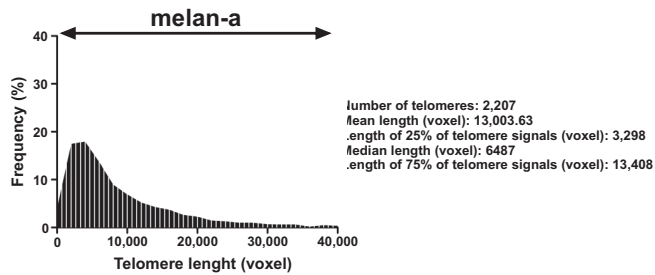
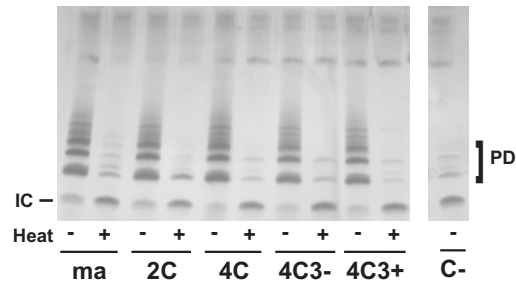
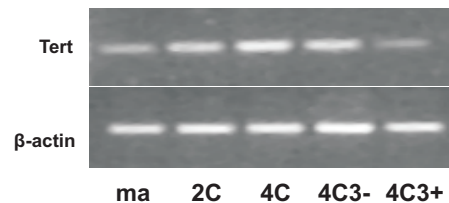
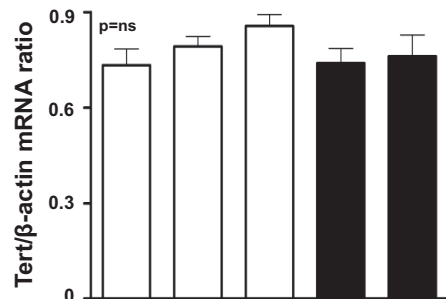
Table 2.

Cell line	Number of Chromosomes*	Centromere fragments**	Aberration chart (structural aberrations)
melan-a	54	yes {21}	none
2C	51	yes {24}	T(8;14){13} / T(14;8){20} / F(8;6){19} / Del(11){18}
4C	51	yes {31}	T(8;14){19} / T(14;8){21} / T(15;X){18} / F(8;6){4} / Del(11){18}
4C3-	53	yes {51}	T(8;14){18} / T(14;8){21} / T(5;18){9} / T(15;X){18} / F(8;6){15} / Del(11){17}
4C3+	72	yes {8}	T(1;16){18} / T(8;1){17} / T(1;12){15} / T(3;13){20} / T(13;3){20} / T(X;15){19} / T(10;16){16} / Rb(8.12){15} / Rb(12.12){26} / Del(1){18} / Del(6){12} / Del(11){20}

Table 3.

Chromosome Number	Ma	2C	4C	4C3-	4C3+
1	2	3	4	4	5
2	3	3	3	3	4
3	2	2	2	2	3
4	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	4
6	4	3	3	3	6
7	2	2	2	2	3
8	3	3	2	3	4
9	2	2	2	2	4
10	2	2	2	2	4
11	2	3	3	3	5
12	2	2	2	2	5
13	2	2	2	2	3
14	3	3	3	3	3
15	3	4	4	4	4
16	4	3	3	2	3
17	3	3	3	3	4
18	3	2	2	2	3
19	4	2	2	3	3
X	2	1	2	2	2

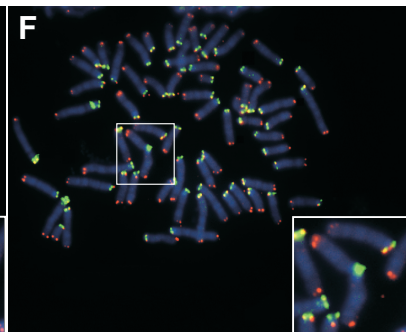
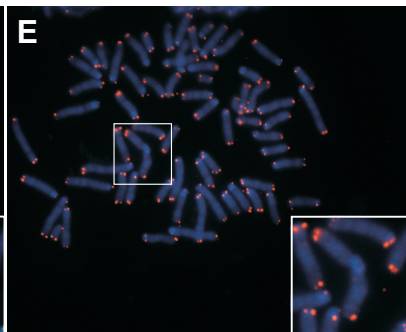
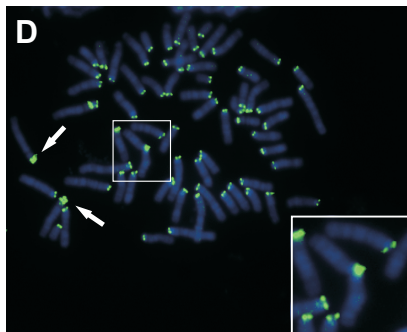
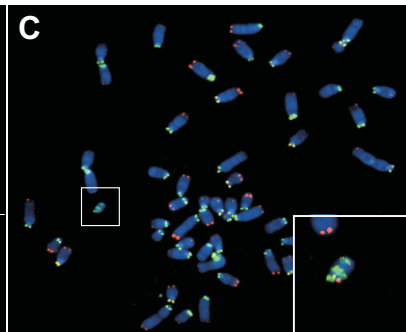
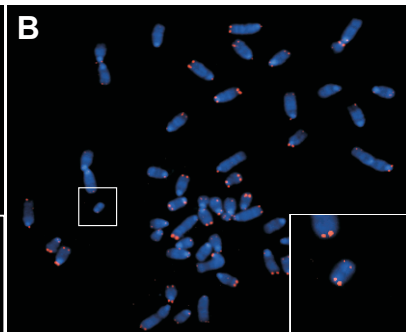
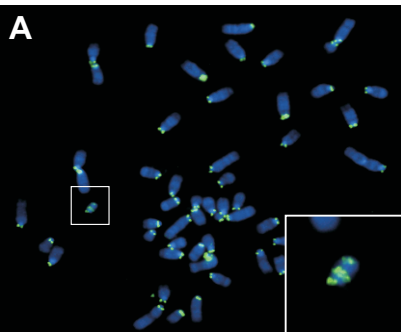
A**B****C**

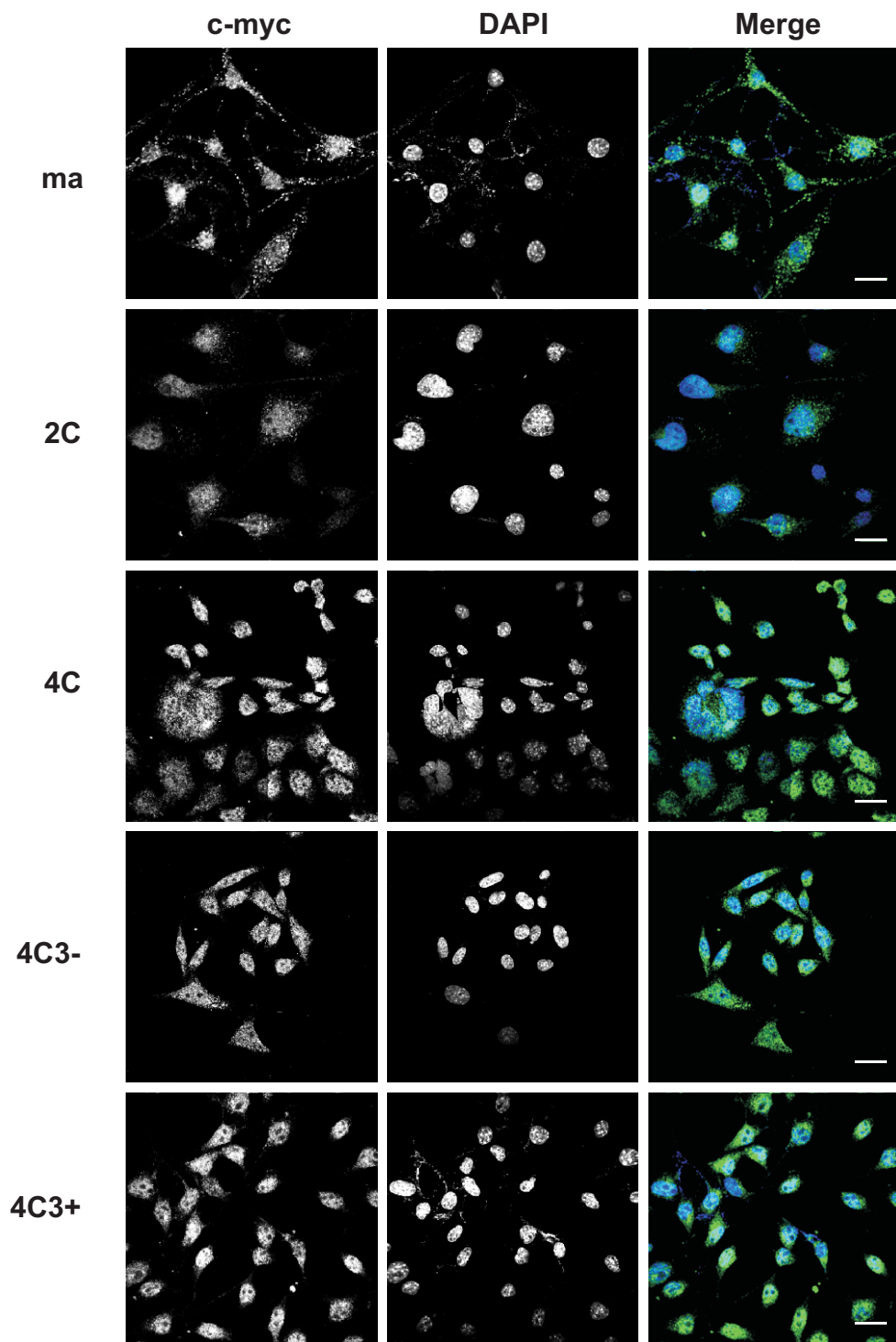
A**B****C**

Centromere

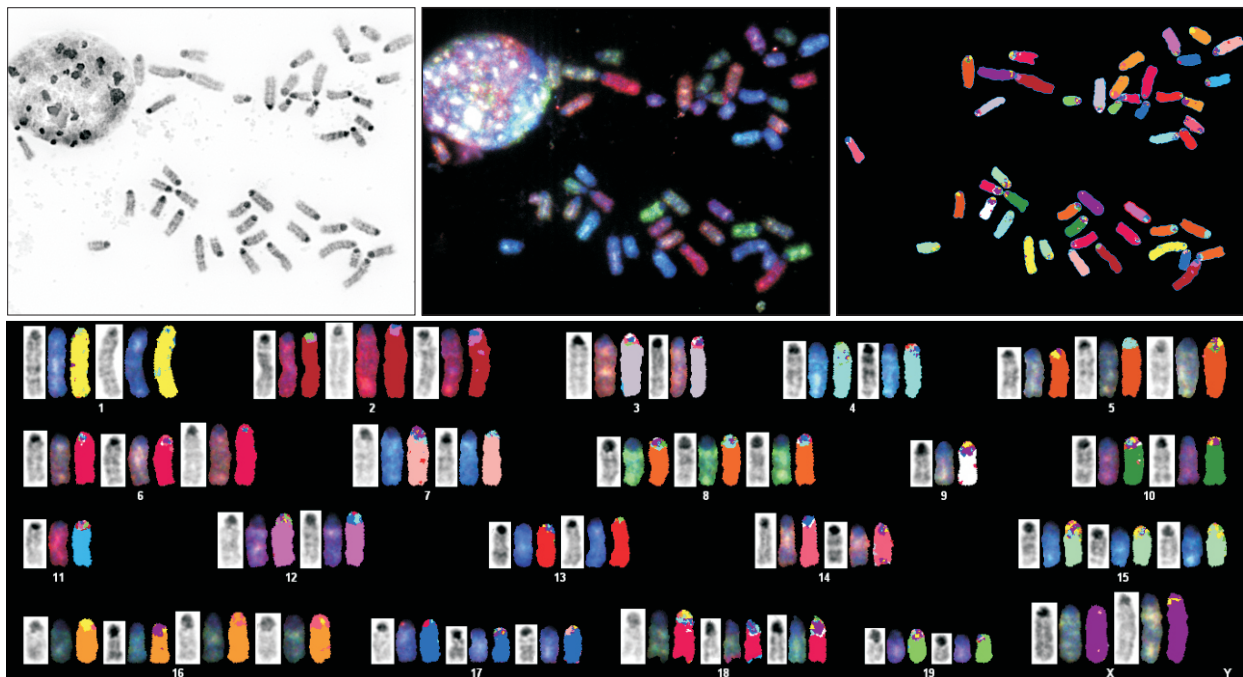
Telomere

Merge

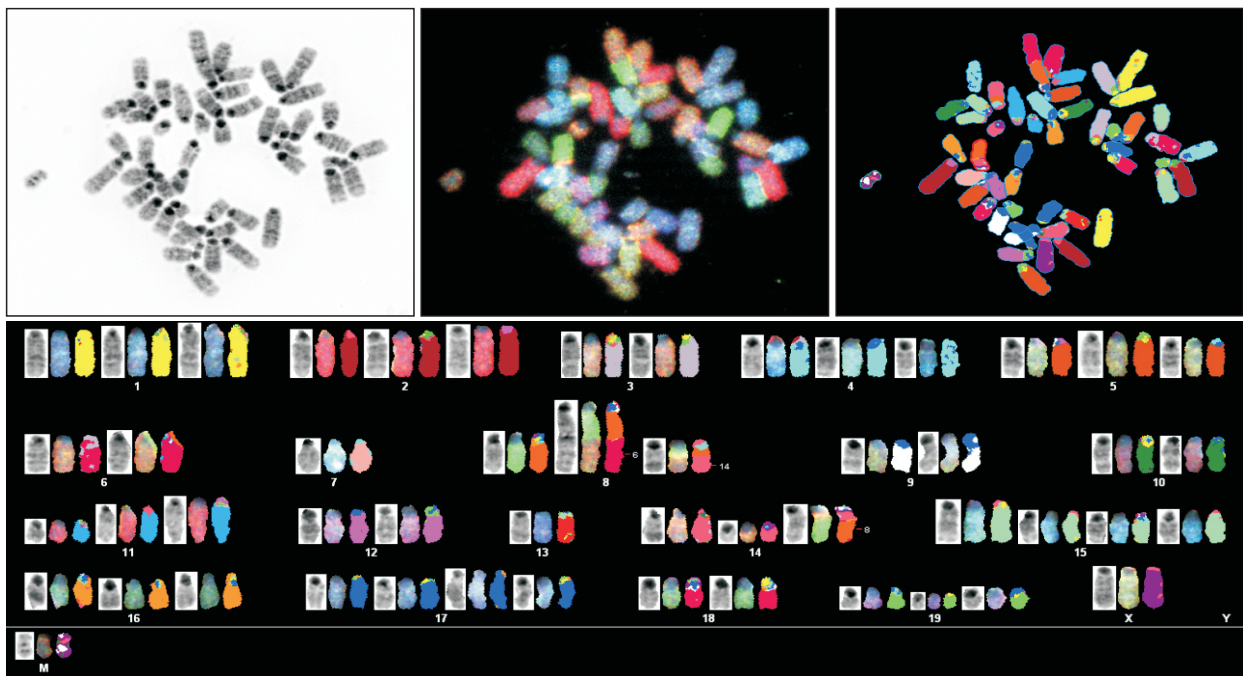


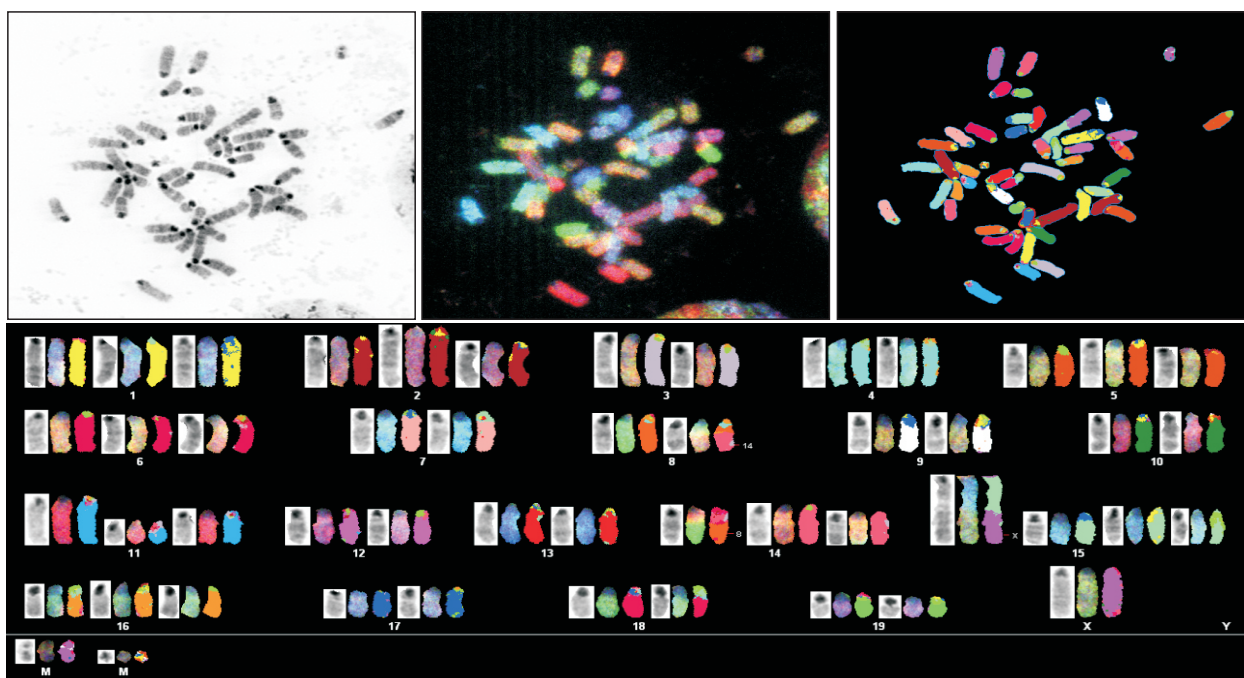
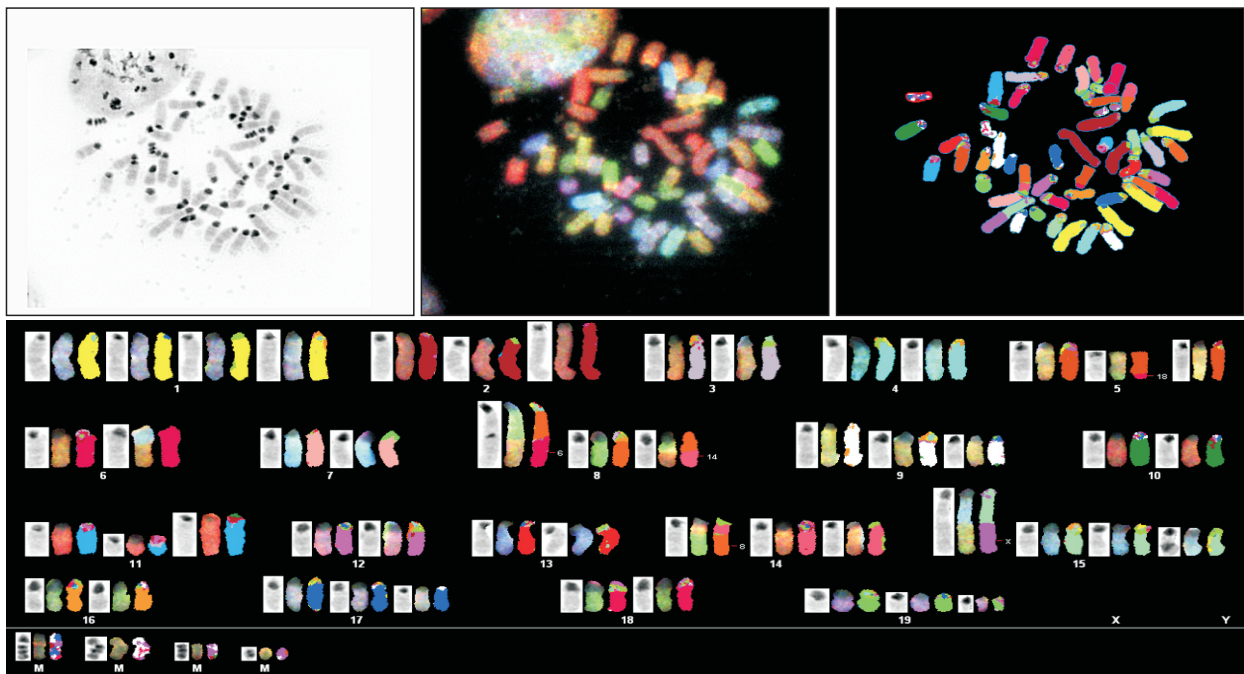
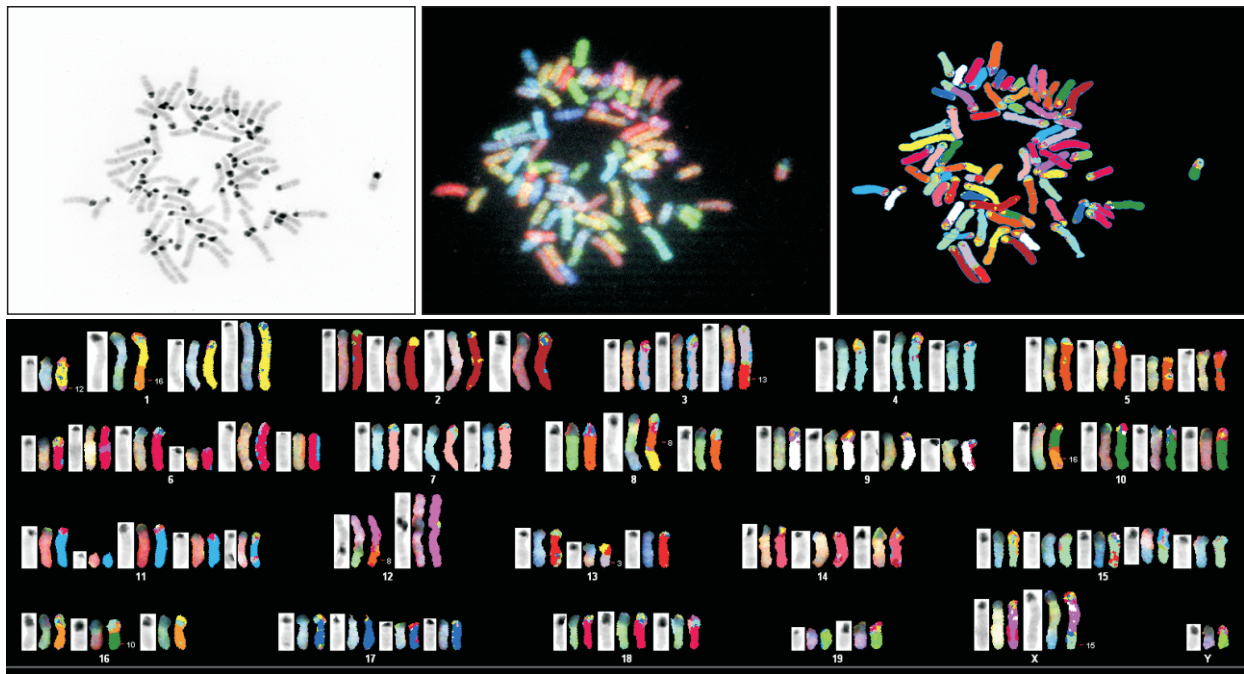


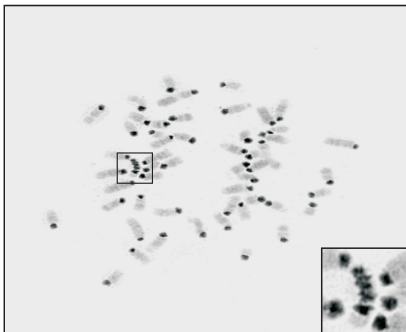
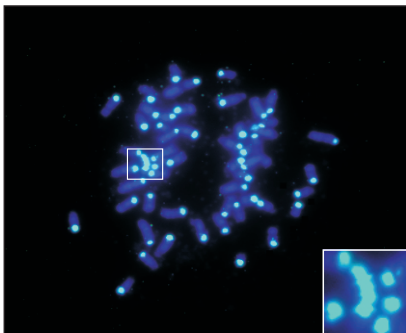
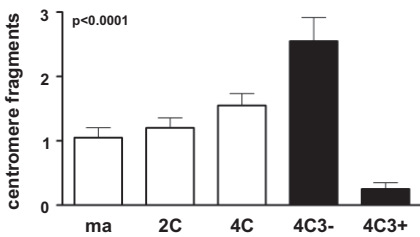
A

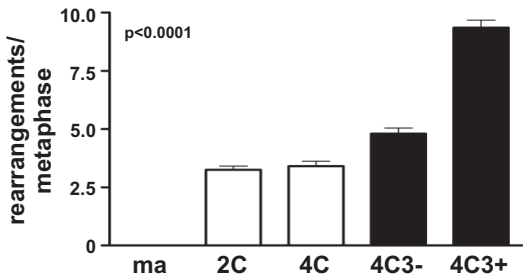
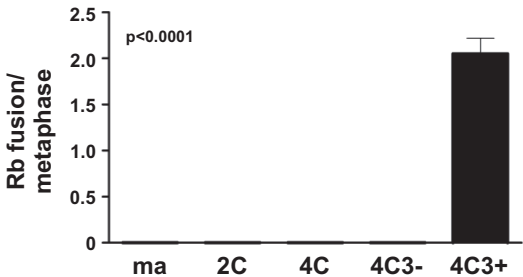
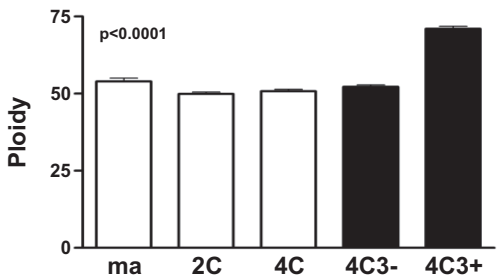


B



C**D****E**

A**B****C**

A**B****C**

35th Anniversary Series

Centromeres in Cell Division, Evolution, Nuclear Organization and Disease

Amanda Gonçalves dos Santos Silva,^{1,2} Rahul Sarkar,^{1,3} Jana Harizanova,¹ Amanda Guffei,¹ Michael Mowat,¹ Yuval Garini,⁴ and Sabine Mai^{1*}

¹Manitoba Institute of Cell Biology, CancerCare Manitoba, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

²Disciplina de Imunologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo/SP, Brazil

³Department of Imaging Research, Sunnybrook Health Sciences Center, Toronto, Canada

⁴Department of Physics and Nanotechnology Institute, Bar Ilan University, Ramat Gan, Israel

Abstract As the spindle fiber attachment region of the chromosome, the centromere has been investigated in a variety of contexts. Here, we will review current knowledge about this unique chromosomal region and its relevance for proper cell division, speciation, and disease. Understanding the three-dimensional organization of centromeres in normal and tumor cells is just beginning to emerge. Multidisciplinary research will allow for new insights into its normal and aberrant nuclear organization and may allow for new therapeutic interventions that target events linked to centromere function and cell division. *J. Cell. Biochem.* 104: 2040–2058, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: centromere; cell division; evolution; cancer; 3D nucleus; imaging

The study of the cell nucleus and its components has a long history that began in the 19th century and is closely interlaced with the history of cell biology and genetics. An important contribution made by previous generations of researchers was the careful and detailed observations and illustrations of cells, nuclei, and chromosomes. Prior to photographic representations and digital imaging, hand-drawn representations guided the research community. Continued progress in the field was made possible by the critical analyses by these pioneers on cells of many species. This

work greatly benefited from the development of microscopes, photography and imaging. Phase contrast, polarization, differential interference contrast, fluorescence and electron microscopy and live cell imaging—to name just a few—have given us higher resolutions and further knowledge gain. The foundation for our current studies was laid by the forerunners of cell biology and genetics through their dedication and precise observations.

