

Trisomy for chromosome 7 in colorectal neoplasia

Citation for published version (APA):

Herbergs, P. J. (1996). *Trisomy for chromosome 7 in colorectal neoplasia*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19960530ph>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19960530ph](https://doi.org/10.26481/dis.19960530ph)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

8

Summary

This thesis deals, firstly, with the technical improvement of protocols for the simultaneous detection of phenotypic and genotypic markers using immunocytochemistry (ICC) in combination with fluorescence in situ hybridization (FISH). Secondly, advances for analysis of FISH signals in tissue sections of colorectal cancer are described. Thirdly, chromosomal aberrations in colorectal adenomas and carcinomas are analyzed by FISH. Finally, the aberrant cell type is determined.

In a general introduction (chapter 1), the genomic changes sofar detected by DNA flow cytometry, karyotyping analysis and molecular genetics in colorectal neoplasia are described. On basis of the data obtained by these techniques several models are postulated, which describe a putative sequence of alterations during colorectal tumorigenesis.

In chapter 2 a protocol is described for the combination of ICC and FISH, which is applied for the simultaneous detection of phenotypic and genotypic markers. For ICC the alkaline phosphatase (APase)-Fast Red reaction is used, which has major advantages in combination with FISH. These advantages include an accurate protein localization, a stable reaction product during pepsin pre-treatment and during the entire FISH procedure, as well as favourable slow fading properties of the strong fluorescent signal of the Fast Red precipitate. Since extensive proteolytic digestion necessary for FISH can be applied to such preparations, autofluorescence is drastically reduced. Simultaneous use of the red fluorescent Fast Red precipitate and FITC or AMCA fluorochromes allows multiparameter detection of cell cycle parameters, as well as genotypic and phenotypic markers of tumor cells. The development of these methods is a prerequisite for the analysis of genomic changes in tissue sections of colon tumors and for the determination of the phenotype of the aberrant cell types.

In chapter 3 a method is described to improve the analysis of FISH signals in tissue sections, since evaluation of FISH signals in interphase nuclei of thin tissue sections from colon is hampered by truncation of the nuclei and a significant overlap of adjoining nuclei. The described method is based on a combination of lamin ICC and single- or double target FISH. The lamin ICC step reduces nuclear overlap by delineating nuclear contours, but also by physical trapping of the DNA and hence makes it possible to seperately recognize adjoining nuclei. This method allows analysis of FISH signals in individual nuclei and can be used to investigate genomic changes in different tumor compartments. The results, however, always involve an underestimation of the real chromosome copy numbers due to truncation of the nuclei.

Trisomy for chromosome 7 clearly is the most frequently occurring chromosomal aberration detected in a series of 46 colorectal adenomas and 23 carcinomas, as shown in chapters 4 and 5. In normal colonic epithelium trisomy for chromosome 7 is not detected, but in adenomas the aberration is found in about 30% of the investigated cases. In carcinomas gain of chromosome 7 is found in an even higher frequency, i.e., about 60% of all investigated cases. On basis of their DNA content the investigated carcinomas can be divided into two groups: a (near)diploid and a hypotetraploid group. In the (near)diploid carcinomas gain of chromosome 7 occurs in 80% of the tumors, either as the sole detected chromosomal aberration or in combination with other aberrations. In the hypotetraploid tumors, however, especially loss of chromosomes 17 and 18 are detected, while gain of chromosome 7 (as related to the DNA content) is detected in only one case. On basis of these results a novel model for colon tumorigenesis is conceived, suggesting two routes. One route involving trisomy for chromosome 7 at an early stage and another route involving loss of chromosomes 17 and/or 18, combined with DNA endoreduplication, resulting in hypotetraploid tumors.

To determine the cell type containing trisomy for chromosome 7 in cell suspensions of adenomas, cytokeratin ICC and FISH with a centromere specific probe for chromosome 7 are combined (chapter 4). It is demonstrated that trisomy for chromosome 7 is found in the epithelial cells, but the presence of trisomy 7 in stromal cells could at that stage not be excluded. In chapter 6, however, the presence of trisomy for chromosome 7 is exclusively demonstrated in the epithelial compartments of colon neoplasia using double-target FISH in frozen tissue sections, which are immunostained for cytokeratin or vimentin. Chromosomal aberrations are detected by ratio analysis of FISH signals for chromosomes 7 and 17.