The nucleus was first described by Robert Brown in 1833. In 1873, Fol, Bütschli, and Strasburger discovered “karyokinetic figures”—today called the mitotic apparatus [for review see, Gourret, 1995]. In 1882, Walther Flemming described the process of mitosis for the first time in detail. During cell division, he observed a “stainable substance of the nucleus” that separates into thread-like strings. Hence, he coined the term “mitosis” from Greek for “thread.” Six years later, these threads were defined as chromosomes by Heinrich Waldeyer [1888] [http://www.laskerfoundation.org/news/gnn/timeline/timeline_top.html]; Cremer, 1985]. Flemming had used aniline dyes to stain and then visualize these “threads” and commented “we will designate as chromatin that substance, in the nucleus, which upon treatment

Grant sponsor: Canadian Institutes of Health Research; Grant sponsor: Komen Foundation for Breast Cancer; Grant sponsor: National Cancer Institute of Canada; Grant sponsor: Canadian Cancer Society; Grant sponsor: CancerCare Manitoba Foundation; Grant sponsor: Israel Science Foundation—FIRST Program.

*Correspondence to: Sabine Mai, PhD, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermot Avenue, Winnipeg MB R3E 0V9, Canada. E-mail: smai@cc.umanitoba.ca

Received 20 February 2008; Accepted 22 February 2008

DOI 10.1002/jcb.21766

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

with dyes known as nuclear stains does absorb the dye" (1882) (Fig. 1). Due to the staining method and his gift of detailed observation, Flemming was able to state that the threads—chromosomes—split along their length into two identical halves (sister chromatid separation). He published these findings in *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (1882) [for review see also, Rieder and Khodjakov, 2003]. Although Flemming observed cell divisions in detail, the centromere, the focus of this article, was not yet described. Instead, he showed chromosomes with multiple spindle fibers attaching all over the length of the chromosome [Flemming, 1882; Cremer, 1985]. Although, Boveri [1902, 1914, 1929] had postulated that chromosome and centrosome errors contribute to the development of malignant tumors, the centromere was also unknown to him.

The name “centromere” was given to the primary constriction of the chromosome by

Darlington [1936a]. He defined it as the “site of spindle fiber attachment” [1936a]. “The centromeres are active in moving the chromosomes on the spindle” [Darlington, 1936b]. In Darlington’s time, the centromere was thus already recognized for its key role in cell division; spindle attachment and chromosome movements were described in detail and depicted in hand-drawn figures. Importantly, naturally occurring or irradiation-induced mis-divisions of the centromere were already described [McClintock, 1932, 1933; Darlington, 1936b]. The resulting consequences of centromere mis-division were illustrated for the chromosome constitution of the resulting daughter cells, and hypotheses for the mechanisms leading to this event were discussed in great detail [Darlington, 1936b]. Some of these questions are still valid today and have not been resolved. These include aspects of the regulation and timing of sister chromatid separation

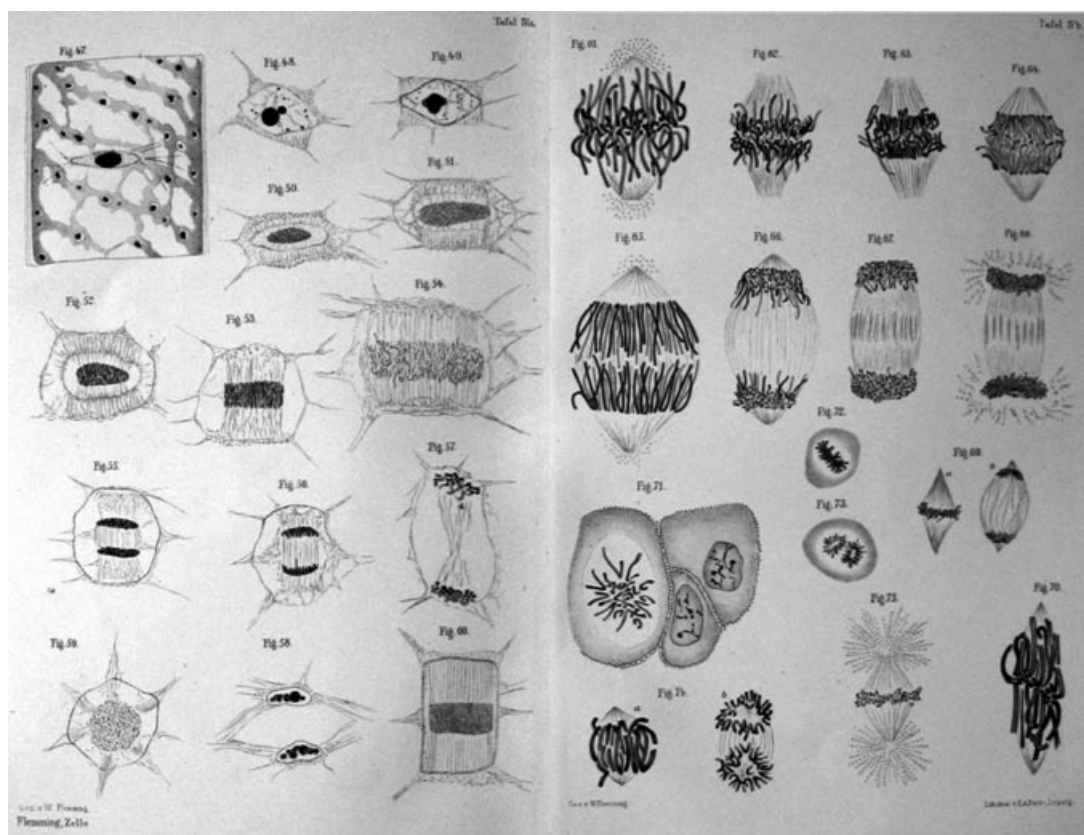


Fig. 1. Cell division cycles. Historical drawings by Walther Flemming (1843–1905) showing for the first time cell division that he termed mitosis and “threads” (later called chromosomes) that are evenly distributed during mitosis to daughter cells. The drawings represent the green algae *Spirogyra* (Figs. 47–60), the plants *Lilium corceum* (Fig. 61), *Lilium corceum* (Figs. 62–68),

Lilium sibirica (Fig. 69), and *Lilium tigrinum* (Fig. 70), the human cornea (Figs. 71–73), testes of salamander (Figs. 74, 75), and the egg of the sea urchin *Toxopneustes lividus* (Fig. 75). All images are reproduced from Flemming’s book *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1882.

and centromere division and consequences of their dysregulation, the mechanisms of iso-chromosome formation, and the effects of mis-segregation on the subsequent cell divisions, cell lineages and the organism.

THE CENTROMERE

The centromere, cytogenetically is the primary constriction of each chromosome and is defined as the chromosomal region that will determine the formation of the kinetochore and sister chromatid cohesion during cell division. Through the kinetochore, the chromosome interacts with the spindle microtubules and ensures chromatid segregation [Villasante et al., 2007]. Crucial to proper chromosome segregation is the bi-orientation of each chromosome. Each sister kinetochore is positioned on the opposite sides of the centromere and attaches to microtubules derived from the opposite spindle pole [Loncarek et al., 2007]. Failure to perform this bi-orientation, leads to syntelic chromosomes whose two kinetochores attach to one spindle pole. This error can be corrected through the force of astral microtubules, and this event is dependent on the presence of functional centrosomes [Loncarek et al., 2007].

The DNA sequence associated with all primate centromeres is the alpha-satellite DNA. It consists of tandem repeats of 171 base pairs (defining one monomer), and it is AT rich [Choo, 1997]. A large fraction of these monomers is organized into higher order repeats, with a repeat unit ranging in size from 3 to 5 Mb. The difference in sequence between these units is <2% [Alkan et al., 2007]. The evolutionary analysis of primate centromeric DNA showed that gibbon alpha-satellite sequences have only limited relationship with human sequences. In contrast, human and chimpanzee higher order centromeric repeats show a common origin [Alkan et al., 2007]. A very detailed description of a human functional centromere is presented for the X chromosome by Schueler et al. [2001].

Centromeres are surrounded by pericentromeres. These are chromosomal regions rich in transposons, retroelements, pseudogenes, and expressed genes [Saffery et al., 2003; Hall et al., 2006]. All of these elements contribute to the dynamic evolution of these sequences as shown for four *Brassica* species [Hall et al., 2006]. Centric breakage and fusion has been observed

in Robertsonian translocation chromosomes of wheat and rye [Zhang et al., 2001]. Pericentric inversions in humans are often associated with decreased male fertility [Collodel et al., 2006; Chantot-Bastarud et al., 2007, for review, see Anton et al., 2005], cancer [Mathew et al., 2002; Anelli et al., 2005; Pedrazzini et al., 2006], mental retardation [Ramadevi et al., 2002; Ulucan et al., 2006] and other diseases such as: [epilepsy: Grosso et al., 2004; cleft lip: Beiraghi et al., 2003; schizophrenia and learning disability: Hampson et al., 1999]. Such inversions may also be associated with duplications and deletions [López-Exposito et al., 2006; Patil and Phadke, 2007].

It is thus not surprising that pericentromeric regions are both hotspots for recombination events during evolution [Yue et al., 2005] and in cancer [Shaw and Lupski, 2004; Jamet et al., 2005]. In this context, we note that DNA double-strand-break hotspots are positioned near centromeres and telomeres [Blitzblau et al., 2007]. Mapping of the meiotic single-stranded DNA molecules revealed hotspot breakpoints in pericentromeric regions as well as within ~100 kb region at the telomeric ends of chromosomes. Thus, evolutionary hotspots at pericentromeres are also hotspots of DNA double-strand-breaks during meiosis and sites of genomic instability in cancer.

Centromere Evolution, Speciation, Structural Abnormalities and Cancer

The centromere contributes to speciation. There are many examples but, we will focus on two, the speciation of macropodine marsupials [Bulazel et al., 2007; Metcalfe et al., 2007] and mice [Capanna and Castiglia, 2004]. Examining centromere sequence composition and breakpoint reuse in wallabies, wallaroos and kangaroos, Bulazel et al. [2007] described species-specific shifts in the composition of centromere sequences. Metcalfe et al. [2007] who studied four marsupial hybrids found that all hybrids exhibited a low frequency of de novo rearrangements. The type of centromere instability described included the amplification of alpha satellites and of a transposable elements, de novo whole chromosome arm rearrangements and changes in chromatin structure.

In mice, speciation is commonly achieved with telocentric chromosomes that display a high grade of homogenization. There is greater than 99% sequence identity between

the telocentric sequences for all mouse chromosomes, leading to frequent recombinations and stable evolutionary maintenance. This genetic similarity however, also enables the possibility of Robertsonian (Rb) translocations [Garagna et al., 2001; Kalitsis et al., 2006]. Rb translocation chromosomes were first discovered in 1916 in grasshoppers by W R B Robertson [for review, see Gardner and Sutherland, 2004]. Mice with Rb translocation chromosomes exist in nature [Nachman and Searle, 1995; Gazave et al., 2003], and these translocations are also common in some laboratory mice. In nature, whenever they occur in hybrid zones, the mice that are Rb translocation chromosome carriers often display reduced fertility. This is due to reduced chiasmata formation and meiotic recombination leading to spermatogenic impairment when mating with non-carriers or carriers of different types of Rb chromosomes [Bidau et al., 2001; Merico et al., 2003]. Rb chromosomes contribute to non-disjunction and to transmission ratio distortion (TRD) [Underkoffler et al., 2005; Schulz et al., 2006].

End-to-end fusions of human acrocentric chromosomes generate human Robertsonian (Rb) translocation chromosomes. Rb translocations in humans constitute the most common structural genetic abnormalities in aborted fetuses and newborns [Jacobs, 1981; Nielsen and Wohler, 1991; Kim and Shaffer, 2002]. Moreover, human Rb translocation chromosomes have been found as acquired or constitutional genetic lesions in hematological cancers [Qian et al., 2002; Welborn, 2004], in solid tumors [Padilla-Nash et al., 2001; Bayani et al., 2003], and at the onset of acute myelogenous leukemia [Shimokawa et al., 2004].

Cancer cells follow evolutionary principles when they develop into highly malignant tumors. Work by Darai et al. [2005] illustrates this in that the breakpoints in human tumors from chromosome 3p21.3 region coincides with the evolutionary breakpoints seen in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Fugu rubripes*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Canis familiaris*. CER1, a 2.4 Mb region at 3p21.3, shows breakpoints clustered within 200 kb of the telomeric and centromeric borders. The frequent involvement of centromeric regions in genomic instability of cancers is also discussed in a recent review by Bayani et al. [2007]. Examples for such

centromeric involvement is seen in prostate cancer [Beheshti et al., 2000; Vukovic et al., 2007] and osteosarcomas [Bayani et al., 2003].

It is evident that centromeres are dynamic structures that permit evolutionary remodeling of chromosomes, and that facilitates speciation. The centromeres are also substrates for rearrangements that are associated with structural genetic abnormalities in cancer where, in the same fashion as evolution, selection occurs at the cellular level in an accelerated fashion.

Centromeric Nucleosomes

Mammalian centromeres are defined based on their epigenetic higher order chromatin organization [Taddei et al., 2001]. The centromeres of all species examined to date have a universal histone composition consisting of CENP-A (CenH3), a histone H3 variant, histone H4, histone H2A and H2B [Dalal et al., 2007]. Centromeric histones do not contain the usual histone H3 but the CENP-A (CenH3) [Dalal et al., 2007]. The centromeric nucleosome organization is also unique in that its histones do not show an octamer organization but rather form a hemisome with one molecule each of CENP-A, H4, H2A, and H2B [Dalal et al., 2007]. The histone variant H2A.Z is found interspersed in between subdomains of CENP-A [Greaves et al., 2007]. Orthaus et al. [2008] recently illustrated the association of CENP-A and CENP-B in living human cells using fluorescence resonance energy transfer (FRET), a technique that allows one to visualize the close association of target molecules that are found in the vicinity of 10 nm.

Functional Studies Addressing the Role of Specific Proteins in Centromere Biology, Cell Division and Development

Functional understanding of centromeric histones, the role of the securing-separase complex and of epigenetic modifications at the centromere is due to specific mouse models that addressed the role of centromeric histones in the context of a living organism. As well, study of a rare human syndrome, ICF (immunodeficiency, centromere instability, facial abnormalities), helped to elucidate the crucial role of epigenetic modifications at the centromere for normal cellular functions and development.

CENP-A, CENP-B, and CENP-C Functions

Using gene targeting, Howman et al. [2000] describe that CENP-A^{-/-} mice do not survive

beyond embryonic day E6.5, while CENP-A^{-/+} mice are viable and fertile. CENP-A^{-/-} embryos displayed mitotic problems such as the formation of micro- and macronuclei, chromosome hypercondensation, nuclear bridges, and blebbing with chromatin fragmentation. In the absence of CENP-A, CENP-B and CENP-C are dispersed throughout the nucleus and are not localized at centromeres. Using a partially functional CENP-A GFP fusion protein, Kalitsis et al. [2003] confirmed that CENP-A is required for embryonal development. CENP-A-GFP homozygote mice die at day E10.5 of embryonic development showing much aneuploidy, mis-segregation of chromosomes and increased apoptosis [Kalitsis et al., 2003]. In this context, Black et al. [2004] showed that CENP-A confers a unique structural rigidity to the centromeric nucleosome. The disruption of CENP-B is not lethal, but mice with disrupted CENP-B have lower body and testis weight [Hudson et al., 1998]. CENP-C heterozygous mice are fertile and viable however, CENP-C null mice are not viable. Developmental problems including mitotic arrest, morphological degeneration, micronuclei and aberrant chromosome segregation patterns that become apparent at the morula stage [Kalitsis et al., 1998]. Recent data from Shen et al. [2007] indicated that mutations in PTEN prevented the normal physical association with CENP-C and this caused centromere instability resulting in centromere breakage and chromosomal translocations.

The Separase/Securin-Complex and Centromeric Division

Kumada et al. [2006] addressed the functional importance of mammalian separase and securin proteins for cell division and found that separase is required for the early development of mice. In the absence of separase, centromeres are unable to separate in mitosis and remain continuously linked in interphase. Karyotype analysis showed that two to four chromatids were linked at the centromere. Because these were all derived from the inability of the centromeres to separate, all centromerically clustered chromosomes contained either diploid or quadruple copies of the same chromosome. Heterozygous separase mice are viable, but separase null mice stop their development at day E3.5. Culture of 1–3 day blastocytes indicated that the overall cell number in separase^{-/-} blastocytes was lower,

and that the size of individual cells was twice that of separase heterozygous mice. Moreover, the absence of separase induced increased ploidy, aberrant numbers of centrosomes, and growth retardation. When homozygous securin^{null/null} mice, which is not lethal, were crossed with heterozygous securin^{null/+} separase^{null/+} mice the securin^{null/null}separase^{null/+} combination was embryonically lethal.

Centromeric Fusions in the Immunodeficiency, Centromeric Region Instability, Facial Anomalies (ICF) Syndrome

ICF is a rare recessive genetic disorder [Choo, 1997] with only 50 reported cases throughout the world [Ehrlich et al., 2006]. This immunodeficiency and chromosome instability syndrome is generally lethal before adulthood due to epigenetic changes. The identification of mutations in DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) located on chromosome 20q11-13 by Xu et al. [1999] led to the mechanistic understanding of the disease. In ICF syndrome, the centromeric satellites are almost completely unmethylated in all tissues, whereas these regions are heavily methylated at cytosine residues in normal cells [Xu et al., 1999]. Thus, the absence of a functional DNMT3B methyltransferase causes the elongation of juxtacentromeric heterochromatin. In metaphase, such defects give these chromosomal regions a thread-like appearance. In interphase cells, these regions show self-associations. Blebs and micronuclei containing these sequences are also common. Chromosomal abnormalities are most common for the classical satellites 2 and 3 at the juxtacentromeric regions of chromosomes 1, 9, and 16. These three chromosomes are frequently fused to each other in centromeric clusters.

Hypomethylation of Centromeric Alpha Satellite Regions in Cancer

Cancer cells frequently display hypomethylation of satellite regions, and this is commonly associated with rearrangements in these regions [Qu et al., 1999a,b; Ehrlich et al., 2006]. Hypomethylation of satellite 2 DNA is found in ovarian cancers including cystadenomas, low malignant potential tumors and epithelial carcinomas [Qu et al., 1999a]. The authors reported a statistical correlation between the extent of hypomethylation and the degree of malignancy. The study by Widschwendter et al.

[2004] examined DNA methylation and ovarian cancer (115 ovarian tumors) and found that hypomethylation of satellite 2 of chromosome 1 increased from non-neoplastic to neoplastic tumors with poor prognosis. Fifteen 5' regions of genes implicated in ovarian cancer were also examined. They found hypermethylation of CDH13 (16q24) and RNR1 (13p12) were strongly correlated with hypomethylation of satellite 2 DNA. Another example is in Wilm's tumor, where there are rearrangements in hypomethylated pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1 and 16 with classical satellite 2 DNA [Qu et al., 1999b]. All of the above findings are highly relevant for our understanding of aberrant methylation at centromeric regions and the consequences thereof. These data, however, have to be viewed in the context of global genomic changes in methylation patterns—and epigenetic changes in general—during carcinogenesis [Virmani et al., 2001; D'Alessio and Szyf, 2006; Esteller, 2007].

NEOCENTROMERES

Neocentromeres are functional centromeres that are situated at non-centromeric regions and they are able to assemble a functional kinetochore [Amor and Choo, 2002]. The first neocentromere was described by du Sart et al. [1997], and since then another 60 examples of neocentromeres have been characterized [Amor and Choo, 2002]. In a study that focused on greater than 20 functionally important kinetochore-associated proteins, Saffery et al. [2000] showed that all proteins investigated but one, CENP-B, are present at both centromeres and neocentromeres. CENP-B is thus missing at neocentromeres. Neocentromeres do not carry alpha-satellite DNA [Amor and Choo, 2002] and they are frequently found on marker chromosomes in cancer. They can also be experimentally induced in *Drosophila* (ibid.). Occasionally, neocentromeres are observed in individuals with stable karyotypes [Amor and Choo, 2002; Amor et al., 2004; Ventura et al., 2004]. They can play an important role for chromosome and karyotype evolution [Amor et al., 2004; Warburton, 2004].

An example in karyotype evolution is a neocentromere located at chromosome 4p21.3 [Amor et al., 2004]. The family that carries this neocentromere has transmitted it to the second generation and shows a normal and stable karyotype. The normal centromere on chromo-

some 4 is inactivated. The neocentromere is fully functional in binding CENP-A, CENP-C, CENP-E, and CENP-I, Bub1 and HP1, a Swi6 homologue. However, the levels of CENP-A are reduced and a moderate reduction in sister chromatid cohesion was noted suggesting the possibility of subtle structural and functional differences between the neocentromere and the normal centromere. Ventura et al. [2004] reported on two human neocentromeres. The one found at 3q26 is a chromosomal region where a new centromere evolved from a common ancestor of Old World Monkeys about 25–40 million years ago. The other neocentromere was found at 3q24 with inactivation of the normal centromere and this new chromosome 3 was stably transmitted to the next generation.

Centromeres and the Nuclear Matrix

Are centromeres freely moving through the nucleus or are they attached to some nuclear structure in a regulated fashion?

He and Brinkley showed in [1996] that individual centromeres/prekinetochores form stable associations with the nuclear matrix. They proposed that the arrangement of individual centromeres within the nucleus may have influenced the occurrence of specific fusion and translocation events during evolution. In addition, they speculate that this centromere/kinetochore complex may play a role during chromosome movements and associations in the interphase nucleus. Sumer et al. [2003] described, tested and confirmed a 2.5 Mb region with enhanced scaffold/matrix attachment properties at a human neocentromere. Thus, we conclude that centromeres have the potential to attach to the nuclear matrix. Whether they attach to it all the time or only during specific phases of the cell cycle is presently not known.

Nuclear Organization of Centromeres During the Cell Cycle

The three-dimensional (3D) organization of centromeres in the interphase nucleus has been studied in the context of cellular differentiation, cell cycle, embryonic development, and cellular transformation. Studying human diploid fibroblasts using anti-centromere antibody staining and laser scanning confocal microscopy, Bartholdi [1991] described that centromere positions vary during the cell cycle. In G1, the

author describes centromeres associated with nucleoli or fused in chromocentres, with very few single centromeres. The latter are dispersed throughout the nucleus. In S phase, the fused centromeres dispersed into single centromere signals and formed distinct patterns (rings or lines). In prophase, the fluorescent centromere signals were found to condense into distinct double spots.

The analysis of human lymphocytes [Weimer et al., 1992] also indicated a cell-cycle specific organization of centromeres in the interphase nucleus. Using anti-centromere antibodies (ACAs) from patients with CREST syndrome, these authors described a peripheral positioning of centromeres in G₀ and G₁, which weakened in S phase. G₂ cells had a random distribution of centromeres.

Solovei et al. [2004] investigated a series of human cell types and found differences in centromere positions in cycling and postmitotic cells. The cells they examined included G₀ peripheral blood lymphocytes, terminally differentiated monocytes, cycling, PHA-stimulated lymphocytes, diploid lymphoblastoid cells, normal fibroblasts, and neuroblastoma (SH-EP) cells. They used immunostaining, confocal microscopy and 3D image analysis and observed that the localization of the centromeres was similar in all cell types, with a peripheral location in G₀ cells. In G₁ and early S, the centromeres were found in clusters at the periphery of the nucleus, in late S/G₂, the centromeres declustered and migrated towards the center of the nucleus.

Our work [Sarkar et al., 2007] described the 3D organization of centromeres in mouse lymphocytes during the cell cycle. We found centromere localization is cell cycle dependent. The centromeres were mainly found in the peripheral regions in G₁- and G₂-arrested lymphocytes whereas a more general distribution throughout the nucleus was found during logarithmic growth. To measure the 3D organization of centromeres, we developed a software program, named CentroView [Sarkar et al., 2007]. We used a 3D-centromere FISH approach rather than the anti-centromere fluorescent immunohistochemistry. Image acquisition was performed using deconvolution microscopy [Schaefer et al., 2001] and Zeiss AxioVision on an Axioplan 2 microscope (Zeiss). Sampling sizes were 200 nm in *z* and 107 nm in *x* and *y* axes.

From the data presented above, we concluded that there is agreement of cell-cycle dependent centromere distribution in interphase nuclei of all human and mouse cells examined so far. It is important to note that a cell-type specific centromere organization has also been described in plants. Work by Fang and Spector [2005] showed by live cell imaging of centromere-specific histone H3-GFP, that centromeres of transgenic Arabidopsis lines are positioned at the nuclear periphery during interphase. The position of duplicated sister-centromeres is cell-type dependent. They are found clustered in root epidermal cells and dispersed in leaf epidermal cells.

Differentiation and Distribution of Centromeres in the Interphase Nucleus

Beil et al. [2002 and 2005] studied the organization of centromeres during differentiation of the promyelocytic leukemia cell line NB4. The authors used the CREST serum to stain centromeres and confocal microscopy to assess centromere positions. Induction of differentiation by retinoic acid in NB4 cells induces an alternative nuclear distribution of centromeres compared with undifferentiated cells. The differentiated cells exhibited a decreased number of centromere clusters (chromocentres) and the distance between them increased from 350 to 800 nm.

Differentiating mouse T cells display an altered organization of centromeres when compared to their non-differentiated counterparts [Kim et al., 2004]: While undifferentiated cells have centromeres localized within the nuclear interior, differentiated CD4⁺ and CD8⁺ T cells have their centromere positioned more to the periphery. Similarly, human embryonic stem cells have a smaller portion of their centromeres located at the nuclear periphery compared with differentiated cells [Wiblin et al., 2005].

We conclude that differentiation requires altered nuclear centromere positions which may be linked to the global remodeling of nuclear functions during this process such as changes in transcription of genes and cessation of replication. The nuclear periphery seems to be the preferred region occupied by centromeres when cells differentiate. This is also the preferred position of centromeres in G₀ and G₁ cells (see above) and thus probably the position that is most conceivable with a resting and end-stage differentiated cells.

Remodeling of Centromere Positions During Mouse Embryogenesis

Mouse embryos remodel their nuclear organization as they progress from the one-cell-stage to the blastocyst stage of embryonic development. This remodeling includes both the centromeres and the pericentric heterochromatin [Martin et al., 2006a]. Martin et al. [2006b] also showed nuclear remodeling during nuclear transfer. During early embryonic development, after the transfer of ES cell chromosomes into mouse ooplasm, centromeres adopted the same nuclear organization as seen in normal mouse embryos.

Remodeling of Centromere Positions During Cellular Transformation

Centromere repositioning in the interphase nucleus contributes to the remodeling of the nucleus when cells become transformed. There is a significant redistribution of centromere positions in nuclei of immortalized and transformed lymphocytes as compared with normal nuclei [Sarkar et al., 2007]. While centromeres of normal mouse lymphocytes assume a peripheral position in interphase nuclei, those of tumor cells redistribute towards

a more central nuclear position (Fig. 2). These changes are highly significant [Sarkar et al., 2007]. The remodeling of centromere positions can be induced through conditional c-Myc oncoprotein expression in otherwise diploid mouse PreB lymphocytes and is dependent on the *myc box II* region [Guffei et al., 2007]. The remodeling of centromere positions enables the development of mouse Robertsonian (Rb) translocation chromosomes after conditional c-Myc deregulation [Guffei et al., 2007]. The latter are also observed in cells with constitutive c-Myc deregulation [McCormack et al., 1998; Guffei et al., 2007].

Centromeres and their pericentric regions are evolutionary dynamic. These features strongly enhance the likelihood that spatially repositioned centromeres can then interact with each allowing increased recombination, breakage and fusion events. We conclude that centromere remodeling during cellular transformation may permit the occurrence of specific chromosomal rearrangements and favor new gene expression and replication profiles as centromeres (and thus chromosomes and their respective genes) are more frequently localized in the nuclear interior. The nuclear interior regions are associated with both transcription

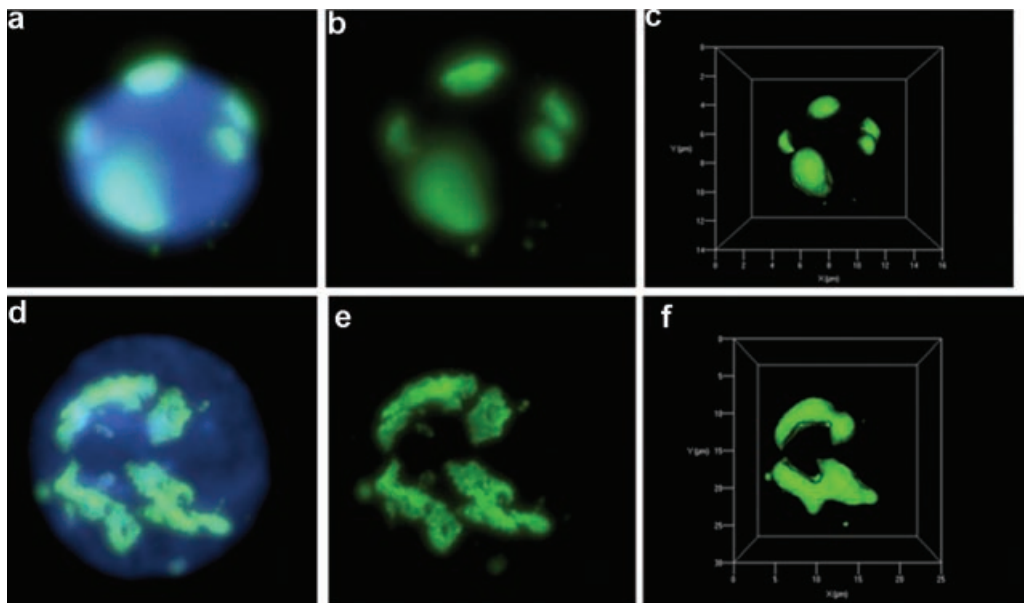


Fig. 2. Nuclear organization of centromeres in normal and tumor cells. The peripheral organization of centromeres (green) in normal mouse lymphocyte nuclei (blue) is shown in a–c. Two-dimensional (2D) images of normal nuclei and centromeres are shown in (a) and (b), and the three-dimensional (3D) organization of centromeres is shown in (c). The nuclear organization of

centromeres (green) in mouse tumor cell (plasmacytoma) nuclei (blue) are shown in figures (d–f). Representative 2D images are given in (d) and (e), and the 3D representation of the same nucleus is shown in (f). Note the peripheral organization of the centromeres in normal cells and the central location in tumor cells [for details, see text and Sarkar et al., 2007].

and replication [Casolari et al., 2005; Lanctôt et al., 2007].

It is too early to say whether the nuclear matrix interactions with centromeres are altered during centromere remodeling or whether the methylation status of the centromeric regions is altered under these conditions. It is also important to assess whether centromere remodeling occurs during cellular transformation of different cell lineages. This would allow one to conclude whether or not centromere remodeling is a general phenomenon of cellular transformation or just applicable to the transformation of lymphocytes. It is most important not to gather a series of different tumor cell lines to answer this question, but to work with primary cells of different lineages and follow them as they are transformed. Only a rigorous approach in the selection of appropriate model systems will give us the answers to the above questions.

Treatments Targeting the Centromere and Cell Division Cycles

Due to the key role of centromeres in normal cell division and in cancer, it is not surprising that much effort is and has been devoted to inhibiting centromere function. The concept behind these approaches is that a non-functional centromere/kinetochore will induce a cell cycle checkpoint and thus inhibit the spread of malignant cells.

There are general approaches, such as the use of taxanes and vinca alkaloids that target the microtubules [Kelling et al., 2003]. However, Schmidt and Bastians [2007] noted that the targeting of mitosis also affects non-cancerous cells and thus has significant side effects. Thus novel anti-mitotic drugs that target non-microtubule structures, such as mitotic kinesins and Aurora or polo-like kinases, are being tested in clinical trials as well [Liu et al., 2006; Strebhardt and Ullrich, 2006; Schmit and Ahmad, 2007; Schmidt and Bastians, 2007]. Mitosis is also being targeted by inhibitors of farnesyl transferase, histone deacetylase and Hsp90 [for review, see Sudakin and Yen, 2007].

Several recent studies have looked at the effects of inhibiting histone deacetylation (HDAC) on centromere function and cell division. Taddei et al. [2001] investigated the impact of histone deacetylase inhibition on the disruption of pericentromeric heterochromatin and on centromere function. The authors found

that pericentromeric regions will relocate to the nuclear periphery. HP1 is not retained at the centromere and defects in chromosome segregation occur. This process is reversible when the drug is removed [Taddei et al., 2001]. The authors concluded that underacetylation of pericentromeric heterochromatin is necessary for centromere function and localization within the nucleus. Moreover, HP1 will only associate with heterochromatin when the pericentromeric region is underacetylated. Of note is the finding of Gilchrist et al. [2004], who did not observe a relocation of centromeres by the inhibition of histone deacetylases. The reason for these different results is not known at this time.

In a recent study, Magnaghi-Jaulin et al. [2007] showed that inhibition of HDAC causes premature sister chromatid separation in cells when the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC) is already activated. As a result, SAC and the cyclin-dependent kinase 1 are inactivated, histone H3 dephosphorylated and MAD2 is lost from the kinetochore [Magnaghi-Jaulin et al., 2007].

Sumer et al. [2004] described that the inhibition of histone deacetylases led to a shift in binding of CENP-A and a reduced size of the scaffold/matrix attachment region (S/MAR) both at a neocentromere and at a native centromere. Treatment with DNA-intercalating drug distamycin A further reduced the S/MAR domain and centromere proteins binding and increased chromosome mis-segregation. These treatments did not alter the transcriptional competence for 47 underlying genes tested by the group.

A word of caution: while the goal of mitosis and centromere targeted therapies is to disrupt further cell divisions of aberrant cells, some of these treatments will affect normal cells, while others will select for "survivors" that manage to escape the treatment regime and will exit mitosis. Such cells are expected to be aneuploid and highly malignant. Thus, while the concept of inhibiting mitosis is excellent, the consequences of generating a few survivors is detrimental, unless a combination treatment can be sought that will target such cells as well.

Treatments Targeting the Centromere–Matrix Interaction

As summarized above, there is experimental evidence for a centromere–matrix interaction

[He and Brinkley, 1996; Sumer et al., 2003]. Is it possible to use this interaction to inhibit cell division in tumor cells? First, the nature of the interaction of the centromere with the nuclear matrix in cancer cells needs to be investigated. Since centromeres alter their positions in cancer cells [Sarkar et al., 2007] with consequences for genome stability [Guffei et al., 2007], it is likely that the associations of centromeres with the matrix is dynamic and an adaptable event. In other words, centromeres can be altered and possibly modulated according to the selective pressures under which a transformed cell finds itself. Since there is a precedence for a reduced size of the centromere-associated S/MAR [Sumer et al., 2004], therefore centromere attachment to the matrix may be less stable in transformed cells. Although the attachment of the centromere may be different in nature, cell division still continues. Moreover, the new organization of the centromeres is not concordant with that of a resting or differentiated cell and is different from that of a cycling cell [Sarkar et al., 2007]. The novel nuclear compartmentalization of centromeres in transformed cells may allow for new targeted treatments. This will only be possible after we learn more about the altered interaction of centromeres with the nuclear matrix in cancer cells.

Several lines of evidence suggest that the nuclear matrix may be a good substrate for anti-cancer therapies. For example, Pienta and Lehr [1993] demonstrated that estramustine, an estradiol-nitrogen mustard conjugate that binds to the nuclear matrix, and etoposide, a topoisomerase II inhibitor showed promise in treating hormone-refractory prostate cancer cells. DNA synthesis at the nuclear matrix was inhibited and tumor cell growth was inhibited *in vitro* in the Mat-LyLu rat prostate carcinoma cell line, the PC-3 human prostate adenocarcinoma cell line and *in vivo* in the Dunning Copenhagen rat adenocarcinoma prostate model. Estramustine has been part of phase II clinical trials and used in combination with other drugs for androgen-independent prostate cancer [Clark et al., 2001; Millikan et al., 2003; Dimopoulos et al., 2004; Thall et al., 2007]. Catapano et al. [1996] have discussed the possibility of using the nuclear matrix as target for anti-cancer therapy. Roti et al. [1998] promote the concept of hyperthermic killing of cancer cells by targeting the matrix and this

notion was further promoted by Coffey et al. [2006].

It may be feasible to target CENP-A, a component of the centromeric nucleosome that is not found in the nucleosome of other chromosomal regions [Dalal et al., 2007].

As we learn more about nuclear matrix association with chromosomes and centromeres, it may be feasible to design specific treatments that target this interaction in a way that renders cell division impossible. The best approaches may be those that succeed to target only cancer cells, using the cancer-cell restricted expression of inhibitors, cancer-cell restricted delivery of small molecules [Sun et al., 2008; Tyler et al., 2007] and/or intrabodies [Williams and Zhu, 2006] that target any of the centromere–matrix and mitotic machinery-associated components within the cancer cell.

Imaging Considerations for the Centromere

The study of the nuclear organization of centromeres is now possible due to recent advances in imaging techniques. To enable the detailed analysis that such complex structures require, a variety of measurement methods are generally applied. In this section, we provide a short overview of the most commonly used methodologies that have already led to significant discoveries in the field and describe other methods that will have potential application for future refinement of analysis.

CONVENTIONAL FLUORESCENCE MICROSCOPY

Fluorescence microscopy has grown to become a central tool for imaging centromere organization within the nucleus. However, there are still limitations that should be well understood. To date, the most common optical microscopy methods are based on wide-field or confocal microscopy. These methods provide a spatial resolution of about 200–250 nm in the image plane and 400–500 nm along the optical axis [Garini et al., 2005]. Both methods provide the ability to measure the three dimensional nucleus by acquiring set of images at different focal planes. This has become an established technique for investigating the structural and functional characteristics of cells [Wolf, 2007]. With the development of high-efficiency detectors based on charged coupled devices (CCD) cameras, it is possible to observe even single fluorescent molecules in the nucleus [Xie et al.,

2006]. Since centromeres are larger structures, each can be labeled with many fluorescent molecules. It can therefore be observed with very short exposure times that minimize photobleaching and phototoxicity and allow imaging for very long periods of time when live-imaging is performed [Stephens and Allan, 2003; Elf et al., 2007]. Additionally, these methods provide the ability to detect multiple centromeres simultaneously. This is possible due to spectral and color imaging methods that now allow the simultaneous detection of many probes [Bolzer et al., 2005; Garini et al., 2006].

The use of microscopic techniques for quantitative assessment of centromere distribution requires careful data analysis. Imaging systems introduce blurring effects of the true signals, creating artificially expanded representation of the signals. This blurring is due to the physical limitations of the optical microscope and it is governed by the blurring function called the point spread function (PSF) of the system [Garini et al., 2005]. This has particular relevance when centromeres are close to each other or when aggregates of centromeric DNA are formed. In these cases, the collective signal from each aggregate result from the summed effect of the signal from all labeled DNA in the aggregate. When two aggregates are spatially adjacent, the artificially blurred regions from each can overlap and sum to create regions of signal intensity that are typically only slightly less than the signal intensity observed within the aggregates themselves, creating the appearance that the two aggregates actually collectively form a larger aggregate [Sarkar et al., 2007]. If the metric used to assess centromere distribution is sensitive to aggregates, it is important that controls be used to characterize these effects, which should then be incorporated into the analysis.

One method of avoiding misclassification of aggregates due to blurring is to use a multi-level thresholding approach [Sarkar, 2007]. In such an approach, primary segmentation of distinct centromere regions can be performed using an automatic thresholding technique such as the Isodata algorithm [Ridler and Calvard, 1978]. To separate artificially connected regions, a second threshold is then applied based upon a user-given parameter expressed as some multiple of the original threshold. This parameter requires calibration based upon the imaging system and deconvolu-

tion parameters used, and is set based upon visual agreement of the observed region separation by the user. Blurred regions will fall below the appropriate threshold while the majority of signal from the aggregates will remain above. Once the regions have been separated at the higher threshold, a signal is assigned to each region that is proportional to its relative contribution to the artificially connected region observed at the lower threshold. In this way, the approach allows for accurate region separation without introducing bias into the quantification of region intensities. However, it is important to note that the technique is ineffective if the blur effects are extensive enough to cause the artificial connections to have intensity values similar to those observed within the regions themselves.

Structural differences between samples must also be considered. Analysis of spatial distribution may be performed using concentric shells between the nuclear center and boundary, for example, describing the position of each centromere signal by their radius along the line connecting the nucleus center and the boundary (Fig. 3). Such methods have been successfully used [Wiblin et al., 2005]; however, their validity relies on consistency between the inherent assumptions about nuclear geometry and the physical geometry of the samples. Depending upon the preparation and physical processing involved, samples may vary widely in physical geometry, and alternative methods that are independent of such differences may be needed. One solution is to determine the center of each segmented region (weighted by intensity), and determine the position of each center along a radial line projected from the nuclear center to the nuclear boundary (Fig. 4) [Sarkar, 2007]. In studying centromere distribution across multiple samples, this position may be expressed as a percent distance from the nuclear center, where 100% represents the nuclear periphery. For each sample, the sum of the background-corrected intensities off all pixels within each region may then be divided by the total sum of these intensities across all regions in the image, resulting in a normalization of the total signal intensity for each sample to a total of 1, and the total intensity in each observed centromere region being expressed as a fractional amount representing its contribution to the total signal intensity. Such normalization ensures that larger

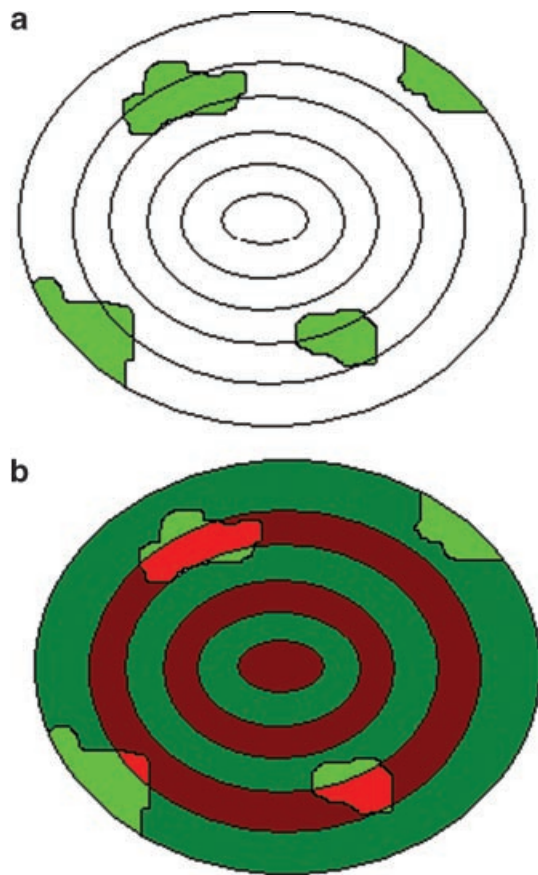


Fig. 3. Illustration of a concentric shells approach. **a:** The nuclear territory is divided into several concentric shells, each at a fixed radial distance. **b:** Centromere signal in each shell is measured and binned as appearing at the known radial distance of the shell. Centromere signal regions spanning multiple shells are divided amongst the shells proportionately.

segmented regions that comprise multiple centromeres are represented with respect to their proportional signal output, as opposed to being equated with smaller regions composed of fewer or single centromeres. In addition, data may then be directly combined across samples in order to observe spatial distribution trends, since each sample is normalized to the same standard. This method thus allows for effective estimation of spatial distribution without making assumptions about nuclear shape.

The dependence of the final data on image analysis algorithms to account for such issues represents a current challenge for the standardization of fluorescence microscopy as a tool for quantitative assessment of the organization of centromeres. To this end, efforts should always be made to establish relationships

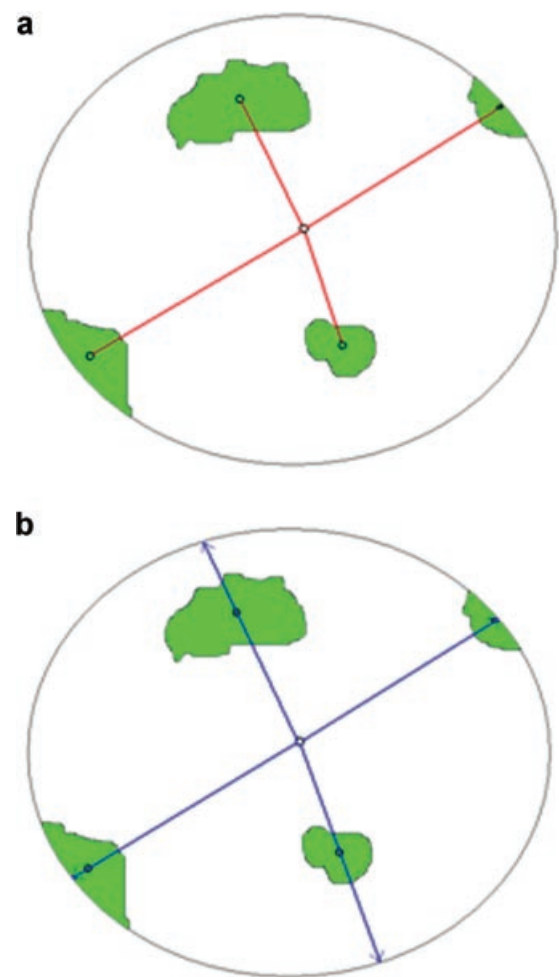


Fig. 4. Illustration of a radial projection approach. **a:** The center of mass of each centromere signal region is determined, after which the lengths of the radial arms from the nuclear center to each center of mass is calculated. **b:** Each radial arm is then further projected to the nuclear boundary, and the radial distance of the signal region is calculated relative to the nuclear boundary.

between the parameters of the imaging system and the analytic parameters used in the assessment of the images, and should be applied towards the development of standardized imaging protocols and analysis methods. Without such standardization, it is difficult to compare data across studies since the variation in methods will be represented in the data as well. Developing such standardized techniques demands a strong understanding of the imaging system and underlying physical factors in order to develop appropriate processing and analysis algorithms that will allow reliable and valid conclusions to be drawn from the data.

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET) MICROSCOPY

FRET is a powerful technique for studying molecular interaction in single cells [Rieder and Khodjakov, 2003; Rheenen et al., 2004; Orthaus et al., 2007]. This method provides signal sensitivity to intra- and intermolecular distances in the 1–10 nm range with a spatial resolution that significantly overcome that seen in typical conventional optical microscopy [Jares-Erijman and Jovin, 2003]. Also, it allows *in vivo* and *in vitro* measurements of protein–protein interactions within cells [Chen et al., 2007]. In a recent study using FRET it was confirmed that the two kinetochore proteins CENP-A and CENP-B were colocalized *in vivo* at centromeres [Orthaus et al., 2007].

The major approaches used to assess FRET are based on emission measurement and on acceptor photobleaching [Berney and Danuser, 2003]. The quantitative estimation of the observed signals could be made by determination of the FRET index or the transfer efficiency, however a direct comparison between results obtained with different indices can be difficult [Berney and Danuser, 2003]. The one essential requirement for stable FRET measurement is strong spectral overlap of the donor and acceptor and this introduces substantial background in the registered signals [Berney and Danuser, 2003; Chen et al., 2007]. The other major sources of background noise that should be considered are autofluorescence, detector noise, spectral sensitivity variation in both acceptor and donor channels [Chen et al., 2007].

Novel High Resolution Optical Microscopy Methods

In the last few years, there have been successful developments of a number of high resolution methods that overcome the traditional optical diffraction limit. Each of these methods uses a different physical and optical principle and an excellent spatial resolution of 50 nm and better is achieved [Garini et al., 2005]. One of these methods, photo-activated localization microscopy PALM measures small well-apart fluorescent probes and registers the intensity at the center of the PSF. When many images are measured and registered, a high-resolution image emerges [Betzig et al., 2006; Patterson et al., 2007]. To ensure the coverage of the whole object volume, the fluorescent probes

are turned on and off by photoactivation. At this time the method is extremely slow, but has the potential to become faster in the future. Another method is saturation emission depletion (STED) that makes use of a nonlinear depletion effect of an excited spot such that a very small volume at the center of the excited spot is fluorescent, when scanning the image point-by-point, a high resolution image is achieved [Hell, 2003; Westphal et al., 2003]. A third method is structured illumination microscopy, in which two powerful integrating beams of light forms a structured light illumination with a well-defined interference pattern. Measurement of a few images and correct analysis of the data results in an improved resolution. When nonlinear effects are combined with the interference pattern, an even better resolution is achieved [Gustafsson, 2005]. These methods will surely enable the study of high-resolution optical microscopy of centromeres in the nucleus.

Alternative Methods for Centromere Organization Measurements

Alternative imaging modalities that may be used to study the organization of centromeres include techniques such as electron microscopy (EM) and synchrotron based transmission X-ray microscopy (TXM). Transmission electron microscopy (TEM) provides a resolution of ~2–8 nm [Ottensmeyer et al., 1978; Koster et al., 1997; Steven and Aebi, 2003] allowing the observation of fine structural details of the investigated samples. The thickness of the samples is a crucial parameter as the electrons are strongly scattered or absorbed rather than transmitted from the matter [Egerton, 2006], which limits the sectioning of the specimen (<0.5 μm). The propagation of the electron beam in a vacuum requires water from the sample to be removed or immobilized. The cryofixation methods for specimen preparation such as high-pressure freezing and freeze-substitution offers preservation of the ultrastructure of the cells, which is close to their native state [McDonald, 2007]. The combination of tomographic imaging principles with TEM can allow 3D reconstruction of centromeres within the nucleus. The resolution of the reconstructed volume depends on the number of registered 2D projections, which are restricted by the specificity of the specimen holder and stage [Adam et al., 2005; Lebbink et al., 2007]. However, a suitable

compromise should be made between achieving higher resolution and radiation damage to the sample [Egerton et al., 2004; Lebbink et al., 2007]. To date the application of EM combined with serial section reconstructions to centromere studies confirms the importance of centromere geometry for mitosis. It has been shown that the shape of the centromere can be a major factor in spindle formation, as the proper centromere organization promotes bipolarity [Loncarek et al., 2007].

The measurement techniques relayed by synchrotron based transmission X-ray microscopy (STXM) offer a good agreement between resolution, thickness of the investigated specimen and accumulated structural damage. In the spectral region of 2.34–4.38 nm, the so-called “water window” between the absorption edges of carbon and oxygen (corresponding to 284–543 eV), linear absorption coefficients of organic matter and water are significantly different [Meyer-Ilse et al., 2001; Adam et al., 2005]. Thus, the measurement of whole, hydrated cells (up to 10 μm) without any chemical fixation for contrast enhancement is possible [Weis et al., 2000; Meyer-Ilse et al., 2001; Paunesku et al., 2006]. The cellular architecture and different cell organelles are registered in close to their native stage, and the application of markers (conjugated gold colloids) allows identification of specific targets of interest in the cell [Gros et al., 2005]. The reported resolution down to 30 nm, together with the possibility of 360° tomographic measurement and golden nano-particles labeling [Weis et al., 2000; Larabell and Gros, 2004] will allow for high precision 3D reconstruction for the study of the nuclear organization of centromeres in the future.

CONCLUSIONS

Centromeres are unique chromosomal structures that permit proper chromosome segregation. They are evolutionary hotspots, carry unique centromeric chromatin and a specific nucleosome organization. The pericentric regions contribute to genomic plasticity during speciation and disease. The nuclear positions that centromeres occupy during embryonic development, differentiation, cell cycle, and transformation are key to functional requirements of the cell that require further elucidation. Future work will further examine the interplay of centromere

topology and function during development, differentiation and tumorigenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Thomas Cremer and Dr. Francis Wiener for discussions. Salary support for AGS, RS, JH was through the CIHR Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training,” JH was also supported through the Komen Foundation for Breast Cancer. AG salary support is through funds from the National Cancer Institute of Canada. SM and MM’s research funding is from the National Cancer Institute of Canada with funds from the Canadian Cancer Society and from the CancerCare Manitoba Foundation; YG’s research was partially supported by the Israel Science Foundation—FIRST Program.

REFERENCES

- Adam J-F, Moy J-P, Susini J. 2005. Table-top water window transmission x-ray microscopy: Review of the key issues, and conceptual design of an instrument for biology. *Rev Sci Instrum* 76:091301.
- Alkan C, Ventura M, Archidiacono N, Rocchi M, Sahinalp SC, Eichler EE. 2007. Organization and evolution of primate centromeric DNA from whole-genome shotgun sequence data. *PLoS Comput Biol* 3(9):1807–1818.
- Amor DJ, Choo KH. 2002. Neocentromeres: Role in human disease, evolution, and centromere study. *Am J Hum Genet* 71(4):695–714. Epub 2002 Aug 26. Review.
- Amor DJ, Bentley K, Ryan J, Perry J, Wong L, Slater H, Choo KH. 2004. Human centromere repositioning “in progress”. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(17):6542–6547. Epub 2004 Apr 14.
- Anelli L, Albano F, Zagaria A, Liso A, Cuneo A, Mancini M, Liso V, Rocchi M, Specchia G. 2005. Pericentric chromosome 8 inversion associated with the 5’RUNX1/3’CBFA2T1 gene in acute myeloid leukemia cases. *Ann Hematol* 84(4):245–249. Epub 2004 Nov 16.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. 2005. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: A review. *Cytogenet Genome Res* 111(3–4):297–304. Review.
- Bartholdi MF. 1991. Nuclear distribution of centromeres during the cell cycle of human diploid fibroblasts. *J Cell Sci* 99(Pt 2):255–263.
- Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA. 2003. Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36(1):7–16.
- Bayani J, Selvarajah S, Maire G, Vukovic B, Al-Romaih K, Zielenska M, Squire JA. 2007. Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 17(1):5–18. Epub 2006 Oct 26. Review.

- Beheshti B, Karaskova J, Park PC, Squire JA, Beatty BG. 2000. Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of prostate cancer cell lines by sequential giemsa banding and spectral karyotyping. *Mol Diagn* 5:23–32.
- Beil M, Dürschmied D, Paschke S, Schreiner B, Nolte U, Bruel A, Irinopoulou T. 2002. Spatial distribution patterns of interphase centromeres during retinoic acid-induced differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cytometry* 47(4):217–225.
- Beil M, Fleischer F, Paschke S, Schmidt V. 2005. Statistical analysis of the three-dimensional structure of centromeric heterochromatin in interphase nuclei. *J Microsc* 217(Pt 1):60–68.
- Beiraghi S, Zhou M, Talmadge CB, Went-Sumegi N, Davis JR, Huang D, Saal H, Seemayer TA, Sumegi J. 2003. Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene* 309(1):11–21.
- Berney C, Danuser G. 2003. FRET or No FRET: A quantitative comparison. *Biophys J* 84:3992–4010.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313:1642–1645.
- Bidau CJ, Giménez MD, Palmer CL, Searle JB. 2001. The effects of Robertsonian fusions on chiasma frequency and distribution in the house mouse (*Mus musculus domesticus*) from a hybrid zone in northern Scotland. *Heredity* 87(Pt 3):305–313.
- Black BE, Foltz DR, Chakravarthy S, Luger K, Woods VL, Jr., Cleveland DW. 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430(6999):578–582.
- Blitzblau HG, Bell GW, Rodriguez J, Bell SP, Hochwagen A. 2007. Mapping of meiotic single-stranded DNA reveals double-stranded-break hotspots near centromeres and telomeres. *Curr Biol* 17(23):2003–2012.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLOS Biol* 3:1–17.
- Boveri T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys Med Gesellschaft Würzburg* 35:67–90.
- Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fischer.
- Boveri T. 1929. The origin of malignant tumors. Translated by Marcella Boveri. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Bulazel KV, Ferreri GC, Eldridge MD, O'Neill RJ. 2007. Species-specific shifts in centromere sequence composition are coincident with breakpoint reuse in karyotypically divergent lineages. *Genome Biol* 8(8):R170.
- Capanna E, Castiglia R. 2004. Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenet Genome Res* 105(2–4):375–384.
- Casolari JM, Brown CR, Drubin DA, Rando OJ, Silver PA. 2005. Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev* 19(10):1188–1198.
- Catapano CV, Carbone GM, Fernandes DJ. 1996. The nuclear matrix as a target for cancer therapy. *Ann Oncol* 7(7):659–666. Review. No abstract available.
- Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP. 2007. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 13(1):55–59. Epub 2006 Oct 31.
- Chen Y, Mauldin JP, Day RN, Periasamy A. 2007. Characterization of spectral FRET imaging microscopy for monitoring nuclear protein interactions. *J Microsc* 228:139–152.
- Choo KH. 1997. Centromere DNA dynamics: Latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet* 61(6):1225–1233.
- Clark PE, Peereboom DM, Dreicer R, Levin HS, Clark SB, Klein EA. 2001. Phase II trial of neoadjuvant estramustine and etoposide plus radical prostatectomy for locally advanced prostate cancer. *Urology* 57(2):281–285.
- Coffey DS, Getzenberg RH, DeWeese TL. 2006. Hyperthermic biology and cancer therapies: A hypothesis for the “Lance Armstrong effect”. *JAMA* 296(4):445–448.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. 2006. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia* 38(4):122–127.
- Cremer T. 1985. Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer Verlag.
- Dalal Y, Furuyama T, Vermaak D, Henikoff S. 2007. Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(41):15974–15981. Epub 2007 Sep 24. Review.
- D'Alessio AC, Szyf M. 2006. Epigenetic tête-à-tête: The bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 84(4):463–476. Review.
- Darai E, Kost-Alimova M, Kiss H, Kansoul H, Klein G, Imreh S. 2005. Evolutionarily plastic regions at human 3p21.3 coincide with tumor breakpoints identified by the “elimination test”. *Genomics* 86(1):1–12.
- Darlington CD. 1936a. The external mechanisms of chromosomes. I—The scope of the enquiry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 121(No. 823):264–273.
- Darlington CD. 1936b. Misdivision and the genetics of the centromere. *J Genet* XXVII:341–364.
- Dimopoulos MA, Kiamouris C, Gika D, Deliveliotis C, Giannopoulos A, Zervas A, Alamanis C, Constantinidis C, Koutsilieris M. 2004. Combination of LHRH analog with somatostatin analog and dexamethasone versus chemotherapy in hormone-refractory prostate cancer: A randomized phase II study. *Urology* 63(1):120–125.
- du Sart D, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH. 1997. A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat Genet* 16(2):144–153.
- Egerton RF. 2006. Physical principles of electron microscopy. US: Springer.
- Egerton RF, Li P, Malac M. 2004. Radiation damage in the TEM and SEM. *Micron* 35:399–409.
- Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, Weisenberger DJ, Long T, Youn B, Fiala ES, Laird PW. 2006. Quantitative analysis of associations between

- DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene* 25(18):2636–2645.
- Elf J, Li G-W, Xie XS. 2007. Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science* 316:1191–1193.
- Esteller M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8(4):286–298. Epub 2007 Mar 6. Review.
- Fang Y, Spector DL. 2005. Centromere positioning and dynamics in living Arabidopsis plants. *Mol Biol Cell* 16(12):5710–5718. Epub 2005 Sep 29.
- Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Leipzig.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, Redi CA. 2001. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(1):171–175.
- Gardner RJM, Sutherland GR. 2004. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Cary, North Carolina, U.S.A: Oxford University Press.
- Garini Y, Vermolen BJ, Young IT. 2005. From micro to nano: Recent advances in high-resolution microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 16:3–12.
- Garini Y, Young IT, McNamara G. 2006. Spectral imaging: Principles and applications. *Cytometry* 69A:735–747.
- Gazave E, Catalan J, Ramalinho Mda G, Mathias Mda L, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, Auffray JC. 2003. The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* 81(1):33–42.
- Gilchrist S, Gilbert N, Perry P, Bickmore WA. 2004. Nuclear organization of centromeric domains is not perturbed by inhibition of histone deacetylases. *Chromosome Res* 12(5):505–516.
- Gourret JP. 1995. Modelling the mitotic apparatus. From the discovery of the bipolar spindle to modern concepts. *Acta Biotheor* 43(1-2):127–142.
- Greaves IK, Rangasamy D, Ridgway P, Tremethick DJ. 2007. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(2):525–530. Epub 2006 Dec 28.
- Gros MAL, McDermott G, Larabell CA. 2005. X-ray tomography of whole cells. *Curr Opin Struct Biol* 15:593–600.
- Grosso S, Pucci L, Farnetani M, Di Bartolo RM, Galimberti D, Mostardini R, Anichini C, Balestri M, Morgese G, Balestri P. 2004. Epilepsy and electroencephalographic findings in pericentric inversion of chromosome 12. *J Child Neurol* 19(8):604–608.
- Guffei A, Lichtensztejn Z, Gonçalves Dos Santos Silva A, Louis SF, Caporali A, Mai S. 2007. c-Myc-dependent formation of Robertsonian translocation chromosomes in mouse cells. *Neoplasia* 9(7):578–588.
- Gustafsson MGL. 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13081–13086.
- Hall AE, Kettler GC, Preuss D. 2006. Dynamic evolution at pericentromeres. *Genome Res* 16(3):355–364. Epub 2006 Feb 6.
- Hampson RM, Malloy MP, Mors O, Ewald H, Flannery AV, Morten J, Porteous DJ, Muir WJ, Blackwood DH. 1999. Mapping studies on a pericentric inversion (18)(p11.31q21.1) in a family with both schizophrenia and learning disability. *Psychiatr Genet* 9(3):161–163.
- He D, Brinkley BR. 1996. Structure and dynamic organization of centromeres/prekinetochores in the nucleus of mammalian cells. *J Cell Sci* 109(Pt 11):2693–2704.
- Hell SW. 2003. Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21:1347–1355.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(3):1148–1153.
- Hudson DF, Fowler KJ, Earle E, Saffery R, Kalitsis P, Trowell H, Hill J, Wreford NG, de Kretser DM, Cancilla MR, Howman E, Hii L, Cutts SM, Irvine DV, Choo KH. 1998. Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J Cell Biol* 141(2):309–319.
- Jacobs PA. 1981. Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* 33(1):44–54.
- Jamet D, Marzin Y, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Herry A, Banzakour S, Bourquard P, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, De Braekeleer M. 2005. Jumping translocations in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 161(2):159–163.
- Jares-Erijman E, Jovin T. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21:1387–1395.
- Kalitsis P, Fowler KJ, Earle E, Hill J, Choo KH. 1998. Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(3):1136–1141.
- Kalitsis P, Fowler KJ, Earle E, Griffiths B, Howman E, Newson AJ, Choo KH. 2003. Partially functional Cenpa-GFP fusion protein causes increased chromosome mis-segregation and apoptosis during mouse embryogenesis. *Chromosome Res* 11(4):345–357.
- Kalitsis P, Griffiths B, Choo KH. 2006. Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(23):8786–8791. Epub 2006 May 26.
- Kelling J, Sullivan K, Wilson L, Jordan MA. 2003. Suppression of centromere dynamics by Taxol in living osteosarcoma cells. *Cancer Res* 63(11):2794–2801.
- Kim SR, Shaffer LG. 2002. Robertsonian translocations: Mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test* 6(3):163–168.
- Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, Misteli T. 2004. Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res* 105(2-4):292–301.
- Koster AJ, Grimm R, Typke D, Hegerl R, Stoschek A, Walz J, Baumeister W. 1997. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J Struct Biol* 120:276–308.
- Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T. 2006. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol* 172(6):835–846.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8(2):104–115.

- Larabell CA, Gros MAL. 2004. X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution. *Mol Biol Cell* 15:957–962.
- Lebbink MN, Geerts WJC, Krift TPvd, Bouwhuis M, Hertzberger LO, Verkleij AJ, Koster AJ. 2007. Template matching as a tool for annotation of tomograms of stained biological structures. *J Struct Biol* 158:327–335.
- Liu X, Lei M, Erikson RL. 2006. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol Cell Biol* 26(6):2093–2108.
- Loncerek J, Kisurina-Evgenieva O, Vinogradova T, Hergert P, La Terra S, Kapoor TM, Khodjakov A. 2007. The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces. *Nature* 450(7170):745–749.
- López-Exposito I, Guillén-Navarro E, Bafalliu JA, Bernabé MC, Escalona A, Fuster C. 2006. Duplication 19q13-pter and deletion 19p13-pter arising from an inversion (19)(p13.3q13.3) of maternal origin. *Eur J Med Genet* 49(6):511–515. Epub 2006 Jun 23.
- Magnaghi-Jaulin L, Eot-Houllier G, Fulcrand G, Jaulin C. 2007. Histone deacetylase inhibitors induce premature sister chromatid separation and override the mitotic spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 67(13):6360–6367.
- Martin C, Beaujean N, Brochard V, Audouard C, Zink D, Debey P. 2006a. Genome restructuring in mouse embryos during reprogramming and early development. *Dev Biol* 292(2):317–332.
- Martin C, Brochard V, Migné C, Zink D, Debey P, Beaujean N. 2006b. Architectural reorganization of the nuclei upon transfer into oocytes accompanies genome reprogramming. *Mol Reprod Dev* 73(9):1102–1111.
- Mathew S, Dalton J, Riedley S, Spunt SL, Hill DA. 2002. Complex t(X;18)(p11.2;q11.2) with a pericentric inversion of the X chromosome in an adolescent boy with synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 132(2):136–140.
- McClintock B. 1932. A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation. *Proc Natl Acad Sci USA* 18:677–681.
- McClintock B. 1933. The association of non-homologous parts of chromosomes at mid-prophase of meiosis in *Zea Mays*. *Z Zellforsch* 19:191–237.
- McCormack SJ, Weaver Z, Deming S, Natarajan G, Torri J, Johnson MD, Liyanage M, Ried T, Dickson RB. 1998. Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* 16(21):2755–2766.
- McDonald K. 2007. Cryopreparation methods for electron microscopy of selected model systems. *Methods Cell Biol* 79:23–56.
- Merico V, Pigozzi MI, Esposito A, Merani MS, Garagna S. 2003. Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet Genome Res* 103(3–4):321–329.
- Metcalfe CJ, Bulazel KV, Ferreri GC, Schroeder-Reiter E, Wanner G, Rens W, Oberfell C, Eldridge MD, O'Neill RJ. 2007. Genomic instability within centromeres of interspecific marsupial hybrids. *Genetics* 177(4):2507–2517.
- Meyer-Ilse W, Hamamoto D, Nair A, Lelievre SA, Denbeaux G, Johnson L, Pearson AL, Yager D, Legros MA, Larabell CA. 2001. High resolution protein localization using soft X-ray microscopy. *J Microsc* 201:395–403.
- Millikan R, Thall PF, Lee SJ, Jones D, Cannon MW, Kuebler JP, Wade J III, Logothetis CJ. 2003. Randomized, multicenter, phase II trial of two multicomponent regimens in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 21(5):878–883.
- Nachman MW, Searle JB. 1995. Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* 10:397–402.
- Nielsen J, Wohlert M. 1991. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: Results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet* 87(1):81–83.
- Orthaus S, Biskup C, Hoffmann B, Hoischen C, Ohndorf S, Benndorf K, Diekmann S. 2008. Assembly of the inner kinetochore proteins CENP-A and CENP-B in living human cells. *Chembiochem* 9(1):77–92.
- Ottensmeyer FP, Bazett-Jones DP, Hewitt JJ, Price GB. 1978. Structure analysis of small proteins by electron microscopy: Valinomycin, bacitracin and low molecular weight cell growth stimulators. *Ultramicroscopy* 3:303–313.
- Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schröck E, Hilgenfeld E, Ried T. 2001. Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* 30(4):349–363.
- Patil SJ, Phadke SR. 2007. Pericentric inversion causing duplication and deletion of chromosome region 13q22 → qter in the offspring. *Am J Med Genet A* 143(1):82–84.
- Patterson GH, Betzig E, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2007. Developing photoactivated localization microscopy (PALM). 4th IEEE ISBI: From Nano to Macro. 940–943.
- Paunesku T, Vogt S, Maser J, Lai B, Woloschak G. 2006. X-Ray fluorescence microprobe imaging in biology and medicine. *J Cell Biochem* 99:1489–1502.
- Pedrazzini E, Cerretini R, Noriega MF, Narbaitz M, Palacios MF, Negri P, Bengió R, Slavutsky I. 2006. Inversions of chromosomes 2 and 6 in mantle cell lymphoma. *Cytogenetic, FISH, and molecular studies. Cancer Genet Cytogenet* 167(2):164–167.
- Pienta KJ, Lehr JE. 1993. Inhibition of prostate cancer growth by estramustine and etoposide: Evidence for interaction at the nuclear matrix. *J Urol* 149(6):1622–1625.
- Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, Yao L. 2002. Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 132(1):79–80.
- Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, Ehrlich M. 1999a. Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* 423(1–2):91–101.
- Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. 1999b. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 109(1):34–39.
- Ramadevi AR, Naik U, Dutta U, Srikanth, Prabhakara K. 2002. De novo pericentric inversion of chromosome 4, inv(4)(p16q12) in a boy with piebaldism and mental retardation. *Am J Med Genet* 113(2):190–192.
- Rheenen Jv, Langeslag M, Jalink K. 2004. Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence

- resonance energy transfer by sensitized emission. *Biophys J* 86:2517–2529.
- Ridler TW, Calvard S. 1978. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 8:630–632.
- Rieder CL, Khodjakov A. 2003. Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 300:91–96.
- Roti JL, Kampinga HH, Malyapa RS, Wright WD, vanderWaal RP, Xu M. 1998. Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. *Cell Stress Chaperones* 3(4):245–255. Review.
- Saffery R, Irvine DV, Griffiths B, Kalitsis P, Wordeman L, Choo KH. 2000. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum Mol Genet* 9(2):175–185.
- Saffery R, Sumer H, Hassan S, Wong LH, Craig JM, Todokoro K, Anderson M, Stafford A, Choo KH. 2003. Transcription within a functional human centromere. *Mol Cell* 12(2):509–516.
- Sarkar R, Guffei A, Vermolen BJ, Garini Y, Mai S. 2007. Alterations of centromere positions in nuclei of immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry A* 71(6):386–392.
- Schaefer LH, Schuster D, Herz H. 2001. Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc* 204(Pt 2):99–107.
- Schmidt M, Bastians H. 2007. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Update* 10(4–5):162–181. Epub 2007 Jul 31. Review.
- Schmit TL, Ahmad N. 2007. Regulation of mitosis via mitotic kinases: New opportunities for cancer management. *Mol Cancer Ther* 6(7):1920–1931. Review.
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294(5540):109–115.
- Schulz R, Underkoffler LA, Collins JN, Oakey RJ. 2006. Nondisjunction and transmission ratio distortion of Chromosome 2 in a (2,8) Robertsonian translocation mouse strain. *Mamm Genome* 17(3):239–247. Epub 2006 Mar 3.
- Shaw CJ, Lupski JR. 2004. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: The genomic basis of disease. *Hum Mol Genet* 13(Spec No 1):R57–R64.
- Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y. 2007. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128(1):157–170.
- Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, Takeyama H. 2004. Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med* 43(6):508–511. Review.
- Solovei I, Schermelleh L, Düring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, Cremer T. 2004. Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* 112(8):410–423. Epub 2004 Jun 9.
- Stephens DJ, Allan VJ. (2003) Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 300:82–86.
- Steven AC, Aebi U. 2003. The next ice age: Cryo-electron tomography of intact cells. *Trends Cell Biol* 13:107–110.
- Strebhardt K, Ullrich A. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6(4):321–330. Review.
- Sudakin V, Yen TJ. 2007. Targeting mitosis for anti-cancer therapy. *BioDrugs* 21(4):225–233. Review.
- Sumer H, Craig JM, Sibson M, Choo KH. 2003. A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res* 13(7):1737–1743.
- Sumer H, Saffery R, Wong N, Craig JM, Choo KH. 2004. Effects of scaffold/matrix alteration on centromeric function and gene expression. *J Biol Chem* 279(36):37631–37639. Epub 2004 Jun 25.
- Sun L, Li D, Dong X, Yu H, Dong JT, Zhang C, Lu X, Zhou J. 2008. Small-molecule inhibition of Aurora kinases triggers spindle checkpoint-independent apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 75:1027–1034.
- Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3(2):114–120.
- Thall PF, Logothetis C, Pagliaro LC, Wen S, Brown MA, Williams D, Millikan RE. 2007. Adaptive therapy for androgen-independent prostate cancer: A randomized selection trial of four regimens. *J Natl Cancer Inst* 99(21):1613–1622. Epub 2007 Oct 30.
- Tyler RK, Shpiro N, Marquez R, Eyers PA. 2007. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. *Cell Cycle* 6(22):2846–2854. Epub 2007 Aug 27.
- Ulucan H, Akin R, Kösem M, Gül D. 2006. De novo pericentric inversion of chromosome 5 in a girl with mental retardation and unilateral ear malformation. *Am J Med Genet A* 140(3):298–299.
- Underkoffler LA, Mitchell LE, Abdulali ZS, Collins JN, Oakey RJ. 2005. Transmission ratio distortion in offspring of mouse heterozygous carriers of a (7,18) Robertsonian translocation. *Genetics* 169(2):843–848. Epub 2004 Nov 1.
- Ventura M, Weigl S, Carbone L, Cardone MF, Miscio D, Teti M, D'Addabbo P, Wandall A, Björck E, de Jong PJ, She X, Eichler EE, Archidiacono N, Rocchi M. 2004. Recurrent sites for new centromere seeding. *Genome Res* 14(9):1696–1703.
- Villasante A, Abad JP, Méndez-Lago M. 2007. Centromeres were derived from telomeres during the evolution of the eukaryotic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(25):10542–10547. Epub 2007 Jun 8.
- Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunnigham HT, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD, Gazdar AF. 2001. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 7(7):1998–2004.
- Vukovic B, Beheshti B, Park P, Lim G, Bayani J, Zielenska M, Squire JA. 2007. Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 116(1–2):1–11.
- Warburton PE. 2004. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Res* 12(6):617–626. Review.

- Weimer R, Haaf T, Krüger J, Poot M, Schmid M. 1992. Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0, G1, S, G2, G1, and early S' phase in human lymphocytes. *Hum Genet* 88(6):673–682.
- Weis D, Schneider G, Niemann B, Guttman P, Rudolph D, Schmahl G. 2000. Computed tomography of cryogenic biological specimens based on X-ray microscopic images. *Ultramicroscopy* 84:185–197.
- Welborn J. 2004. Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 151(1):14–35.
- Westphal V, Kastrup I, Hell SW. 2003. Lateral resolution of 28 nm (1/25) in far-field fluorescence microscopy. *Appl Phys B* 77:377–380.
- Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA. 2005. Distinctive nuclear organization of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118:3861–3868.
- Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW, Ehrlich M. 2004. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res* 64(13):4472–4480.
- Williams BR, Zhu Z. 2006. Intrabody-based approaches to cancer therapy: Status and prospects. *Curr Med Chem* 13(12):1473–1480. Review.
- Wolf DE. 2007. Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol* 81:63–91.
- Xie XS, Yu J, Yang Y. 2006. Living cells as test tubes. *Science* 312:228–230.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Péquignot E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402(6758):187–191.
- Yue Y, Grossmann B, Ferguson-Smith M, Yang F, Haaf T. 2005. Comparative cytogenetics of human chromosome 3q21.3 reveals a hot spot for ectopic recombination in hominoid evolution. *Genomics* 85(1):36–47.
- Zhang P, Friebe B, Lukaszewski AJ, Gill BS. 2001. The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. *Chromosoma* 110(5):335–344.

c-Myc–Dependent Formation of Robertsonian Translocation Chromosomes in Mouse Cells^{1,2}

Amanda Guffei*, Zeldá Lichtensztejn*, Amanda Gonçalves dos Santos Silva^{*,†}, Sherif F. Louis*, Andrea Caporali^{*,‡,§} and Sabine Mai*

*Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, CancerCare Manitoba, Winnipeg, MB, Canada; [†]Disciplina de Imunologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia, e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP 04023-062, Brazil; [‡]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico, Università degli Studi di Parma, Parma 43100, Italy

Abstract

Robertsonian (Rb) translocation chromosomes occur in human and murine cancers and involve the aberrant joining of two acrocentric chromosomes in humans and two telocentric chromosomes in mice. Mechanisms leading to their generation remain elusive, but models for their formation have been proposed. They include breakage of centromeric sequences and their subsequent fusions, centric misdivision, mispairing between highly repetitive sequences of p-tel or p-arm repeats, and recombinational joining of centromeres and/or centromeric fusions. Here, we have investigated the role of the oncoprotein c-Myc in the formation of Rb chromosomes in mouse cells harboring exclusively telocentric chromosomes. In mouse plasmacytoma cells with constitutive c-Myc deregulation and in immortalized mouse lymphocytes with conditional c-Myc expression, we show that positional remodeling of centromeres in interphase nuclei coincides with the formation of Rb chromosomes. Furthermore, we demonstrate that c-Myc deregulation in a *myc* box II–dependent manner is sufficient to induce Rb translocation chromosomes. Because telomeric signals are present at all joined centromeres of Rb chromosomes, we conclude that c-Myc mediates Rb chromosome formation in mouse cells by telomere fusions at centromeric termini of telocentric chromosomes. Our findings are relevant to the understanding of nuclear chromosome remodeling during the initiation of genomic instability and tumorigenesis.

Neoplasia (2007) 9, 578–588

Keywords: Centromere, nuclear organization, Robertsonian chromosome, c-Myc, genomic instability.

Introduction

c-Myc deregulation is frequent in human and murine cancers [1–3]. In fact, > 70% of all cancers—including breast, ovarian, prostate, colon, liver, and gastric cancers; neuroblastoma; myeloma; and Burkitt's lymphoma [1,2] (<http://www.myccancergene.org/site/cancerDB.asp>)—have a

known Myc component. Invariably, these cancers display Myc oncoprotein deregulation/overexpression, which is achieved through various mechanisms, such as enhanced mRNA and/or protein stability, *myc* gene amplification, or *myc* activation through chromosomal translocation. Because so many cancers show a direct association with Myc, current research by many groups is dedicated to elucidating the role(s) these oncoproteins play in tumor initiation and promotion [3–5] and to exploring them as potential therapeutic targets [6].

c-Myc is a potent inducer of genomic instability (for reviews, see Kuttler and Mai [5] and Mai and Mushinski [7]). Recently, it has become apparent that c-Myc not only acts on the level of genes [8] and chromatin [9,10] but also actively contributes to the remodeling of chromosome and telomere positions in interphase nuclei [11] (for reviews, see Mai and Garini [12,13]). Remodeling of chromosome positions leads to temporary alterations in the spatial organization of chromosomes in the nucleus. As we have shown recently, nuclear reorganization of telomeres may result in the formation of telomeric aggregates and may lead to the formation of dicentric chromosomes [11]. In this study, transient c-Myc deregulation mediated the formation of telomeric aggregates in interphase nuclei. Telomeric aggregates are clusters of telomeres that cannot be further resolved at a resolution of 200 nm [14]. As assessed by metaphase chromosome preparations, such telomeric aggregates represent, in part, telomeric fusions that generate dicentric chromosomes and initiate breakage–bridge–fusion (BBF) cycles. Louis et al. [11] also demonstrated that chromosomes

Abbreviations: FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SKY, spectral karyotyping; Rb, Robertsonian; 3D, three-dimensional; 2D, two-dimensional; BBF, breakage–bridge–fusion; TCT, telomere–centromere–telomere; CTC, centromere–telomere–centromere

Address all correspondence to: Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermott Avenue, Winnipeg, MB, Canada R3E 0V9. E-mail: smai@cc.umanitoba.ca

¹This article refers to supplementary material, which is designated by “W” (i.e., Figure W1) and is available online at www.bcdecker.com.

²We thank our granting agencies for financial support. These include the National Cancer Institute of Canada, CancerCare Manitoba Foundation, and the Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training.”

³Present address: Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Level 7, Upper Maudlin Road, Bristol BS2 8HW, UK.

Received 20 April 2007; Revised 31 May 2007; Accepted 1 June 2007.

Copyright © 2007 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/07/\$25.00
DOI 10.1593/neo.07355

alter their positions when c-Myc is experimentally deregulated. Together, these two events of c-Myc-dependent nuclear remodeling profoundly alter the genomic stability of the cell, directly resulting in BBF cycles and karyotypic abnormalities such as terminal deletions and unbalanced translocations. Consequently, more complex chromosomal changes evolve [11–13].

In this present study, we have investigated whether c-Myc plays an initiating role in the remodeling of centromeric positions in interphase nuclei, using mouse cells. The karyotype of standard laboratory mouse strains consists of 40 telocentric chromosomes. However, some wild-type and laboratory mouse strains contain centromerically fused chromosomes, also known as Robertsonian (Rb) chromosomes [15–18].

The three-dimensional (3D) nuclear organization of mouse centromeres in primary, immortalized, and tumor cells has been recently determined using mouse lymphocytes with telocentric chromosomes [19]. This study showed that nuclear centromeric positions typical of primary mouse lymphocytes are significantly altered in immortalized and malignant mouse lymphocytes. The malignant lymphocytes examined in this study were mouse plasmacytoma cells (i.e., cells with *c-myc* activation through chromosomal translocation). In this present study, we therefore focused on the potential impact of c-Myc on alterations in 3D nuclear distributions of mouse centromeres. We reasoned that nuclear centromere positions might have been altered due to cellular transformation and/or nuclear remodeling as a result of c-Myc oncogene activation. To distinguish between these possibilities, we investigated, using a model of conditional and constitutive c-Myc oncoprotein deregulation, whether c-Myc deregulation was sufficient to mediate changes in 3D nuclear centromere positions. Moreover, we determined whether a potential c-Myc-dependent remodeling of the overall centromere organization permitted the generation of Rb chromosomes. To address the specificity of c-Myc-dependent effects on chromosome organization, we examined $\Delta 106$ -Myc, a *myc* box II deletion mutant Myc protein [20]. The latter does not confer tumorigenic potential when overexpressed in mouse proB lymphocytes (Ba/F3) [21] and is unable to mediate the formation of telomeric aggregates and dicentric chromosomes in these cells [22]. The present study shows that c-Myc, in a *myc* box II-dependent manner, mediates the formation of Rb chromosomes during the remodeling of centromere positions

and by telomere–telomere fusions at the telocentric termini of mouse chromosomes.

Materials and Methods

Cells and Cell Culture Conditions

All cells used are listed in Table 1. Primary splenic lymphocytes and primary plasmacytoma cells (PCT1G1) were directly isolated from mice without any *in vitro* cultivation from T38HxBalb/c mice (Central Animal Care protocol no. 02-039/1/2/3). PreB lymphocytes [11,23] were grown in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin–streptomycin, and 0.1% β -mercaptoethanol (Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Cells were maintained at a density of around 10⁵ to 10⁶ cells/ml. The plasmacytoma cell line MOPC460D (a gift from Dr. J. F. Mushinski, National Institutes of Health) was grown in RPMI 1640 with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin–streptomycin (all the above reagents are from Invitrogen/Gibco), and 100 μ l of interleukin-6 hybridoma supernatant per 10-ml plate at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Ba/F3 cells [20,21] with $\Delta 106$ -MycER were grown in RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington ON, Canada), containing 10% FBS (Gibco, Burlington ON, Canada), 1% WEHI supernatant (interleukin-3), and 0.021% plasmocin (Cayla, Toulouse, France). Cells were grown and maintained at a density of approximately 10⁵ to 10⁶ cells/ml.

Conditional c-Myc Expression

MycER in preB cells and MycER or $\Delta 106$ -MycER in Ba/F3 cells were activated by 4-hydroxytamoxifen (4HT; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at a final concentration of 100 nM in 10⁵ cells/ml [11]. Cells were split 24 hours prior to induction.

Induction of c-Myc was confirmed by fluorescence immunohistochemistry, as described previously [24]. A cytospin was made for each time point and for positive and negative controls (c-Myc-overexpressing mouse plasmacytoma cells and non-Myc-activated resting B lymphocytes, respectively). Anti-c-Myc (N262) primary antibody was used at a dilution of 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and visualized by goat anti-rabbit IgG fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody at a dilution of

Table 1. List of Cells Used in This Study.

Cells Studied	Characteristics	Karyotype
Primary mouse lymphocytes	Diploid	40,XX in all cells
Immortalized preB cells carrying MycER	Diploid; nontumorigenic in the absence of MycER activation [11,23]	40,XX in all cells
Plasmacytoma cell line MOPC460D	Near-tetraploid; from female BALB/c mouse; tumorigenic [11]	75–82,XXXX,T(12;15)
Primary plasmacytoma cell line PCT1G1	Near tetraploid; v- <i>abl/myc</i> -induced; tumorigenic (unpublished data)	81,XXXX,T(X;11); TsT(X;11)
Immortalized proB cells (Ba/F3)	Near-tetraploid; nontumorigenic; from male BALB/c mouse [20,21]	69–80,XXYY
Carrying MycER	Near-tetraploid; tumorigenic only in the presence of MycER activation [20,21]	69–80,XXYY
Carrying <i>myc</i> box II deletion mutant $\Delta 106$ -MycER	Near-tetraploid; nontumorigenic in the presence or in the absence of $\Delta 106$ -MycER activation [20,21]	69–80,XXYY

More details on these cells can be found in Materials and Methods and in the accompanying references.

1:100 (Sigma-Aldrich). Imaging and analysis were performed as described in Fest et al. [21].

Cell Fixation and Chromosome Preparations

Cells were directly harvested from mice or from cell culture. They were spun down at 200g for 10 minutes and resuspended in 5 ml of 0.075 M KCl for 10 minutes at room temperature for subsequent 3D fixation of nuclei or for 30 minutes at room temperature for chromosome preparation. For 3D fixation, a hypotonic solution was overlaid with 1 ml of freshly prepared fixative (methanol/acetic acid, 3:1), inverted carefully for a couple of times, and centrifuged at 200g for 10 minutes at room temperature. Thereafter, pellets were resuspended with 5 ml of fixative and washed for two more times as above. This fixation method yielded nuclei ready for 3D image acquisition, and results were identical to those with 3.7% formaldehyde fixation, as also stated elsewhere [25]. The ellipsoid nature of lymphocytes was confirmed by confocal microscopy [22].

For chromosome fixation, the drop fixation method [26] was used. For all assays involving metaphase chromosomes, a minimum of twenty metaphases was scored.

Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA-FISH) with Centromeres and Telomeres

PNA-FISH was performed on both 3D interphase and two-dimensional (2D) metaphase samples derived from the above cells. A PNA human centromeric probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was custom-made to the sequences listed below.

The PNA centromere probe sequences used in this study are as follows:

Sequence 1: (N-terminus)Flu-OEE-ATTCGTTGGAAC-GGGA-EE(C-terminus)

Sequence 2: (N-terminus)Flu-OEE-CACAAAGAAGTTT-CTGAG-EE(C-terminus)

Sequence 3: (N-terminus)Flu-OEE-CAGACAGAAGCAT-TCTCA-EE(C-terminus)

Sequence 4: (N-terminus)Flu-OEE-TGCATTCAACTCA-CAGAG-EE(C-terminus).

This probe cocktail hybridized to all mouse centromeres (Figure 3).

A PNA telomeric probe was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). 3D fixed interphase nuclei were fixed onto slides using 3.7% formaldehyde/phosphate-buffered saline. The PNA human centromeric probe was denatured at 80°C for 5 minutes and then added to slides in conjunction with the PNA telomeric probe. The slides were denatured at 80°C for 3 minutes, subsequently hybridized for 2 hours at 30°C using the Hybrite system (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), and then washed in 70% formamide/2×SSC. DAPI (0.1 μg/ml) was applied, and, finally, one drop of Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) was added. All slides were imaged right away to avoid changes in imaging conditions and were handled as described in 3D Image Acquisition section.

3D Image Acquisition

Image acquisition was performed on 30 interphase nuclei per cell line using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada). A 63×/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada) was used at acquisition times of 300 milliseconds for FITC (centromere), 200 milliseconds for Cy3 (telomere), and 20 to 50 milliseconds for DAPI (nuclei). Eighty to 90 z-stacks were acquired at a sampling distance of $xy: 107$ nm and $z:200$ nm for each slice of the stack. Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Inc. Canada) and constrained iterative algorithm [27] were used for deconvolution.

Scoring of Centromere–Telomere Signals in 3D Nuclei

Centromere–telomere hybridization signals were scored as follows: In nuclei with declustered centromeres, telomere signals that flanked centromeres from one or two sides were counted as normal. In contrast, when telomere signals were flanked by centromere signals on two sides, such signals were scored as aberrant. Telomere–centromere–telomere (TCT) signals thus represent a normal nuclear organization, whereas centromere–telomere–centromere (CTC) signals represent an aberrant nuclear organization. Nuclear domains with clustered centromeres were not included in this analysis. Note that telomeric signals at a distance of ≤ 200 nm will be detected as one signal [14].

Spectral Karyotyping (SKY) Analysis

SKY was performed using the ASI (Applied Spectral Imaging, Vista, CA) kit for mice in accordance with the supplier's hybridization protocols. We used the Spectra Cube (ASI) on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63×/1.4 oil objective and the Case Data Manager 4.0 software (ASI) for PC to perform analyses. A minimum of 20 metaphases was examined for preB (induced and noninduced), MOPC460D, T38HxBalb/c, and $\Delta 106$ (induced and noninduced). Metaphases were then analyzed for Rb fusions, and matching control time points were statistically compared using Fisher's exact test. $P < .05$ was considered significant.

Results

Myc and myc Box II–Dependent Nuclear Remodeling of Centromere Positions

The 3D nuclear distribution frequencies of centromeres are significantly changed during immortalization and malignant transformation: Centromeres assume higher distribution frequencies toward central nuclear positions in mouse tumor cells than in immortalized and normal mouse lymphocytes [19]. To determine the consequences of altered centromeric organization for the structural organization of chromosomes, we performed a detailed analysis of the nuclear organization of centromeres and telomeres in primary, immortalized, and malignant mouse lymphocytes (Table 1). These cell lines were chosen to enable the analysis of centromeric positions and their remodeling within the same cell lineage, as cell type–specific variations in centromere

positions do not lend themselves to a direct comparison of their respective centromeric distribution frequencies.

Figure 1 highlights representative images of primary mouse lymphocytes, immortalized mouse preB and proB lymphocytes, and tumor cells (mouse plasmacytoma cells) in the absence or in the presence of constitutive or conditional wild-type or *myc* box II–deletion mutant ($\Delta 106$) Myc expression (Table 1). After dual-color hybridization with centromeres (green) and telomeres (red), the nuclei of primary lymphocytes and immortalized preB cells show a predominantly peripheral organization of centromeres; their telomeres are found throughout nuclear space (Figure 1, A and B). In contrast to this nuclear organization, the nuclei of MOPC460D tumor cells with constitutive deregulation of c-Myc protein due to T(12;15) exhibit a more central nuclear distribution of centromeres (Figure 1C). Their telomeres (red) are shorter, and some are found in close association with centromeres (Figure 1C, yellow arrows; data not shown).

Each telocentric mouse chromosome is expected to have four telomeres because there are four chromatid ends (i.e., two at each end of the long arm and two at the short centromeric end of a chromosome). Therefore, the expected hybridization signals of telomeres and centromeres in mouse interphase nuclei would be found in the following sequence: Telomeres (red) will be observed both adjacent to a centromere (green) and distant from a centromere (Figure 1A, cartoon). This is due to the presence of telomeres at the short and long ends of mouse chromosomes, respectively. Nuclear telomere (red)–centromere (green)–telomere (red) (TCT) signals may also touch each other if a chromosome is bent.

Our data show that primary mouse lymphocytes display expected TCT signals (Figure 1A). Similarly, immortalized preB cells exhibit TCT signals (Figure 1B). However, the nuclei of MOPC460D plasmacytoma cells display a different organization; TCT signals are frequently altered into centromere (green)–telomere (red)–centromere (green) (CTC) signals, suggesting a centromere–centromere association, with telomeric signals bridging the centromeres (Figure 1C, yellow arrows, cartoon, and enlarged CTC images in e) ($P < .0001$).

To examine the 3D distribution patterns of centromeres and telomeres in conditionally Myc-expressing cells, we studied preB cells stably transfected with MycER [11,23] (Table 1). These cells allow for the conditional expression of c-Myc (Figure W1, A and B). Moreover, in the absence of c-Myc activation, these cells are diploid (Table 1). Figure 1, D and E, illustrates the data obtained for preB cells in the absence of MycER activation (D) and in its presence (E). The nuclear organization of CTC is apparent only after

MycER activation (Figure 1E, yellow arrow, cartoon, and zoomed image e) ($P = .02$), suggesting an Myc-dependent nuclear remodeling of centromeres. To verify the Myc dependency of this process, a *myc* box II deletion mutant $\Delta 106$ -MycER was tested under identical conditions (Figure 1, F and G; Figure W1, C and D). This deletion mutant, when overexpressed, is unable to initiate *in vivo* tumorigenesis of spontaneously immortalized proB lymphocytes (Ba/F3) [21]. $\Delta 106$ -MycER did not induce the nuclear remodeling of centromeres, and no CTC signal was found (Figure 1, F and G, cartoon). For the cells studied here, we conclude that the formation of CTC appears to be dependent on the presence of Myc and on the presence of *myc* box II.

c-Myc and myc Box II–Dependent Formation of Rb Chromosomes

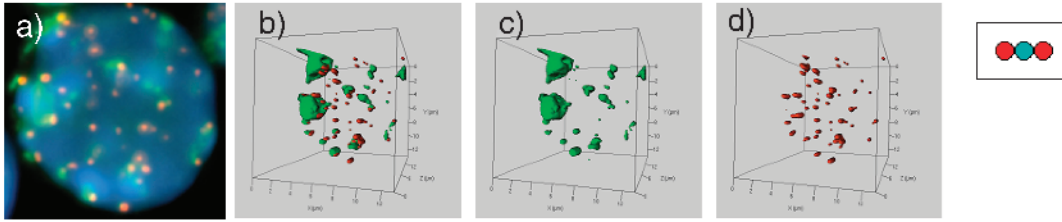
The analysis of TCT *versus* CTC signals in 3D images is complex, and not all potential CTC signals will be found or will be correctly assessed due to the clustering of centromeres at the nuclear periphery (see also Sarkar et al. [19], Solovei et al. [28], and Weierich et al. [29]). We therefore decided to tackle the question of centromere remodeling by molecular cytogenetics. Using this approach, we investigated whether the altered nuclear organization of centromeres impacts on the structural organization of chromosomes, particularly on the formation of Rb chromosomes. In mouse Rb chromosomes, telocentric chromosomes become bimeric due to the fusion of centromeres of the two individual telocentric chromosomes.

To address the question of Rb chromosome formation in our cell models, we performed SKY of primary mouse lymphocytes, mouse plasmacytoma cells (MOPC460D), mouse diploid immortalized preB cells with and without MycER activation, and near-tetraploid mouse BaF/3 cells (immortalized proB cells) in the presence or in the absence of wild-type MycER or $\Delta 106$ -MycER activation (Table 1 and Figure 2; Figure W1). Twenty metaphases were examined for each cell type. In contrast to primary lymphocytes of T38HxBalb/c mice that did not exhibit Rb chromosomes (Figure 2A), MOPC460D tumor cells showed a significant number of Rb chromosomes per metaphase ($P < .0001$): Fifteen of 20 MOPC460D metaphases showed one or more Rb chromosomes; 26 Rb chromosomes were observed in 15 metaphases (Figure 2B, white arrows).

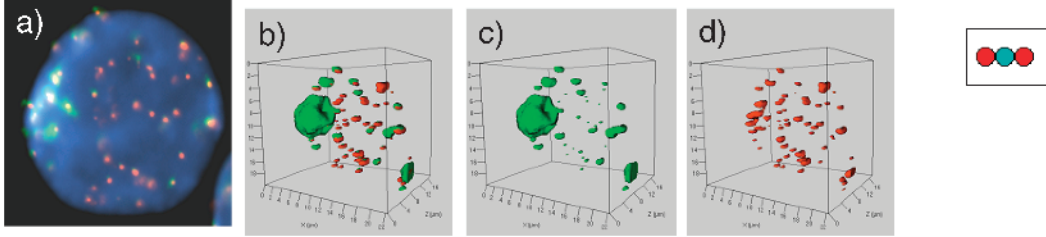
It is noteworthy that MOPC460D cells displayed a non-random involvement of specific chromosomes in the formation of Rb chromosomes, such as chromosomes 1, 3, 8, 14, 15, 17, and X (Table 2). Out of these, chromosome 15 was

Figure 1. Nuclear centromere and telomere distribution patterns. Representative images of dual-color hybridization of mouse lymphocytes with a centromere probe (green) and a telomere probe (red) on interphase nuclei (blue). Panel (A–G) Different lymphocyte cell nuclei: Panel (A) primary lymphocyte nucleus of T38HxBalb/c; Panel (B) nucleus of preB cell; Panel (C) nucleus of MOPC460D; Panel (D) preB cell nucleus without MycER activation 30 hours after mock treatment with ethanol; Panel (E) preB cell nucleus 30 hours after MycER activation; Panel (F) Ba/F3 cell nucleus without $\Delta 106$ -MycER activation 30 hours after mock treatment with ethanol; Panel (G) Ba/F3 cell nucleus 30 hours after $\Delta 106$ -MycER activation. Each panel illustrates a nucleus in 2D Panel (A–G, a) and in 3D Panel (A–G, b–d). Among 3D panels, (b) represents dual-color hybridization, with centromeres in green and telomeres in red; (c) illustrates centromeric signals only; and (d) shows telomeric hybridization signals. Panels (C and E, e) Enlarged 3D views of CTC hybridization signals (green–red–green) that are also highlighted by yellow arrows in Panel (C) and Panel (E), respectively. In addition, telomere–centromere hybridization signals are highlighted in small cartoons on the right side of each panel. Scale bars are given in 3D panels and represent sizes in nanometers.

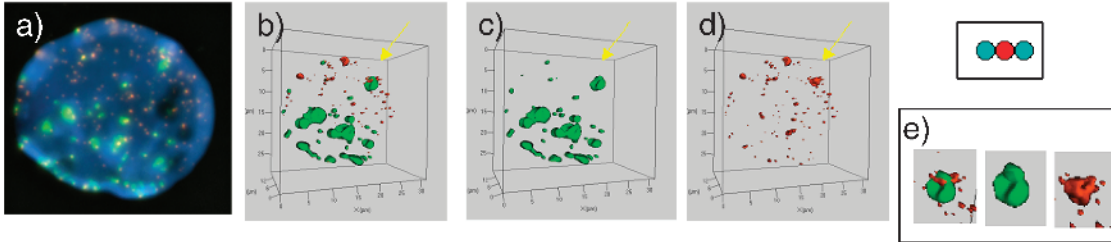
Panel A



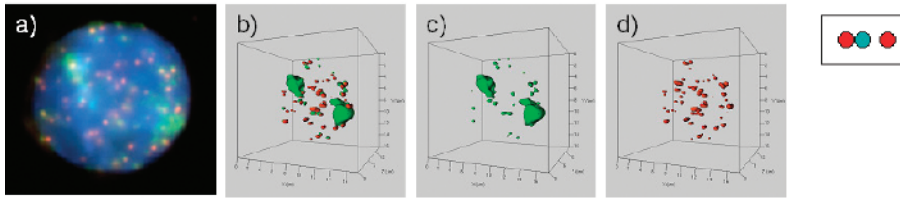
Panel B



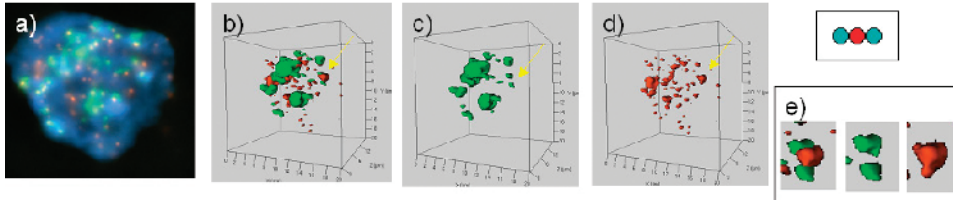
Panel C



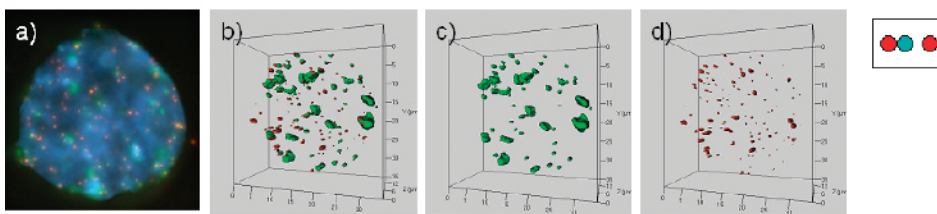
Panel D



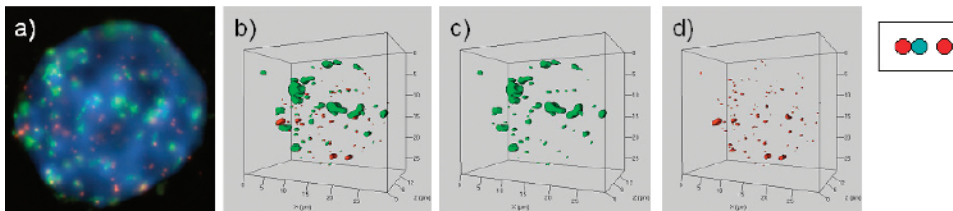
Panel E



Panel F



Panel G



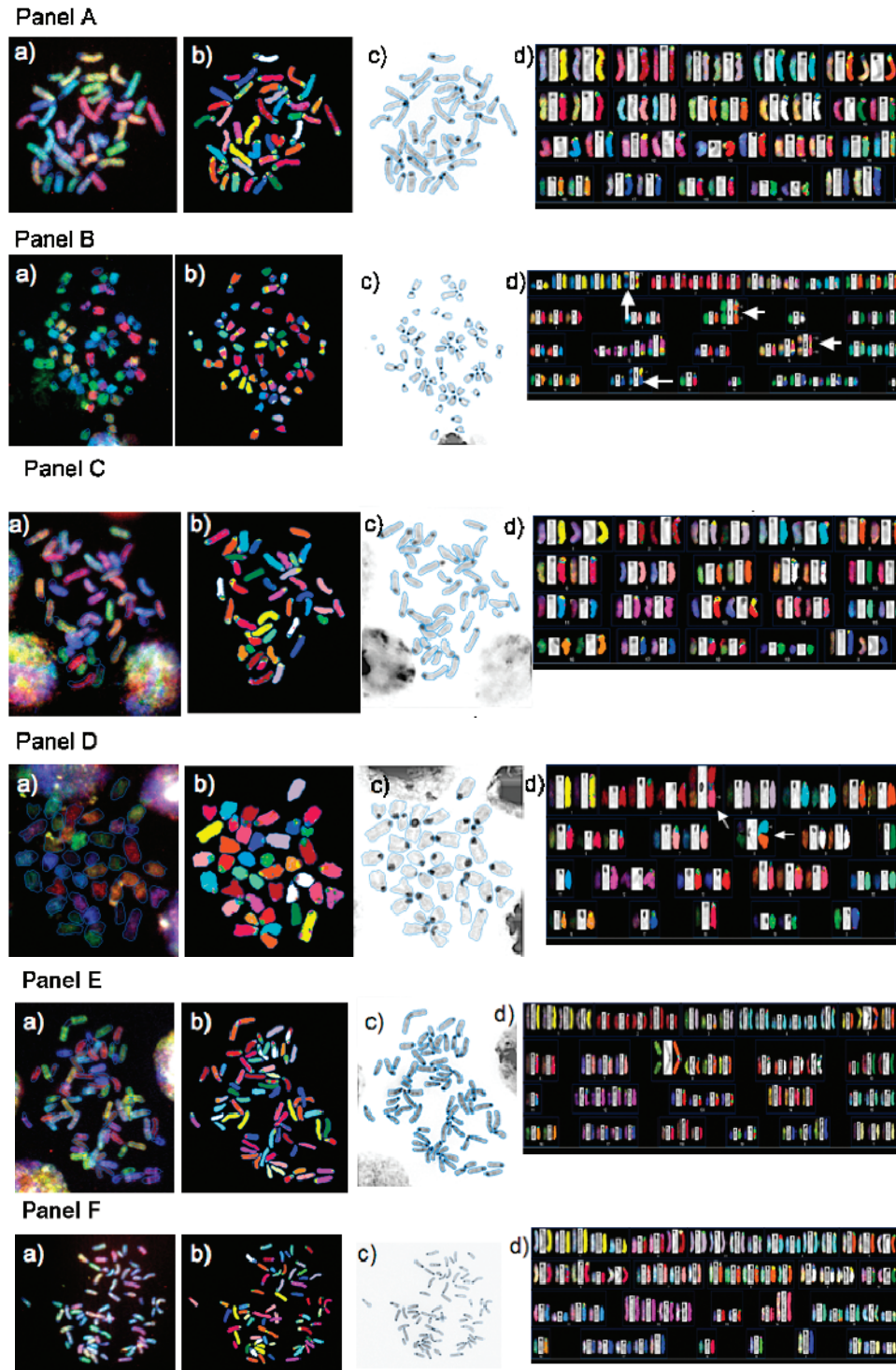


Figure 2. SKY of metaphases derived from the cells of this study. Representative images from SKY analyses are shown: Panel (A) primary lymphocytes from T38HxBalb/c mice; Panel (B) MOPC460D; Panels (C and D) preB cells in the absence Panel (C) or in the presence Panel (D) of MycER activation; Panels (E and F) Ba/F3 $\Delta 106$ -MycER without Panel (E) or with Panel (F) $\Delta 106$ -MycER activation. White arrows point to Rb fusion chromosomes. The Rb (8;8) in Ba/F3 cells is constitutional and has been noted previously [21]. Each panel shows a representative image for each cell type; however, layout is the same for all: (a) the raw image of a metaphase; (b) the classified image of the metaphase; (c) the inverted DAPI-banded image of the metaphase; and (d) the karyotype table of the metaphase.

most frequent (found 24 times in Rb fusions in the 15 Rb chromosome-carrying metaphases), followed by chromosomes 1 and 14 (found 21 times in 15 Rb chromosome-carrying metaphases) (Table 2).

To analyze the impact of Myc on the formation of Rb chromosomes, we used preB cells and studied them in the absence

and in the presence of MycER activation (Figure 2, Panels C and D, respectively). Although non-MycER-activated preB cells did not exhibit Rb chromosomes (Figure 2, Panel C), MycER-activated preB cells showed Myc-dependent formation of Rb chromosomes. Thirty-three percent of metaphases (6/20) showed formation of Rb chromosomes within 30 hours

Table 2. Summary of Chromosomes Participating in the Formation of Rb Chromosomes in MOPC460D Cells in a Nonrandom Manner.

Chromosome Number	Times Involved in Rb Fusions	<i>P</i>
1	21	< .0001
3	11	.001
8	18	< .0001
14	21	< .0001
15	24	< .0001
17	14	.0001
X	11	.001

The numbers given are derived from the analysis of 20 metaphases. Fifteen of these 20 metaphases carried one or more Rb chromosomes. The involvement of each chromosome in the formation of Rb chromosomes is given, and the respective significance is indicated. For further details, see text and Materials and Methods section.

(Figure 2, Panel D, arrows; $P = .02$). During this observation period, we did not note any specific chromosome combinations that were involved in the formation of Rb chromosomes.

The Myc dependency of this structural chromosomal change was confirmed with the *myc* box II deletion mutant $\Delta 106$. The conditional expression of $\Delta 106$ -MycER did not lead to the formation of Rb chromosomes in Ba/F3 cells (Figure 2, Panels E and F, respectively), whereas the induction of wild-type MycER in Ba/F3 cells did. Chromosomes X and 5 were most frequently involved in the formation of Rb chromosomes subsequent to wild-type MycER activation of Ba/F3 cells ($P = .0001$ and $P = .02$, respectively, 30 hours after Myc activation) (data not shown).

The above data suggest that: 1) nuclear centromere organization impacts on chromosomal order permitting the formation of Rb chromosomes; and 2) Myc deregulation leads to the formation of Rb chromosomes in a *myc* box II-dependent manner.

Rb Chromosomes Form By Centromere–Telomere–Fusion in an Myc-Dependent Manner

Using dual-color FISH with centromeres and telomeres on metaphase chromosomes, we next examined whether the Rb chromosomes seen displayed centromere–telomere fusions. Using the cell lines listed in Table 1, we analyzed 20 metaphases per cell type and determined the presence of telomeric signals at the fusion points of centromeres in Rb fusion chromosomes (Figure 3). We noted the presence of telomeric hybridization signals on Rb chromosomes formed after MycER activation in preB cells (Figure 3, Panel E, arrows and zoomed images), MOPC460D cells (Figure 3, Panel B, arrows and zoomed images), and PCT1G1 cells (a primary mouse plasmacytoma cell line; Figure 3, Panel C, (arrows and zoomed images)). In contrast, no Rb chromosomes were seen in primary lymphocytes (Figure 3, Panel A), non-MycER-activated preB cells (Figure 3, Panel D), or $\Delta 106$ -MycER-activated and control Ba/F3 cells (Figure 3, Panels G and F, respectively). We conclude that constitutive or conditional wild-type Myc deregulation, but not deregulated $\Delta 106$ -Myc protein expression, led to the formation

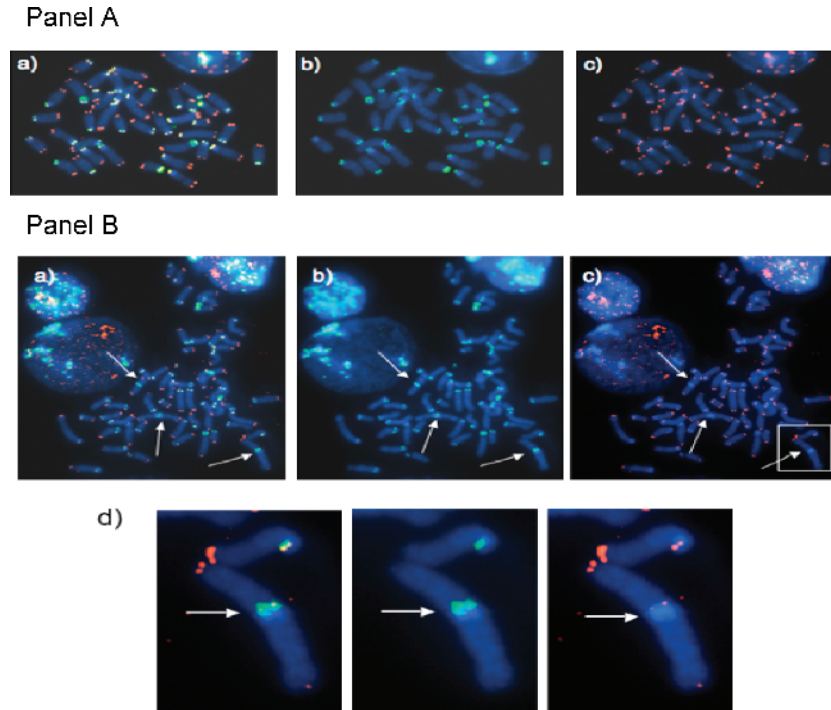


Figure 3. Centromere–telomere FISH performed on metaphases of mouse lymphocytes. Representative images are shown: Panel (A) primary lymphocyte metaphase from a T38HxBalb/c mouse; Panel (B) metaphase of MOPC460D; Panel (C) partial metaphase of the primary mouse plasmacytoma PCT1G1; Panel (D) preB cell metaphase without MycER activation; Panel (E) preB metaphase 30 hours after MycER activation; Panel (F) Ba/F3 cells without $\Delta 106$ -MycER activation; Panel (G) Ba/F3 cells 30 hours after $\Delta 106$ -MycER activation. In each panel, (a) represents dual-color FISH hybridization signals of telomeres (red) and centromeres (green); (b) shows only centromeric signals; and (c) shows only telomeric signals. Rb chromosomes shown in Panel (B), Panel (C), and Panel (E) are highlighted with white boxes and arrows, and then enlarged (d) to observe CTC signals. Note small telomeric signals at Rb fusion in Panel (B, d). The overall telomeric length in MOPC460D is reduced in comparison to the telomeric length of primary B cells and preB cells (data not shown; Figure 1, Panel C).

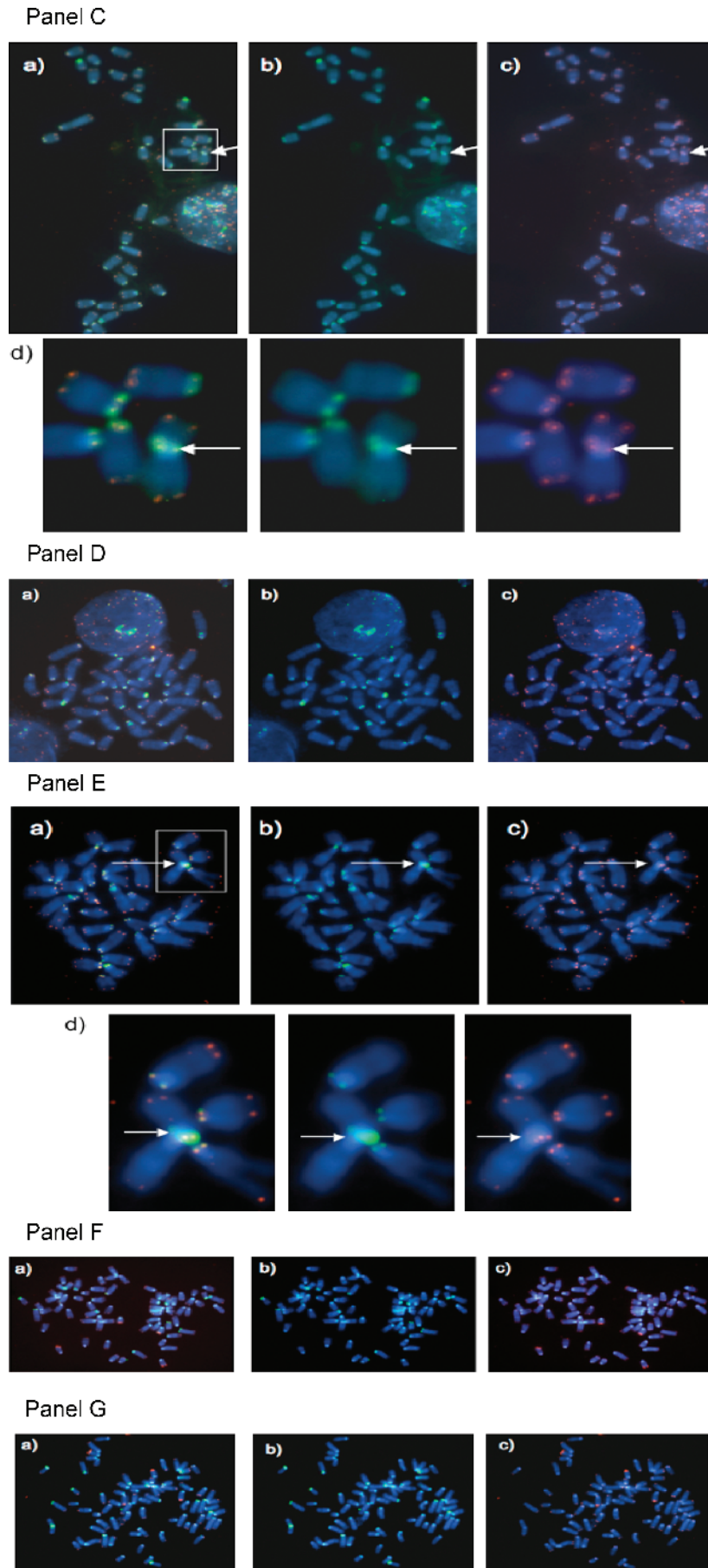


Figure 3. (continued).

of Rb chromosomes that carry telomeric signals at their fusion points.

The above data further suggest that critically shortened telomeres are unlikely to cause the formation of Rb translocation chromosomes in this experimental setting. Instead, it is likely that c-Myc–dependent uncapping of telomeric sequences plays an initiating role in this event. This conclusion is very likely due to the short time period required to permit such fusions: 30 hours after a single c-Myc deregulation were sufficient to allow for the formation of Rb translocation chromosomes that carry telomeric signals in fused centromeres. The latter was observed for both preB and Ba/F3 cells.

Discussion

Rb Chromosomes in Different Species and in Cancer

Rb chromosomes represent structural genetic changes that occur in many species, including plants [30], cattle [31], some strains of mice [16,32], fish [33], and humans [34]. In humans, such Rb chromosomes are among the most common structural aberrations in aborted fetuses and newborns [35–37]. Moreover, Rb chromosomes in humans have been found as acquired or constitutional genetic lesions in hematologic cancers [34,38] and in solid tumors [39,40]. In addition, they have been reported at the onset of acute myelogenous leukemia [41].

Does It Matter to Have De Novo Rb Chromosomes in a Cell?

One could assume that Rb chromosomes merely remodel nuclear organization, thereby placing two chromosomes into a “forced” unit and into a new nuclear position or environment, without any further impact on the cell. Several lines of evidence suggest, however, that this new fused entity can be different and that the remodeling of two chromosomes into one Rb chromosome may possibly have wide-ranging effects. For example, it has been described that the formation of an Rb chromosome suppresses somatic recombination [42]. Another study linked Rb chromosomes to altered nuclear architecture and subfertility in mice [43]. In tumor induction studies with Rb-carrying or non-Rb-carrying BALB/c mice and congenics, it has been shown that the type of c-myc–activating chromosomal translocations in mouse plasmacytoma cells is altered in Rb6.15–carrying mice compared to BALB/c mice with telocentric chromosomes [44]. In humans, Rb translocations occur between acrocentric chromosomes of the D and G groups 13–15 and 21–22. These Rb translocations most frequently involve chromosomes 13 and 14. Carriers of such chromosomes are at risk for chromosomal nondisjunction leading to offspring with trisomy or uniparental disomy (UPD) following pregnancy rescue. Although UPD for chromosomes 13, 21, and 22 does not show apparent phenotypes, UPD for chromosomes 14 and 15 results in abnormal phenotypes [37]. Altogether, the above data suggest that a nuclear reorganization of two single chromosomes into one Rb chromosome may have a broad impact on the overall

physiological state of Rb-carrying cells, on the function of the organism, and on oncogenesis.

Randomness and Nonrandomness of Rb Chromosomes Formed

Our present data show that mouse plasmacytoma cells (MOPC460D) with constitutive c-Myc deregulation and in long-term culture develop significant numbers of Rb chromosomes. Specific Rb chromosomes are found more frequently than others. For example, chromosomes 1, 3, 8, 14, 15, 17, and X are involved in Rb translocations almost all the time, although with different individual frequencies (Table 2). It is possible that the nonrandom composition of Rb fusions was selected during long-term culture, in combination with constitutively elevated levels of c-Myc protein. However, the above data also support current concepts suggesting that chromosomal proximity in interphase nuclei is required for intrachromosomal rearrangements (for review, see Meaburn et al. [45]). One could therefore assume that those chromosomes that were involved in Rb fusions more often than others resided in centromere clusters or in close nuclear proximity to each other in interphase nuclei. In fact, a previous study undertaken by our group suggested that specific chromosomes involved in unbalanced translocations were found in close nuclear proximity, showing considerable overlap as a result of c-Myc deregulation [11]. Moreover, studies into the 3D organization of centromeres suggest that their distribution is altered in tumor cells such as MOPC460D, where centromeres are no longer found with high frequency toward the nuclear periphery (as is commonly observed for primary lymphocytes) but are instead located in a more central nuclear space [19]. If we also consider that mouse chromosomes have a > 99% sequence homology in their telocentric regions [46], fusion events become very possible. They have indeed been reported in detail for *Mus musculus* speciation [15–18]. Thus, we propose that chromosomal positions and telocentric sequences contribute to both the specificity and the randomness of Rb chromosome formation in mouse cells. In accordance with this notion, we have observed that a single MycER activation in preB cells led to the formation of Rb chromosomes but did not result in the generation of nonrandom combinations of Rb chromosomes. Of note, PCT1G1, a primary plasmacytoma cell line that displayed Rb chromosomes (Table 1 and Figure 3), also did not show nonrandom constitution of Rb chromosomes, whereas a single wild-type MycER activation in Ba/F3 cells led to preferential formation of certain Rb chromosome combinations. From these findings, we conclude that c-Myc deregulation permits the formation of random and nonrandom Rb chromosomes within the given context of nuclear chromosomal and centromeric positions and of telocentric sequences.

Mechanisms of Rb Chromosome Formation in the Context of c-Myc–Dependent Oncogenic Nuclear Remodeling

Previous studies have suggested that Rb chromosomes form after recombination [46,47], centric misdivision and rejoining [30], or fusion [48]. Our data support the concept of fusion but add a new dimension: Rb fusions are initiated by

c-Myc oncogene deregulation and depend on *myc* box II. After c-Myc deregulation, Rb chromosomes are generated when centromeric telomeres of mouse telocentric chromosomes fuse. This telomeric fusion is a direct consequence of the recently described Myc-dependent formation of telomeric aggregates [11] and of the nuclear remodeling of centromeres (this study and Sarkar et al. [19]). In this context, c-Myc-induced telomeric aggregates will lead to end-to-end fusions of telomeres on both ends of the chromosomes. Telocentric telomere fusions will generate Rb chromosomes, whereas telomeric fusions of the long arms of two chromosomes will create dicentric chromosomes. The latter usually initiates BBF cycles, which we have described recently [11].

The novel finding of this study, thus, is a direct link between Rb chromosome formation and c-Myc deregulation that occurs in a *myc* box II-dependent manner and through telomeric fusions at telocentric ends of mouse chromosomes. Whether previously observed mouse and rat Rb fusions involve *myc* box II and telomeric fusions is currently unknown. For example, Rb chromosomes were observed in Rat1A fibroblasts [49,50] and in transgenic MMTV-*myc*/p53 mice [51]. One of the primary tumors that formed in these mice, 67a5, contained RbX.15 and Rb11.15 [51]. Furthermore, Rb chromosomes were common in a model of mouse skin tumorigenesis (unpublished data).

Theoretically, the c-Myc-dependent telomere-mediated centromeric fusion process that creates mouse Rb chromosomes does not require additional mechanisms. However, it is likely that c-Myc's ability to induce DNA breaks [52–54] may contribute to a second molecular pathway of Rb chromosome formation. Whether the latter mechanism would act alone or in concert with the former is currently unknown.

The requirement of *myc* box II for mouse Rb chromosome formation confirms that the process of Rb chromosome formation is Myc-dependent and involves telomeric fusions [22]. The present study opens new avenues into investigations about *myc* box II-related Myc-cooperating proteins that may play a role in this Myc-induced nuclear remodeling of centromeres.

Finally, this study highlights the fact that c-Myc-dependent telomeric fusions at telocentric mouse chromosomes do not require critically short telomeres. This conclusion is based on the following: 1) compared to human telomeres, mouse telomeres are long (in the range of 20–60 kb, depending on the mouse strain) [55]; and 2) telomeric fusions at telocentric chromosomes occurred within 30 hours of experimentally induced c-Myc deregulation. This fact precludes the idea that, in this experimental context, after multiple divisions and/or mouse generations, telomeres reached a critically short state that predisposed them to fusions. Instead, these findings suggest a direct impact of c-Myc on the capping of telomeres. Future studies will address these potential interactions.

Acknowledgement

We thank Francis Wiener for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Nesbit CE, Tersak JM, and Prochownik EV (1999). *MYC* oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004–3016 (Review).
- [2] Popescu NC and Zimonjic DB (2002). Chromosome-mediated alterations of the *MYC* gene in human cancer. *J Cell Mol Med* **6**, 151–159 (Review).
- [3] Arvanitis C and Felsher DW (2006). Conditional transgenic models define how *MYC* initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* **16**, 313–317 (Epub 2006 Jul 21).
- [4] Lutz W, Leon J, and Eilers M (2002). Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 61–71 (Review).
- [5] Kuttler F and Mai S (2006). c-Myc, genomic instability and disease. In *Vol 1: Genome Dynamics. Genome and Disease*. J–N Volf (Ed). Karger Publishers, Würzburg, Germany, pp. 171–191.
- [6] Vita M and Henriksson M (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 318–330 (Review; Epub 2006 Aug 3).
- [7] Mai S and Mushinski JF (2003). c-Myc-induced genomic instability. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **22**, 179–199 (Review).
- [8] Oster SK, Ho CS, Soucie EL, and Penn LZ (2002). The *myc* oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* **84**, 81–154 (Review).
- [9] Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, and Amati B (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* **4**, 575–580.
- [10] Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gaikem PR, McMahon SB, and Eisenman RN (2006). Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* **25**, 2723–2734 (Epub 2006 May 25).
- [11] Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z, Kuttler F, Chuang TC, Moshir S, Mougey V, et al. (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9613–9618.
- [12] Mai S and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327–1331 (Epub 2005 Oct 5).
- [13] Mai S and Garini Y (2006). The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem* **97**, 904–915 (Review).
- [14] Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, et al. (2004). The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol* **3**, 2–12.
- [15] Gropp A, Winking H, Redi C, Capanna E, Britton-Davidian J, and Noack G (1982). Robertsonian karyotype variation in wild house mice from Rhaeto-Lombardia. *Cytogenet Cell Genet* **34**, 67–77.
- [16] Gazave E, Catalan J, Ramalinho Mda G, Mathias Mda L, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, and Auffray JC (2003). The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* **81**, 33–42.
- [17] Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, and Redi CA (2001). Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 171–175.
- [18] Capanna E and Castiglia R (2004). Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenet Genome Res* **105**, 375–384.
- [19] Sarkar R, Guffei A, Vermolen BJ, Garini Y, and Mai S (2007). Alterations in centromere positions in immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry Part A* **71** (6), 386–392.
- [20] Fest T, Mougey V, Dalstein V, Hagerty M, Milette D, Silva S, and Mai S (2002). c-MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis. *Oncogene* **21**, 2981–2990.
- [21] Fest T, Guffei A, Williams G, Silva S, and Mai S (2005). Uncoupling of genomic instability and tumorigenesis in a mouse model of Burkitt's lymphoma expressing a conditional box II-deleted Myc protein. *Oncogene* **24**, 2944–2953.
- [22] Caporali A, Wark L, and Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398–1406 (Epub 2006 Sep 4).
- [23] Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, Kuschak TI, Paul JT, Littlewood TD, Mischak H, Stevens LM, Henderson DW, and Mushinski JF (1999). Chromosomal and extrachromosomal instability of the *cyclin D2* gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* **1**, 241–252.
- [24] Fukasawa K, Wiener F, Vande Woude GF, and Mai S (1997). Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* **11**, 1295–1302.
- [25] Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, and

- Misteli T (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res* **105**, 292–301.
- [26] Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire (Eds). Oxford University Press, Oxford. pp. 55–67.
- [27] Schaefer LH, Schuster D, and Herz H (2001). Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc* **204**, 99–107.
- [28] Solovei I, Schermelleh L, Düring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, and Cremer T (2004). Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* **112**, 410–423.
- [29] Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, and Solovei I (2003). Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res* **11**, 485–502.
- [30] Friebe B, Zhang P, Linc G, and Gill BS (2005). Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet Genome Res* **109**, 293–297.
- [31] Mastromonaco GF, Coppola G, Crawshaw G, DiBerardino D, and King WA (2004). Identification of the homologue of the bovine Rob(1;29) in a captive gaur (*Bos gaurus*). *Chromosome Res* **12**, 725–731.
- [32] Nachman MW and Searle JB (1995). Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* **10**, 397–402.
- [33] Gold JR and Gall GA (1975). Chromosome cytology and polymorphism in the California High Sierra golden trout (*Salmo aguabonita*). *Can J Genet Cytol* **17**, 41–53.
- [34] Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* **151**, 14–35.
- [35] Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* **33**, 44–54.
- [36] Nielsen J and Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. *Hum Genet* **87**, 81–83.
- [37] Kim SR and Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test* **6**, 163–168.
- [38] Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, and Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **132**, 79–80.
- [39] Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schrock E, Hilgenfeld E, and Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 349–363.
- [40] Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thoner P, and Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 19 and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7–16.
- [41] Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, and Takeyama H (2004). Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of Robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med* **43**, 508–511.
- [42] Haigis KM and Dove WF (2003). A Robertsonian translocation suppresses a somatic recombination pathway to loss of heterozygosity. *Nat Genet* **33**, 33–39 (Epub 2002 Nov 25).
- [43] Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, and Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci* **114**, 4429–4434.
- [44] Silva S, Wiener F, Klein G, and Janz S (2005). Location of Myc, Igh, and Igk on Robertsonian fusion chromosomes is inconsequential for Myc translocations and plasmacytoma development in mice, but Rb(6.15)-carrying tumors prefer Igk–Myc inversions over translocations. *Genes Chromosomes Cancer* **42**, 416–426.
- [45] Meaburn KJ, Misteli T, and Soutoglou E (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* **17**, 80–90 (Epub 2006 Oct 26).
- [46] Kalitsis P, Griffiths B, and Choo AKH (2006). Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8786–8791.
- [47] Hecht F, Morgan R, and Hecht BK (1988). Robertsonian chromosome recombinations are rare in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **35**, 79–81.
- [48] Slijepcevic P (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. *Chromosoma* **107**, 136–140.
- [49] Mai S, Fluri M, Siwarski D, and Huppi K (1996). Genomic instability in MycER-activated Rat1A–MycER cells. *Chromosome Res* **4**, 365–371.
- [50] Felsher DW and Bishop JM (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3940–3944.
- [51] McCormack SJ, Weaver Z, Deming S, Natarajan G, Torri J, Johnson MD, Liyanage M, Ried T, and Dickson RB (1998). Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16**, 2755–2766.
- [52] Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, and Wahl GM (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**, 1031–1044.
- [53] Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J, and Felsher DW (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9974–9979 (Epub 2003 Aug 8).
- [54] Ray S, Atkuri KR, Deb-Basu D, Adler AS, Chang HY, Herzenberg LA, and Felsher DW (2006). MYC can induce DNA breaks *in vivo* and *in vitro* independent of reactive oxygen species. *Cancer Res* **66**, 6598–6605.
- [55] Hande P, Slijepcevic P, Silver A, Bouffier S, van Buul P, Bryant P, and Lansdorp P (1999). Elongated telomeres in scid mice. *Genomics* **56**, 221–223.

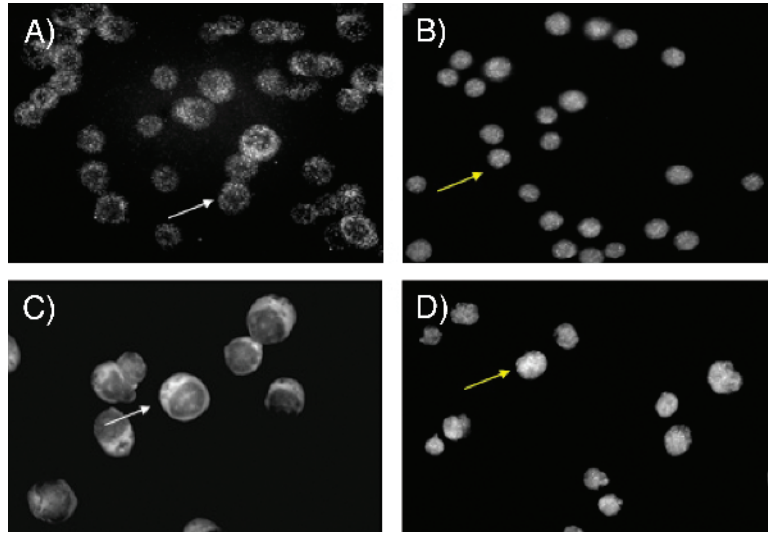


Figure W1. *MycER* activation in *preB* and $\Delta 106$ -carrying *Ba/F3* cells. *preB* cells are shown without (A) and after (B) 4HT activation of *MycER* (see also *Materials and Methods* section). Representative images illustrate $\Delta 106$ -*MycER* activation for $\Delta 106$ -carrying *Ba/F3* cells without (C) and with (D) $\Delta 106$ -*MycER* activation. White arrows (A and C) point to nonactivated cells containing $\Delta 106$ -*MycER* in the cytoplasm of the cell, and yellow arrows (B and D) demonstrate that $\Delta 106$ -*MycER* is translocated to the nucleus on $\Delta 106$ -*MycER* activation.

c-Myc–Dependent Formation of Robertsonian Translocation Chromosomes in Mouse Cells^{1,2}

Amanda Guffei*, Zeldá Lichtensztejn*, Amanda Gonçalves dos Santos Silva^{*,†}, Sherif F. Louis*,
Andrea Caporali^{*,‡,§} and Sabine Mai*

*Manitoba Institute of Cell Biology, The University of Manitoba, CancerCare Manitoba, Winnipeg, MB, Canada; [†]Disciplina de Imunologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia, e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP 04023-062, Brazil; [‡]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico, Università degli Studi di Parma, Parma 43100, Italy

Abstract

Robertsonian (Rb) translocation chromosomes occur in human and murine cancers and involve the aberrant joining of two acrocentric chromosomes in humans and two telocentric chromosomes in mice. Mechanisms leading to their generation remain elusive, but models for their formation have been proposed. They include breakage of centromeric sequences and their subsequent fusions, centric misdivision, mispairing between highly repetitive sequences of p-tel or p-arm repeats, and recombinational joining of centromeres and/or centromeric fusions. Here, we have investigated the role of the oncoprotein c-Myc in the formation of Rb chromosomes in mouse cells harboring exclusively telocentric chromosomes. In mouse plasmacytoma cells with constitutive c-Myc deregulation and in immortalized mouse lymphocytes with conditional c-Myc expression, we show that positional remodeling of centromeres in interphase nuclei coincides with the formation of Rb chromosomes. Furthermore, we demonstrate that c-Myc deregulation in a *myc* box II–dependent manner is sufficient to induce Rb translocation chromosomes. Because telomeric signals are present at all joined centromeres of Rb chromosomes, we conclude that c-Myc mediates Rb chromosome formation in mouse cells by telomere fusions at centromeric termini of telocentric chromosomes. Our findings are relevant to the understanding of nuclear chromosome remodeling during the initiation of genomic instability and tumorigenesis.

Neoplasia (2007) 9, 578–588

Keywords: Centromere, nuclear organization, Robertsonian chromosome, c-Myc, genomic instability.

Introduction

c-Myc deregulation is frequent in human and murine cancers [1–3]. In fact, > 70% of all cancers—including breast, ovarian, prostate, colon, liver, and gastric cancers; neuroblastoma; myeloma; and Burkitt's lymphoma [1,2] (<http://www.myccancergene.org/site/cancerDB.asp>)—have a

known Myc component. Invariably, these cancers display Myc oncoprotein deregulation/overexpression, which is achieved through various mechanisms, such as enhanced mRNA and/or protein stability, *myc* gene amplification, or *myc* activation through chromosomal translocation. Because so many cancers show a direct association with Myc, current research by many groups is dedicated to elucidating the role(s) these oncoproteins play in tumor initiation and promotion [3–5] and to exploring them as potential therapeutic targets [6].

c-Myc is a potent inducer of genomic instability (for reviews, see Kuttler and Mai [5] and Mai and Mushinski [7]). Recently, it has become apparent that c-Myc not only acts on the level of genes [8] and chromatin [9,10] but also actively contributes to the remodeling of chromosome and telomere positions in interphase nuclei [11] (for reviews, see Mai and Garini [12,13]). Remodeling of chromosome positions leads to temporary alterations in the spatial organization of chromosomes in the nucleus. As we have shown recently, nuclear reorganization of telomeres may result in the formation of telomeric aggregates and may lead to the formation of dicentric chromosomes [11]. In this study, transient c-Myc deregulation mediated the formation of telomeric aggregates in interphase nuclei. Telomeric aggregates are clusters of telomeres that cannot be further resolved at a resolution of 200 nm [14]. As assessed by metaphase chromosome preparations, such telomeric aggregates represent, in part, telomeric fusions that generate dicentric chromosomes and initiate breakage–bridge–fusion (BBF) cycles. Louis et al. [11] also demonstrated that chromosomes

Abbreviations: FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SKY, spectral karyotyping; Rb, Robertsonian; 3D, three-dimensional; 2D, two-dimensional; BBF, breakage–bridge–fusion; TCT, telomere–centromere–telomere; CTC, centromere–telomere–centromere

Address all correspondence to: Sabine Mai, Manitoba Institute of Cell Biology, 675 McDermott Avenue, Winnipeg, MB, Canada R3E 0V9. E-mail: smai@cc.umanitoba.ca

¹This article refers to supplementary material, which is designated by “W” (i.e., Figure W1) and is available online at www.bcdecker.com.

²We thank our granting agencies for financial support. These include the National Cancer Institute of Canada, CancerCare Manitoba Foundation, and the Canadian Institutes of Health Research Strategic Training Program “Innovative Technologies in Multidisciplinary Health Research Training.”

³Present address: Bristol Heart Institute, University of Bristol, Bristol Royal Infirmary, Level 7, Upper Maudlin Road, Bristol BS2 8HW, UK.

Received 20 April 2007; Revised 31 May 2007; Accepted 1 June 2007.

Copyright © 2007 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/07/\$25.00
DOI 10.1593/neo.07355

alter their positions when c-Myc is experimentally deregulated. Together, these two events of c-Myc-dependent nuclear remodeling profoundly alter the genomic stability of the cell, directly resulting in BBF cycles and karyotypic abnormalities such as terminal deletions and unbalanced translocations. Consequently, more complex chromosomal changes evolve [11–13].

In this present study, we have investigated whether c-Myc plays an initiating role in the remodeling of centromeric positions in interphase nuclei, using mouse cells. The karyotype of standard laboratory mouse strains consists of 40 telocentric chromosomes. However, some wild-type and laboratory mouse strains contain centromerically fused chromosomes, also known as Robertsonian (Rb) chromosomes [15–18].

The three-dimensional (3D) nuclear organization of mouse centromeres in primary, immortalized, and tumor cells has been recently determined using mouse lymphocytes with telocentric chromosomes [19]. This study showed that nuclear centromeric positions typical of primary mouse lymphocytes are significantly altered in immortalized and malignant mouse lymphocytes. The malignant lymphocytes examined in this study were mouse plasmacytoma cells (i.e., cells with *c-myc* activation through chromosomal translocation). In this present study, we therefore focused on the potential impact of c-Myc on alterations in 3D nuclear distributions of mouse centromeres. We reasoned that nuclear centromere positions might have been altered due to cellular transformation and/or nuclear remodeling as a result of c-Myc oncogene activation. To distinguish between these possibilities, we investigated, using a model of conditional and constitutive c-Myc oncoprotein deregulation, whether c-Myc deregulation was sufficient to mediate changes in 3D nuclear centromere positions. Moreover, we determined whether a potential c-Myc-dependent remodeling of the overall centromere organization permitted the generation of Rb chromosomes. To address the specificity of c-Myc-dependent effects on chromosome organization, we examined $\Delta 106$ -Myc, a *myc* box II deletion mutant Myc protein [20]. The latter does not confer tumorigenic potential when overexpressed in mouse proB lymphocytes (Ba/F3) [21] and is unable to mediate the formation of telomeric aggregates and dicentric chromosomes in these cells [22]. The present study shows that c-Myc, in a *myc* box II-dependent manner, mediates the formation of Rb chromosomes during the remodeling of centromere positions

and by telomere–telomere fusions at the telocentric termini of mouse chromosomes.

Materials and Methods

Cells and Cell Culture Conditions

All cells used are listed in Table 1. Primary splenic lymphocytes and primary plasmacytoma cells (PCT1G1) were directly isolated from mice without any *in vitro* cultivation from T38HxBalb/c mice (Central Animal Care protocol no. 02-039/1/2/3). PreB lymphocytes [11,23] were grown in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin–streptomycin, and 0.1% β -mercaptoethanol (Invitrogen/Gibco, Burlington, ON, Canada) at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Cells were maintained at a density of around 10⁵ to 10⁶ cells/ml. The plasmacytoma cell line MOPC460D (a gift from Dr. J. F. Mushinski, National Institutes of Health) was grown in RPMI 1640 with 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% penicillin–streptomycin (all the above reagents are from Invitrogen/Gibco), and 100 μ l of interleukin-6 hybridoma supernatant per 10-ml plate at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. Ba/F3 cells [20,21] with $\Delta 106$ -MycER were grown in RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington ON, Canada), containing 10% FBS (Gibco, Burlington ON, Canada), 1% WEHI supernatant (interleukin-3), and 0.021% plasmocin (Cayla, Toulouse, France). Cells were grown and maintained at a density of approximately 10⁵ to 10⁶ cells/ml.

Conditional c-Myc Expression

MycER in preB cells and MycER or $\Delta 106$ -MycER in Ba/F3 cells were activated by 4-hydroxytamoxifen (4HT; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) at a final concentration of 100 nM in 10⁵ cells/ml [11]. Cells were split 24 hours prior to induction.

Induction of c-Myc was confirmed by fluorescence immunohistochemistry, as described previously [24]. A cytospin was made for each time point and for positive and negative controls (c-Myc-overexpressing mouse plasmacytoma cells and non-Myc-activated resting B lymphocytes, respectively). Anti-c-Myc (N262) primary antibody was used at a dilution of 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and visualized by goat anti-rabbit IgG fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody at a dilution of

Table 1. List of Cells Used in This Study.

Cells Studied	Characteristics	Karyotype
Primary mouse lymphocytes	Diploid	40,XX in all cells
Immortalized preB cells carrying MycER	Diploid; nontumorigenic in the absence of MycER activation [11,23]	40,XX in all cells
Plasmacytoma cell line MOPC460D	Near-tetraploid; from female BALB/c mouse; tumorigenic [11]	75–82,XXXX,T(12;15)
Primary plasmacytoma cell line PCT1G1	Near tetraploid; v- <i>abl/myc</i> -induced; tumorigenic (unpublished data)	81,XXXX,T(X;11); TsT(X;11)
Immortalized proB cells (Ba/F3)	Near-tetraploid; nontumorigenic; from male BALB/c mouse [20,21]	69–80,XXYY
Carrying MycER	Near-tetraploid; tumorigenic only in the presence of MycER activation [20,21]	69–80,XXYY
Carrying <i>myc</i> box II deletion mutant $\Delta 106$ -MycER	Near-tetraploid; nontumorigenic in the presence or in the absence of $\Delta 106$ -MycER activation [20,21]	69–80,XXYY

More details on these cells can be found in Materials and Methods and in the accompanying references.

1:100 (Sigma-Aldrich). Imaging and analysis were performed as described in Fest et al. [21].

Cell Fixation and Chromosome Preparations

Cells were directly harvested from mice or from cell culture. They were spun down at 200g for 10 minutes and resuspended in 5 ml of 0.075 M KCl for 10 minutes at room temperature for subsequent 3D fixation of nuclei or for 30 minutes at room temperature for chromosome preparation. For 3D fixation, a hypotonic solution was overlaid with 1 ml of freshly prepared fixative (methanol/acetic acid, 3:1), inverted carefully for a couple of times, and centrifuged at 200g for 10 minutes at room temperature. Thereafter, pellets were resuspended with 5 ml of fixative and washed for two more times as above. This fixation method yielded nuclei ready for 3D image acquisition, and results were identical to those with 3.7% formaldehyde fixation, as also stated elsewhere [25]. The ellipsoid nature of lymphocytes was confirmed by confocal microscopy [22].

For chromosome fixation, the drop fixation method [26] was used. For all assays involving metaphase chromosomes, a minimum of twenty metaphases was scored.

Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA-FISH) with Centromeres and Telomeres

PNA-FISH was performed on both 3D interphase and two-dimensional (2D) metaphase samples derived from the above cells. A PNA human centromeric probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was custom-made to the sequences listed below.

The PNA centromere probe sequences used in this study are as follows:

Sequence 1: (N-terminus)Flu-OEE-ATTCGTTGGAAC-GGGA-EE(C-terminus)

Sequence 2: (N-terminus)Flu-OEE-CACAAAGAAGTTT-CTGAG-EE(C-terminus)

Sequence 3: (N-terminus)Flu-OEE-CAGACAGAAGCAT-TCTCA-EE(C-terminus)

Sequence 4: (N-terminus)Flu-OEE-TGCATTCAACTCA-CAGAG-EE(C-terminus).

This probe cocktail hybridized to all mouse centromeres (Figure 3).

A PNA telomeric probe was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). 3D fixed interphase nuclei were fixed onto slides using 3.7% formaldehyde/phosphate-buffered saline. The PNA human centromeric probe was denatured at 80°C for 5 minutes and then added to slides in conjunction with the PNA telomeric probe. The slides were denatured at 80°C for 3 minutes, subsequently hybridized for 2 hours at 30°C using the Hybrite system (Vysis; Abbott Diagnostics, Des Plaines, IL), and then washed in 70% formamide/2×SSC. DAPI (0.1 µg/ml) was applied, and, finally, one drop of Vectashield (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) was added. All slides were imaged right away to avoid changes in imaging conditions and were handled as described in 3D Image Acquisition section.

3D Image Acquisition

Image acquisition was performed on 30 interphase nuclei per cell line using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) and an AxioCam HR charge-coupled device (Carl Zeiss, Inc. Canada). A 63×/1.4 oil objective lens (Carl Zeiss, Inc. Canada) was used at acquisition times of 300 milliseconds for FITC (centromere), 200 milliseconds for Cy3 (telomere), and 20 to 50 milliseconds for DAPI (nuclei). Eighty to 90 z-stacks were acquired at a sampling distance of $xy: 107$ nm and $z:200$ nm for each slice of the stack. Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Inc. Canada) and constrained iterative algorithm [27] were used for deconvolution.

Scoring of Centromere–Telomere Signals in 3D Nuclei

Centromere–telomere hybridization signals were scored as follows: In nuclei with declustered centromeres, telomere signals that flanked centromeres from one or two sides were counted as normal. In contrast, when telomere signals were flanked by centromere signals on two sides, such signals were scored as aberrant. Telomere–centromere–telomere (TCT) signals thus represent a normal nuclear organization, whereas centromere–telomere–centromere (CTC) signals represent an aberrant nuclear organization. Nuclear domains with clustered centromeres were not included in this analysis. Note that telomeric signals at a distance of ≤ 200 nm will be detected as one signal [14].

Spectral Karyotyping (SKY) Analysis

SKY was performed using the ASI (Applied Spectral Imaging, Vista, CA) kit for mice in accordance with the supplier's hybridization protocols. We used the Spectra Cube (ASI) on an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Inc. Canada) with a 63×/1.4 oil objective and the Case Data Manager 4.0 software (ASI) for PC to perform analyses. A minimum of 20 metaphases was examined for preB (induced and noninduced), MOPC460D, T38HxBalb/c, and $\Delta 106$ (induced and noninduced). Metaphases were then analyzed for Rb fusions, and matching control time points were statistically compared using Fisher's exact test. $P < .05$ was considered significant.

Results

Myc and myc Box II–Dependent Nuclear Remodeling of Centromere Positions

The 3D nuclear distribution frequencies of centromeres are significantly changed during immortalization and malignant transformation: Centromeres assume higher distribution frequencies toward central nuclear positions in mouse tumor cells than in immortalized and normal mouse lymphocytes [19]. To determine the consequences of altered centromeric organization for the structural organization of chromosomes, we performed a detailed analysis of the nuclear organization of centromeres and telomeres in primary, immortalized, and malignant mouse lymphocytes (Table 1). These cell lines were chosen to enable the analysis of centromeric positions and their remodeling within the same cell lineage, as cell type–specific variations in centromere

positions do not lend themselves to a direct comparison of their respective centromeric distribution frequencies.

Figure 1 highlights representative images of primary mouse lymphocytes, immortalized mouse preB and proB lymphocytes, and tumor cells (mouse plasmacytoma cells) in the absence or in the presence of constitutive or conditional wild-type or *myc* box II–deletion mutant ($\Delta 106$) Myc expression (Table 1). After dual-color hybridization with centromeres (green) and telomeres (red), the nuclei of primary lymphocytes and immortalized preB cells show a predominantly peripheral organization of centromeres; their telomeres are found throughout nuclear space (Figure 1, A and B). In contrast to this nuclear organization, the nuclei of MOPC460D tumor cells with constitutive deregulation of c-Myc protein due to T(12;15) exhibit a more central nuclear distribution of centromeres (Figure 1C). Their telomeres (red) are shorter, and some are found in close association with centromeres (Figure 1C, yellow arrows; data not shown).

Each telocentric mouse chromosome is expected to have four telomeres because there are four chromatid ends (i.e., two at each end of the long arm and two at the short centromeric end of a chromosome). Therefore, the expected hybridization signals of telomeres and centromeres in mouse interphase nuclei would be found in the following sequence: Telomeres (red) will be observed both adjacent to a centromere (green) and distant from a centromere (Figure 1A, cartoon). This is due to the presence of telomeres at the short and long ends of mouse chromosomes, respectively. Nuclear telomere (red)–centromere (green)–telomere (red) (TCT) signals may also touch each other if a chromosome is bent.

Our data show that primary mouse lymphocytes display expected TCT signals (Figure 1A). Similarly, immortalized preB cells exhibit TCT signals (Figure 1B). However, the nuclei of MOPC460D plasmacytoma cells display a different organization; TCT signals are frequently altered into centromere (green)–telomere (red)–centromere (green) (CTC) signals, suggesting a centromere–centromere association, with telomeric signals bridging the centromeres (Figure 1C, yellow arrows, cartoon, and enlarged CTC images in e) ($P < .0001$).

To examine the 3D distribution patterns of centromeres and telomeres in conditionally Myc-expressing cells, we studied preB cells stably transfected with MycER [11,23] (Table 1). These cells allow for the conditional expression of c-Myc (Figure W1, A and B). Moreover, in the absence of c-Myc activation, these cells are diploid (Table 1). Figure 1, D and E, illustrates the data obtained for preB cells in the absence of MycER activation (D) and in its presence (E). The nuclear organization of CTC is apparent only after

MycER activation (Figure 1E, yellow arrow, cartoon, and zoomed image e) ($P = .02$), suggesting an Myc-dependent nuclear remodeling of centromeres. To verify the Myc dependency of this process, a *myc* box II deletion mutant $\Delta 106$ -MycER was tested under identical conditions (Figure 1, F and G; Figure W1, C and D). This deletion mutant, when overexpressed, is unable to initiate *in vivo* tumorigenesis of spontaneously immortalized proB lymphocytes (Ba/F3) [21]. $\Delta 106$ -MycER did not induce the nuclear remodeling of centromeres, and no CTC signal was found (Figure 1, F and G, cartoon). For the cells studied here, we conclude that the formation of CTC appears to be dependent on the presence of Myc and on the presence of *myc* box II.

c-Myc and myc Box II–Dependent Formation of Rb Chromosomes

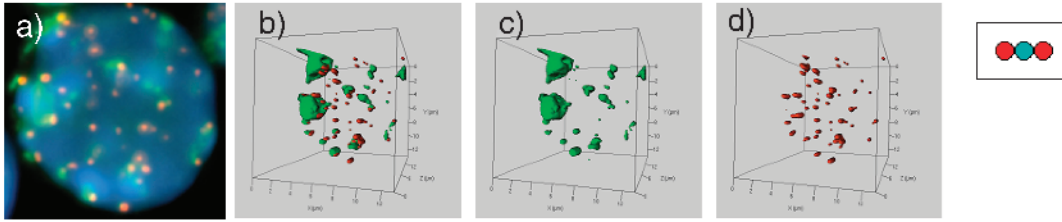
The analysis of TCT *versus* CTC signals in 3D images is complex, and not all potential CTC signals will be found or will be correctly assessed due to the clustering of centromeres at the nuclear periphery (see also Sarkar et al. [19], Solovei et al. [28], and Weierich et al. [29]). We therefore decided to tackle the question of centromere remodeling by molecular cytogenetics. Using this approach, we investigated whether the altered nuclear organization of centromeres impacts on the structural organization of chromosomes, particularly on the formation of Rb chromosomes. In mouse Rb chromosomes, telocentric chromosomes become bimeric due to the fusion of centromeres of the two individual telocentric chromosomes.

To address the question of Rb chromosome formation in our cell models, we performed SKY of primary mouse lymphocytes, mouse plasmacytoma cells (MOPC460D), mouse diploid immortalized preB cells with and without MycER activation, and near-tetraploid mouse BaF/3 cells (immortalized proB cells) in the presence or in the absence of wild-type MycER or $\Delta 106$ -MycER activation (Table 1 and Figure 2; Figure W1). Twenty metaphases were examined for each cell type. In contrast to primary lymphocytes of T38HxBalb/c mice that did not exhibit Rb chromosomes (Figure 2A), MOPC460D tumor cells showed a significant number of Rb chromosomes per metaphase ($P < .0001$): Fifteen of 20 MOPC460D metaphases showed one or more Rb chromosomes; 26 Rb chromosomes were observed in 15 metaphases (Figure 2B, white arrows).

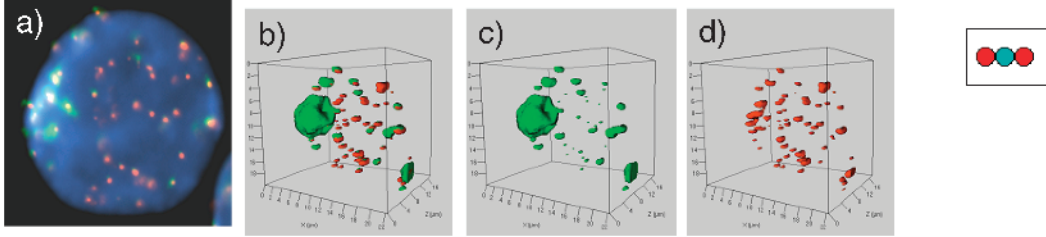
It is noteworthy that MOPC460D cells displayed a non-random involvement of specific chromosomes in the formation of Rb chromosomes, such as chromosomes 1, 3, 8, 14, 15, 17, and X (Table 2). Out of these, chromosome 15 was

Figure 1. Nuclear centromere and telomere distribution patterns. Representative images of dual-color hybridization of mouse lymphocytes with a centromere probe (green) and a telomere probe (red) on interphase nuclei (blue). Panel (A–G) Different lymphocyte cell nuclei: Panel (A) primary lymphocyte nucleus of T38HxBalb/c; Panel (B) nucleus of preB cell; Panel (C) nucleus of MOPC460D; Panel (D) preB cell nucleus without MycER activation 30 hours after mock treatment with ethanol; Panel (E) preB cell nucleus 30 hours after MycER activation; Panel (F) Ba/F3 cell nucleus without $\Delta 106$ -MycER activation 30 hours after mock treatment with ethanol; Panel (G) Ba/F3 cell nucleus 30 hours after $\Delta 106$ -MycER activation. Each panel illustrates a nucleus in 2D Panel (A–G, a) and in 3D Panel (A–G, b–d). Among 3D panels, (b) represents dual-color hybridization, with centromeres in green and telomeres in red; (c) illustrates centromeric signals only; and (d) shows telomeric hybridization signals. Panels (C and E, e) Enlarged 3D views of CTC hybridization signals (green–red–green) that are also highlighted by yellow arrows in Panel (C) and Panel (E), respectively. In addition, telomere–centromere hybridization signals are highlighted in small cartoons on the right side of each panel. Scale bars are given in 3D panels and represent sizes in nanometers.

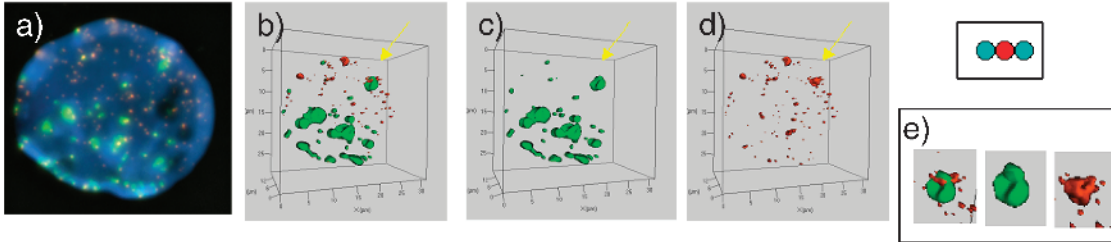
Panel A



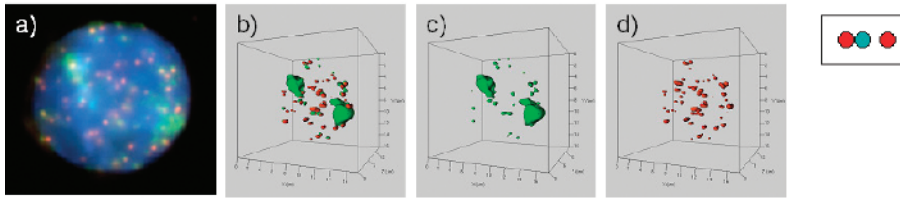
Panel B



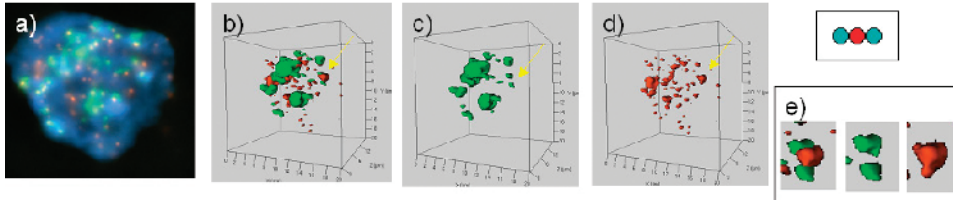
Panel C



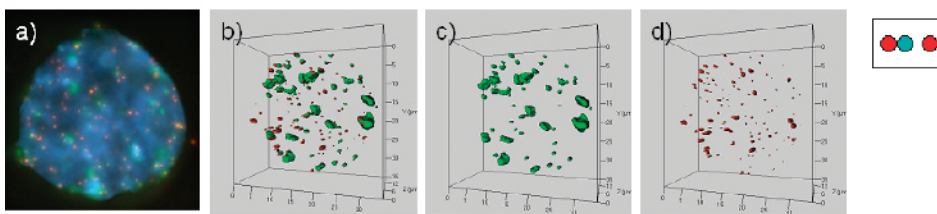
Panel D



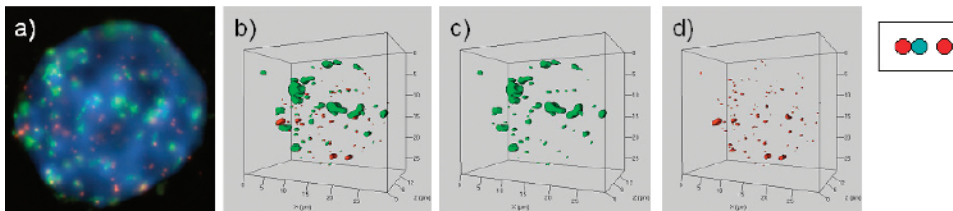
Panel E



Panel F



Panel G



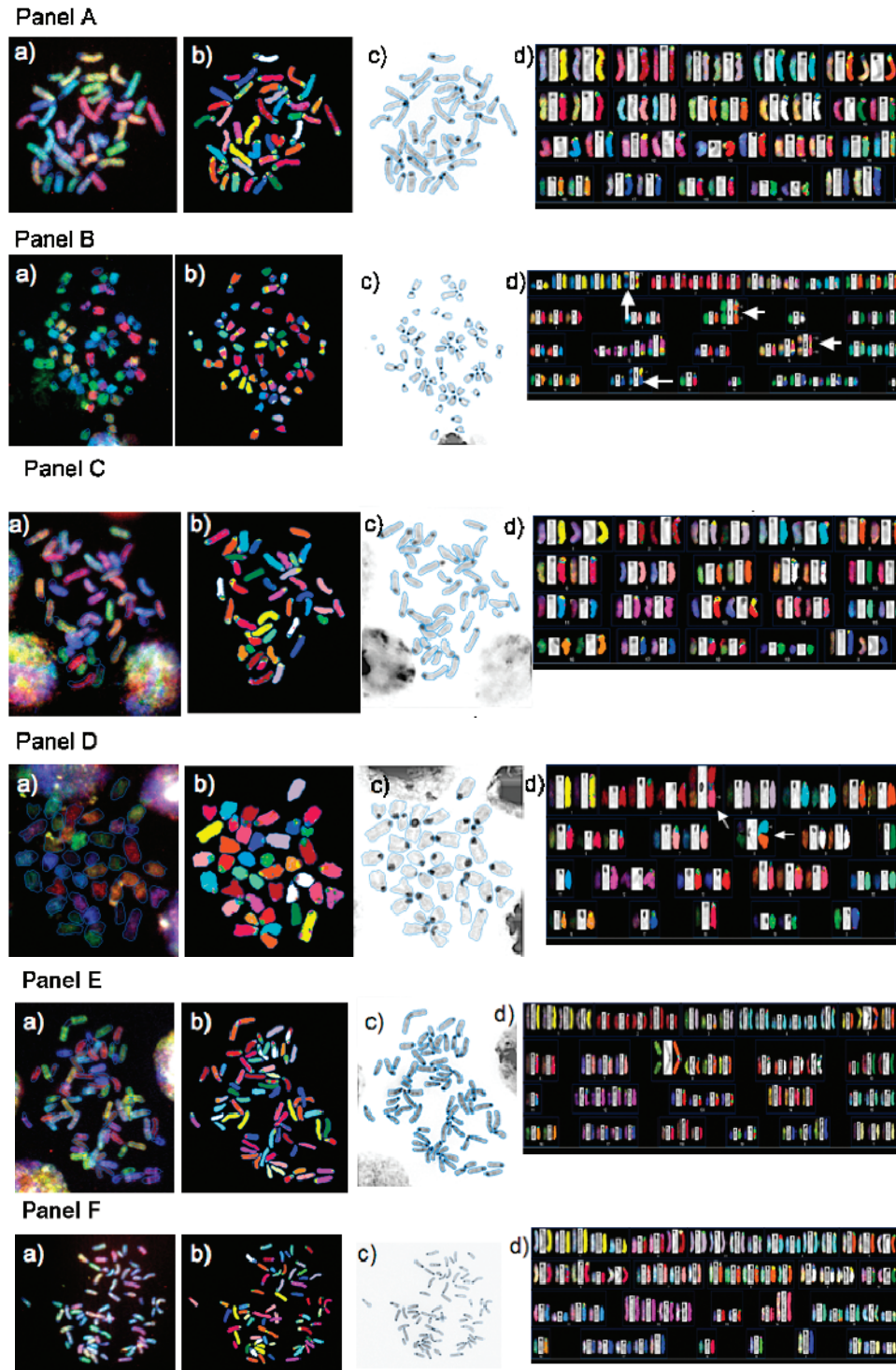


Figure 2. SKY of metaphases derived from the cells of this study. Representative images from SKY analyses are shown: Panel (A) primary lymphocytes from T38HxBalb/c mice; Panel (B) MOPC460D; Panels (C and D) preB cells in the absence Panel (C) or in the presence Panel (D) of MycER activation; Panels (E and F) Ba/F3 $\Delta 106$ -MycER without Panel (E) or with Panel (F) $\Delta 106$ -MycER activation. White arrows point to Rb fusion chromosomes. The Rb (8;8) in Ba/F3 cells is constitutional and has been noted previously [21]. Each panel shows a representative image for each cell type; however, layout is the same for all: (a) the raw image of a metaphase; (b) the classified image of the metaphase; (c) the inverted DAPI-banded image of the metaphase; and (d) the karyotype table of the metaphase.

most frequent (found 24 times in Rb fusions in the 15 Rb chromosome-carrying metaphases), followed by chromosomes 1 and 14 (found 21 times in 15 Rb chromosome-carrying metaphases) (Table 2).

To analyze the impact of Myc on the formation of Rb chromosomes, we used preB cells and studied them in the absence

and in the presence of MycER activation (Figure 2, Panels C and D, respectively). Although non-MycER-activated preB cells did not exhibit Rb chromosomes (Figure 2, Panel C), MycER-activated preB cells showed Myc-dependent formation of Rb chromosomes. Thirty-three percent of metaphases (6/20) showed formation of Rb chromosomes within 30 hours

Table 2. Summary of Chromosomes Participating in the Formation of Rb Chromosomes in MOPC460D Cells in a Nonrandom Manner.

Chromosome Number	Times Involved in Rb Fusions	<i>P</i>
1	21	< .0001
3	11	.001
8	18	< .0001
14	21	< .0001
15	24	< .0001
17	14	.0001
X	11	.001

The numbers given are derived from the analysis of 20 metaphases. Fifteen of these 20 metaphases carried one or more Rb chromosomes. The involvement of each chromosome in the formation of Rb chromosomes is given, and the respective significance is indicated. For further details, see text and Materials and Methods section.

(Figure 2, Panel D, arrows; $P = .02$). During this observation period, we did not note any specific chromosome combinations that were involved in the formation of Rb chromosomes.

The Myc dependency of this structural chromosomal change was confirmed with the *myc* box II deletion mutant $\Delta 106$. The conditional expression of $\Delta 106$ -MycER did not lead to the formation of Rb chromosomes in Ba/F3 cells (Figure 2, Panels E and F, respectively), whereas the induction of wild-type MycER in Ba/F3 cells did. Chromosomes X and 5 were most frequently involved in the formation of Rb chromosomes subsequent to wild-type MycER activation of Ba/F3 cells ($P = .0001$ and $P = .02$, respectively, 30 hours after Myc activation) (data not shown).

The above data suggest that: 1) nuclear centromere organization impacts on chromosomal order permitting the formation of Rb chromosomes; and 2) Myc deregulation leads to the formation of Rb chromosomes in a *myc* box II-dependent manner.

Rb Chromosomes Form By Centromere–Telomere–Fusion in an Myc-Dependent Manner

Using dual-color FISH with centromeres and telomeres on metaphase chromosomes, we next examined whether the Rb chromosomes seen displayed centromere–telomere fusions. Using the cell lines listed in Table 1, we analyzed 20 metaphases per cell type and determined the presence of telomeric signals at the fusion points of centromeres in Rb fusion chromosomes (Figure 3). We noted the presence of telomeric hybridization signals on Rb chromosomes formed after MycER activation in preB cells (Figure 3, Panel E, arrows and zoomed images), MOPC460D cells (Figure 3, Panel B, arrows and zoomed images), and PCT1G1 cells (a primary mouse plasmacytoma cell line; Figure 3, Panel C, (arrows and zoomed images)). In contrast, no Rb chromosomes were seen in primary lymphocytes (Figure 3, Panel A), non-MycER-activated preB cells (Figure 3, Panel D), or $\Delta 106$ -MycER-activated and control Ba/F3 cells (Figure 3, Panels G and F, respectively). We conclude that constitutive or conditional wild-type Myc deregulation, but not deregulated $\Delta 106$ -Myc protein expression, led to the formation

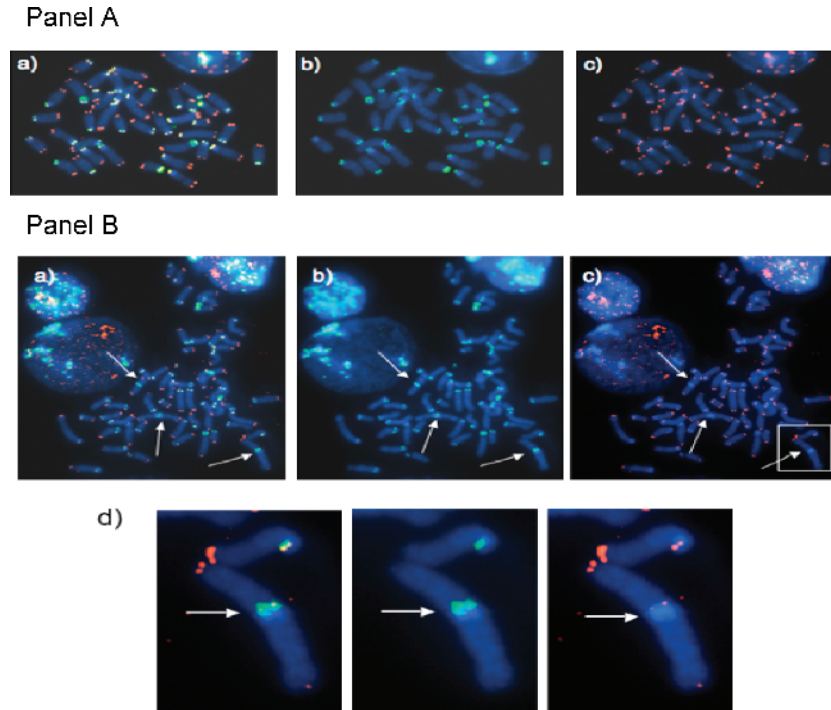


Figure 3. Centromere–telomere FISH performed on metaphases of mouse lymphocytes. Representative images are shown: Panel (A) primary lymphocyte metaphase from a T38HxBalb/c mouse; Panel (B) metaphase of MOPC460D; Panel (C) partial metaphase of the primary mouse plasmacytoma PCT1G1; Panel (D) preB cell metaphase without MycER activation; Panel (E) preB metaphase 30 hours after MycER activation; Panel (F) Ba/F3 cells without $\Delta 106$ -MycER activation; Panel (G) Ba/F3 cells 30 hours after $\Delta 106$ -MycER activation. In each panel, (a) represents dual-color FISH hybridization signals of telomeres (red) and centromeres (green); (b) shows only centromeric signals; and (c) shows only telomeric signals. Rb chromosomes shown in Panel (B), Panel (C), and Panel (E) are highlighted with white boxes and arrows, and then enlarged (d) to observe CTC signals. Note small telomeric signals at Rb fusion in Panel (B, d). The overall telomeric length in MOPC460D is reduced in comparison to the telomeric length of primary B cells and preB cells (data not shown; Figure 1, Panel C).

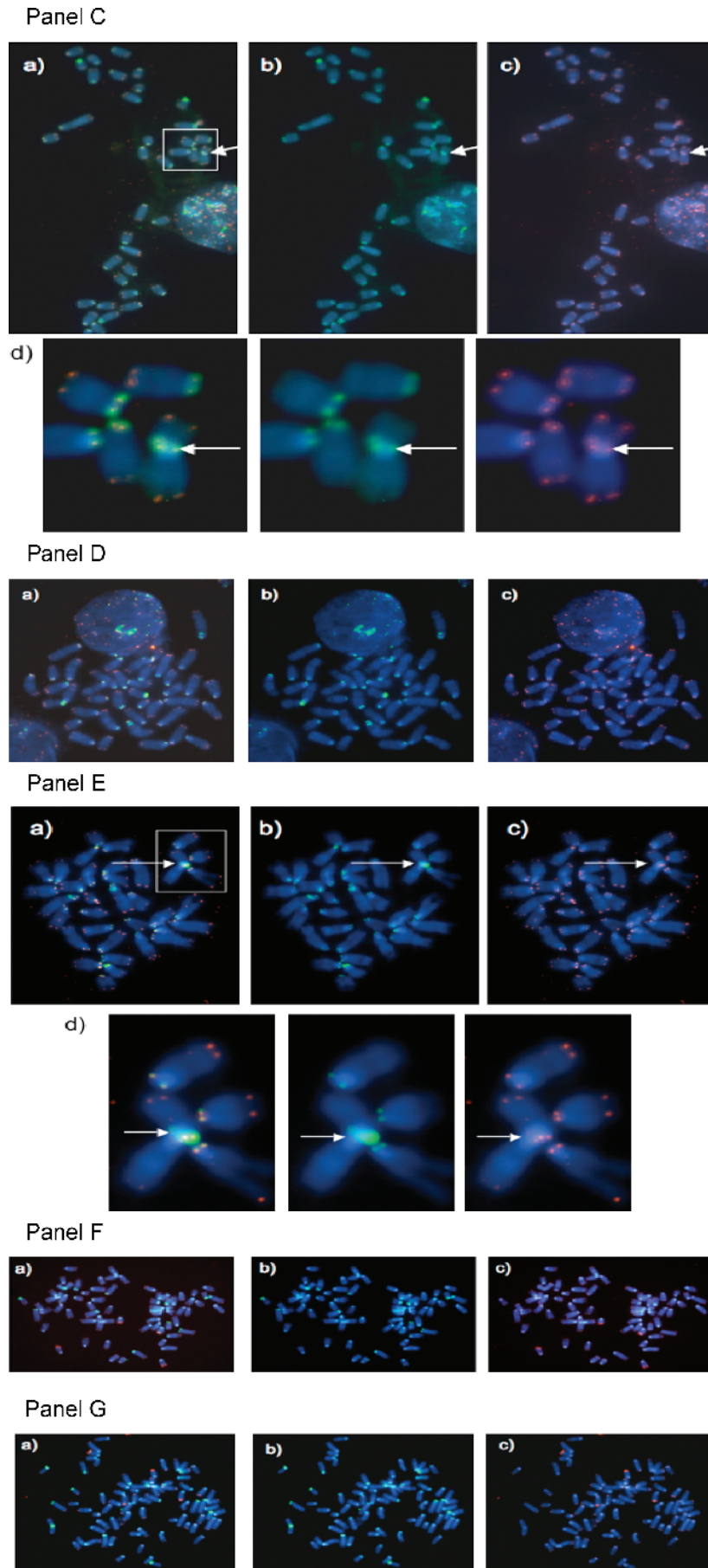


Figure 3. (continued).

of Rb chromosomes that carry telomeric signals at their fusion points.

The above data further suggest that critically shortened telomeres are unlikely to cause the formation of Rb translocation chromosomes in this experimental setting. Instead, it is likely that c-Myc–dependent uncapping of telomeric sequences plays an initiating role in this event. This conclusion is very likely due to the short time period required to permit such fusions: 30 hours after a single c-Myc deregulation were sufficient to allow for the formation of Rb translocation chromosomes that carry telomeric signals in fused centromeres. The latter was observed for both preB and Ba/F3 cells.

Discussion

Rb Chromosomes in Different Species and in Cancer

Rb chromosomes represent structural genetic changes that occur in many species, including plants [30], cattle [31], some strains of mice [16,32], fish [33], and humans [34]. In humans, such Rb chromosomes are among the most common structural aberrations in aborted fetuses and newborns [35–37]. Moreover, Rb chromosomes in humans have been found as acquired or constitutional genetic lesions in hematologic cancers [34,38] and in solid tumors [39,40]. In addition, they have been reported at the onset of acute myelogenous leukemia [41].

Does It Matter to Have De Novo Rb Chromosomes in a Cell?

One could assume that Rb chromosomes merely remodel nuclear organization, thereby placing two chromosomes into a “forced” unit and into a new nuclear position or environment, without any further impact on the cell. Several lines of evidence suggest, however, that this new fused entity can be different and that the remodeling of two chromosomes into one Rb chromosome may possibly have wide-ranging effects. For example, it has been described that the formation of an Rb chromosome suppresses somatic recombination [42]. Another study linked Rb chromosomes to altered nuclear architecture and subfertility in mice [43]. In tumor induction studies with Rb-carrying or non-Rb-carrying BALB/c mice and congenics, it has been shown that the type of c-myc–activating chromosomal translocations in mouse plasmacytoma cells is altered in Rb6.15–carrying mice compared to BALB/c mice with telocentric chromosomes [44]. In humans, Rb translocations occur between acrocentric chromosomes of the D and G groups 13–15 and 21–22. These Rb translocations most frequently involve chromosomes 13 and 14. Carriers of such chromosomes are at risk for chromosomal nondisjunction leading to offspring with trisomy or uniparental disomy (UPD) following pregnancy rescue. Although UPD for chromosomes 13, 21, and 22 does not show apparent phenotypes, UPD for chromosomes 14 and 15 results in abnormal phenotypes [37]. Altogether, the above data suggest that a nuclear reorganization of two single chromosomes into one Rb chromosome may have a broad impact on the overall

physiological state of Rb-carrying cells, on the function of the organism, and on oncogenesis.

Randomness and Nonrandomness of Rb Chromosomes Formed

Our present data show that mouse plasmacytoma cells (MOPC460D) with constitutive c-Myc deregulation and in long-term culture develop significant numbers of Rb chromosomes. Specific Rb chromosomes are found more frequently than others. For example, chromosomes 1, 3, 8, 14, 15, 17, and X are involved in Rb translocations almost all the time, although with different individual frequencies (Table 2). It is possible that the nonrandom composition of Rb fusions was selected during long-term culture, in combination with constitutively elevated levels of c-Myc protein. However, the above data also support current concepts suggesting that chromosomal proximity in interphase nuclei is required for intrachromosomal rearrangements (for review, see Meaburn et al. [45]). One could therefore assume that those chromosomes that were involved in Rb fusions more often than others resided in centromere clusters or in close nuclear proximity to each other in interphase nuclei. In fact, a previous study undertaken by our group suggested that specific chromosomes involved in unbalanced translocations were found in close nuclear proximity, showing considerable overlap as a result of c-Myc deregulation [11]. Moreover, studies into the 3D organization of centromeres suggest that their distribution is altered in tumor cells such as MOPC460D, where centromeres are no longer found with high frequency toward the nuclear periphery (as is commonly observed for primary lymphocytes) but are instead located in a more central nuclear space [19]. If we also consider that mouse chromosomes have a > 99% sequence homology in their telocentric regions [46], fusion events become very possible. They have indeed been reported in detail for *Mus musculus* speciation [15–18]. Thus, we propose that chromosomal positions and telocentric sequences contribute to both the specificity and the randomness of Rb chromosome formation in mouse cells. In accordance with this notion, we have observed that a single MycER activation in preB cells led to the formation of Rb chromosomes but did not result in the generation of nonrandom combinations of Rb chromosomes. Of note, PCT1G1, a primary plasmacytoma cell line that displayed Rb chromosomes (Table 1 and Figure 3), also did not show nonrandom constitution of Rb chromosomes, whereas a single wild-type MycER activation in Ba/F3 cells led to preferential formation of certain Rb chromosome combinations. From these findings, we conclude that c-Myc deregulation permits the formation of random and nonrandom Rb chromosomes within the given context of nuclear chromosomal and centromeric positions and of telocentric sequences.

Mechanisms of Rb Chromosome Formation in the Context of c-Myc–Dependent Oncogenic Nuclear Remodeling

Previous studies have suggested that Rb chromosomes form after recombination [46,47], centric misdivision and rejoining [30], or fusion [48]. Our data support the concept of fusion but add a new dimension: Rb fusions are initiated by

c-Myc oncogene deregulation and depend on *myc* box II. After c-Myc deregulation, Rb chromosomes are generated when centromeric telomeres of mouse telocentric chromosomes fuse. This telomeric fusion is a direct consequence of the recently described Myc-dependent formation of telomeric aggregates [11] and of the nuclear remodeling of centromeres (this study and Sarkar et al. [19]). In this context, c-Myc-induced telomeric aggregates will lead to end-to-end fusions of telomeres on both ends of the chromosomes. Telocentric telomere fusions will generate Rb chromosomes, whereas telomeric fusions of the long arms of two chromosomes will create dicentric chromosomes. The latter usually initiates BBF cycles, which we have described recently [11].

The novel finding of this study, thus, is a direct link between Rb chromosome formation and c-Myc deregulation that occurs in a *myc* box II-dependent manner and through telomeric fusions at telocentric ends of mouse chromosomes. Whether previously observed mouse and rat Rb fusions involve *myc* box II and telomeric fusions is currently unknown. For example, Rb chromosomes were observed in Rat1A fibroblasts [49,50] and in transgenic MMTV-*myc*/p53 mice [51]. One of the primary tumors that formed in these mice, 67a5, contained RbX.15 and Rb11.15 [51]. Furthermore, Rb chromosomes were common in a model of mouse skin tumorigenesis (unpublished data).

Theoretically, the c-Myc-dependent telomere-mediated centromeric fusion process that creates mouse Rb chromosomes does not require additional mechanisms. However, it is likely that c-Myc's ability to induce DNA breaks [52–54] may contribute to a second molecular pathway of Rb chromosome formation. Whether the latter mechanism would act alone or in concert with the former is currently unknown.

The requirement of *myc* box II for mouse Rb chromosome formation confirms that the process of Rb chromosome formation is Myc-dependent and involves telomeric fusions [22]. The present study opens new avenues into investigations about *myc* box II-related Myc-cooperating proteins that may play a role in this Myc-induced nuclear remodeling of centromeres.

Finally, this study highlights the fact that c-Myc-dependent telomeric fusions at telocentric mouse chromosomes do not require critically short telomeres. This conclusion is based on the following: 1) compared to human telomeres, mouse telomeres are long (in the range of 20–60 kb, depending on the mouse strain) [55]; and 2) telomeric fusions at telocentric chromosomes occurred within 30 hours of experimentally induced c-Myc deregulation. This fact precludes the idea that, in this experimental context, after multiple divisions and/or mouse generations, telomeres reached a critically short state that predisposed them to fusions. Instead, these findings suggest a direct impact of c-Myc on the capping of telomeres. Future studies will address these potential interactions.

Acknowledgement

We thank Francis Wiener for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Nesbit CE, Tersak JM, and Prochownik EV (1999). *MYC* oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004–3016 (Review).
- [2] Popescu NC and Zimonjic DB (2002). Chromosome-mediated alterations of the *MYC* gene in human cancer. *J Cell Mol Med* **6**, 151–159 (Review).
- [3] Arvanitis C and Felsher DW (2006). Conditional transgenic models define how *MYC* initiates and maintains tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* **16**, 313–317 (Epub 2006 Jul 21).
- [4] Lutz W, Leon J, and Eilers M (2002). Contributions of *Myc* to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1602**, 61–71 (Review).
- [5] Kuttler F and Mai S (2006). c-Myc, genomic instability and disease. In *Vol 1: Genome Dynamics. Genome and Disease*. J–N Volf (Ed). Karger Publishers, Würzburg, Germany, pp. 171–191.
- [6] Vita M and Henriksson M (2006). The *Myc* oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 318–330 (Review; Epub 2006 Aug 3).
- [7] Mai S and Mushinski JF (2003). c-Myc-induced genomic instability. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **22**, 179–199 (Review).
- [8] Oster SK, Ho CS, Soucie EL, and Penn LZ (2002). The *myc* oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* **84**, 81–154 (Review).
- [9] Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, and Amati B (2003). *MYC* recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* **4**, 575–580.
- [10] Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gaikens PR, McMahon SB, and Eisenman RN (2006). *Myc* influences global chromatin structure. *EMBO J* **25**, 2723–2734 (Epub 2006 May 25).
- [11] Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztein Z, Kuttler F, Chuang TC, Moshir S, Mougey V, et al. (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9613–9618.
- [12] Mai S and Garini Y (2005). Oncogenic remodeling of the three-dimensional organization of the interphase nucleus: c-Myc induces telomeric aggregates whose formation precedes chromosomal rearrangements. *Cell Cycle* **4**, 1327–1331 (Epub 2005 Oct 5).
- [13] Mai S and Garini Y (2006). The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem* **97**, 904–915 (Review).
- [14] Chuang TC, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, van den Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, et al. (2004). The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol* **3**, 2–12.
- [15] Gropp A, Winking H, Redi C, Capanna E, Britton-Davidian J, and Noack G (1982). Robertsonian karyotype variation in wild house mice from Rhaeto-Lombardia. *Cytogenet Cell Genet* **34**, 67–77.
- [16] Gazave E, Catalan J, Ramalhinho Mda G, Mathias Mda L, Nunes AC, Dumas D, Britton-Davidian J, and Auffray JC (2003). The non-random occurrence of Robertsonian fusion in the house mouse. *Genet Res* **81**, 33–42.
- [17] Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, and Redi CA (2001). Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 171–175.
- [18] Capanna E and Castiglia R (2004). Chromosomes and speciation in *Mus musculus domesticus*. *Cytogenet Genome Res* **105**, 375–384.
- [19] Sarkar R, Guffei A, Vermolen BJ, Garini Y, and Mai S (2007). Alterations in centromere positions in immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry Part A* **71** (6), 386–392.
- [20] Fest T, Mougey V, Dalstein V, Hagerty M, Milette D, Silva S, and Mai S (2002). c-MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis. *Oncogene* **21**, 2981–2990.
- [21] Fest T, Guffei A, Williams G, Silva S, and Mai S (2005). Uncoupling of genomic instability and tumorigenesis in a mouse model of Burkitt's lymphoma expressing a conditional box II-deleted *Myc* protein. *Oncogene* **24**, 2944–2953.
- [22] Caporali A, Wark L, and Mai S (2007). Telomeric aggregates and end-to-end chromosomal fusions require myc box II. *Oncogene* **26**, 1398–1406 (Epub 2006 Sep 4).
- [23] Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, Kuschak TI, Paul JT, Littlewood TD, Mischak H, Stevens LM, Henderson DW, and Mushinski JF (1999). Chromosomal and extrachromosomal instability of the *cyclin D2* gene is induced by *Myc* overexpression. *Neoplasia* **1**, 241–252.
- [24] Fukasawa K, Wiener F, Vande Woude GF, and Mai S (1997). Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* **11**, 1295–1302.
- [25] Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, and

- Misteli T (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet Genome Res* **105**, 292–301.
- [26] Mai S and Wiener F (2002). Murine FISH. In *FISH: A Practical Approach*. B Beatty, S Mai, and J Squire (Eds). Oxford University Press, Oxford. pp. 55–67.
- [27] Schaefer LH, Schuster D, and Herz H (2001). Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc* **204**, 99–107.
- [28] Solovei I, Schermelleh L, Düring K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C, and Cremer T (2004). Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* **112**, 410–423.
- [29] Weierich C, Brero A, Stein S, von Hase J, Cremer C, Cremer T, and Solovei I (2003). Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res* **11**, 485–502.
- [30] Friebe B, Zhang P, Linc G, and Gill BS (2005). Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet Genome Res* **109**, 293–297.
- [31] Mastromonaco GF, Coppola G, Crawshaw G, DiBerardino D, and King WA (2004). Identification of the homologue of the bovine Rob(1;29) in a captive gaur (*Bos gaurus*). *Chromosome Res* **12**, 725–731.
- [32] Nachman MW and Searle JB (1995). Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends Ecol Evol* **10**, 397–402.
- [33] Gold JR and Gall GA (1975). Chromosome cytology and polymorphism in the California High Sierra golden trout (*Salmo aguabonita*). *Can J Genet Cytol* **17**, 41–53.
- [34] Welborn J (2004). Acquired Robertsonian translocations are not rare events in acute leukemia and lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* **151**, 14–35.
- [35] Jacobs PA (1981). Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. *Am J Hum Genet* **33**, 44–54.
- [36] Nielsen J and Wohler M (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Århus, Denmark. *Hum Genet* **87**, 81–83.
- [37] Kim SR and Shaffer LG (2002). Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test* **6**, 163–168.
- [38] Qian J, Xue Y, Sun J, Guo Y, Pan J, Wu Y, Wang W, and Yao L (2002). Constitutional Robertsonian translocations in (9;22)-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* **132**, 79–80.
- [39] Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schrock E, Hilgenfeld E, and Ried T (2001). Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 349–363.
- [40] Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thoner P, and Squire JA (2003). Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 19 and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7–16.
- [41] Shimokawa T, Sakai M, Kojima Y, and Takeyama H (2004). Acute myelogenous leukemia (M5a) that demonstrated chromosomal abnormality of Robertsonian 13;21 translocation at onset. *Intern Med* **43**, 508–511.
- [42] Haigis KM and Dove WF (2003). A Robertsonian translocation suppresses a somatic recombination pathway to loss of heterozygosity. *Nat Genet* **33**, 33–39 (Epub 2002 Nov 25).
- [43] Garagna S, Zuccotti M, Thornhill A, Fernandez-Donoso R, Berrios S, Capanna E, and Redi CA (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci* **114**, 4429–4434.
- [44] Silva S, Wiener F, Klein G, and Janz S (2005). Location of Myc, Igh, and Igk on Robertsonian fusion chromosomes is inconsequential for Myc translocations and plasmacytoma development in mice, but Rb(6.15)-carrying tumors prefer Igk–Myc inversions over translocations. *Genes Chromosomes Cancer* **42**, 416–426.
- [45] Meaburn KJ, Misteli T, and Soutoglou E (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* **17**, 80–90 (Epub 2006 Oct 26).
- [46] Kalitsis P, Griffiths B, and Choo AKH (2006). Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 8786–8791.
- [47] Hecht F, Morgan R, and Hecht BK (1988). Robertsonian chromosome recombinations are rare in cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **35**, 79–81.
- [48] Slijepcevic P (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. *Chromosoma* **107**, 136–140.
- [49] Mai S, Fluri M, Siwarski D, and Huppi K (1996). Genomic instability in MycER-activated Rat1A–MycER cells. *Chromosome Res* **4**, 365–371.
- [50] Felsher DW and Bishop JM (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 3940–3944.
- [51] McCormack SJ, Weaver Z, Deming S, Natarajan G, Torri J, Johnson MD, Liyanage M, Ried T, and Dickson RB (1998). Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16**, 2755–2766.
- [52] Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, and Wahl GM (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**, 1031–1044.
- [53] Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J, and Felsher DW (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9974–9979 (Epub 2003 Aug 8).
- [54] Ray S, Atkuri KR, Deb-Basu D, Adler AS, Chang HY, Herzenberg LA, and Felsher DW (2006). MYC can induce DNA breaks *in vivo* and *in vitro* independent of reactive oxygen species. *Cancer Res* **66**, 6598–6605.
- [55] Hande P, Slijepcevic P, Silver A, Bouffier S, van Buul P, Bryant P, and Lansdorp P (1999). Elongated telomeres in scid mice. *Genomics* **56**, 221–223.

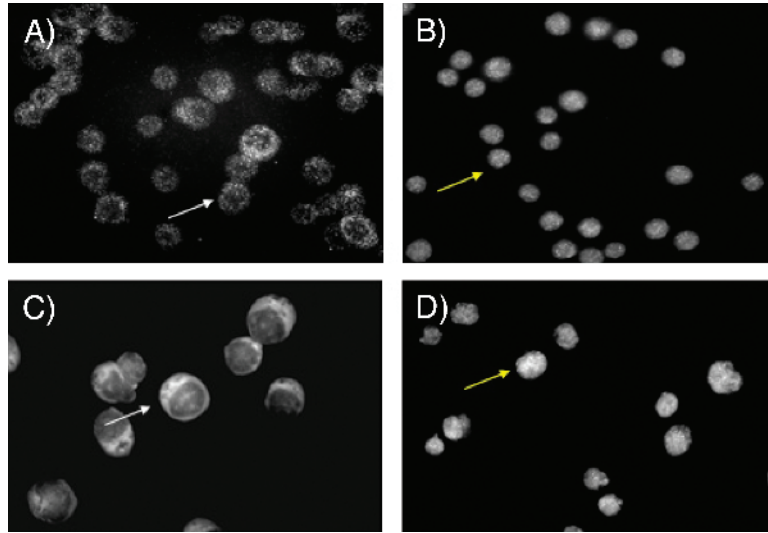


Figure W1. *MycER* activation in *preB* and $\Delta 106$ -carrying *Ba/F3* cells. *preB* cells are shown without (A) and after (B) 4HT activation of *MycER* (see also *Materials and Methods* section). Representative images illustrate $\Delta 106$ -*MycER* activation for $\Delta 106$ -carrying *Ba/F3* cells without (C) and with (D) $\Delta 106$ -*MycER* activation. White arrows (A and C) point to nonactivated cells containing $\Delta 106$ -*MycER* in the cytoplasm of the cell, and yellow arrows (B and D) demonstrate that $\Delta 106$ -*MycER* is translocated to the nucleus on $\Delta 106$ -*MycER* activation.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)