In addition, the presence of trisomy for chromosome 7 is demonstrated in the different lineages of epithelial differentiation present in colon neoplasia, namely the columnar, goblet, and neuroendocrine cells, which are ICC stained with antibodies against villin, Parla_m 3 and Chromogranin A, respectively. The detection of trisomy for chromosome 7 in these different cell types indicates the origin of this aberration in the stem cell compartment.

From our investigations we conclude that trisomy for chromosome 7 is increasingly found in the colorectal adenoma-carcinoma sequence, suggesting this genomic aberration to be a prognostically unfavourable characteristic in adenomas. Furthermore, according to our postulated model for colon

tumorigenesis, trisomy for chromosome 7 is particularly found in the pathway, during which no endoreduplication occurs. We also demonstrate that the anomaly is exclusively found in the epithelial compartment of colonic neoplasia and not in the stromal cells. It probably occurs at the level of the stem cell since it is found in all three epithelial cell lineages that can be distinguished by ICC in colorectal cancer. In the epilogue (chapter 7) possible future directions of research are discussed to more definitively establish the significance of trisomy for chromosome 7 in the colorectal tumorigenesis.

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft allereerst de technische verbeteringen noodzakelijk voor simultane detectie van zowel fenotypische alsook genotypische karakteristieken van tumorcellen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van gecombineerde immunocytochemie (ICC) en fluorescentie in situ hybridizatie (FISH). Deze methodiek kan onder andere gebruikt worden voor een directe analyse van FISH signalen in weefselcoupes van colorectale tumoren. Vervolgens is een overzicht gegeven van de chromosomale afwijkingen die m.b.v. de FISH techniek zijn gevonden in colorectale adenomen en carcinomen. Tenslotte is bepaald welk celtype afwijkend is in de tumoren.

In een algemene inleiding (hoofdstuk 1) zijn de genetische afwijkingen beschreven zoals die tot dusver in colorectale tumoren gedetecteerd zijn m.b.v. DNA flow cytometry, karyotypering en moleculair genetische technieken. Op basis van de data verkregen met deze technieken zijn verschillende hypothetische modellen opgesteld die een mogelijke volgorde van de genetische afwijkingen weergeven zoals die optreden tijdens het ontstaan en de proliferatie van colorectale kanker.

In hoofdstuk twee is een methode beschreven voor de simultane detectie van fenotypische en genotypische karakteristieken van tumorcellen m.b.v. gecombineerde ICC en FISH. Voor de ICC is gebruik gemaakt van de alkalische fosfatase-Fast Red reactie vanwege de voordelige eigenschappen in combinatie met FISH. Dit zijn o.a. een nauwkeurige eiwitlokalisatie en een geringe bleking van het fluorescentie signaal van het Fast Red precipitaat. Aangezien ook een sterke proteolytische digestie met behulp van pepsine mogelijk is, wordt de autofluorescentie drastisch gereduceerd. Simultaan gebruik van het fluorescerende Fast Red precipitaat (rood) en FITC (groen) of AMCA (blauw) fluorochromen maakt een multiparameter detectie mogelijk van zowel celcyclus parameters, alsook genotypische en fenotypische karakteristieken van tumorcellen. De ontwikkeling van deze methodieken is een voorwaarde voor de analyse van genomische veranderingen in weefselcoupes van colontumoren en voor de bepaling van het fenotype van de afwijkende celtypes.

In hoofdstuk 3 is een methode beschreven ter verbetering van de analyse van FISH signalen in weefselcoupes, aangezien evaluatie van FISH signalen wordt bemoeilijkt door beschadiging en overlapping van de kernen. De methode is gebaseerd op een combinatie van lamine ICC en enkelvoudige of dubbele FISH. De lamine kleuring m.b.v. het Fast Red precipitaat reduceert overlap van de kernen door de kerncontour weer te geven en door stabilisatie van het DNA

binnen deze contour. Hierdoor is het mogelijk om individuele kernen te onderscheiden en chromosomale veranderingen in deze kernen te onderzoeken. De resultaten geven echter altijd een onderwaardering van het werkelijke chromosoom aantal weer als gevolg van beschadiging van de kernen.

In hoofdstuk 4 en 5 blijkt dat de meest frequent gevonden chromosomale afwijking in een serie van 46 colorectale adenomen en 23 carcinomen een trisomie voor chromosoom 7 is. In normaal colonepitheel is deze afwijking niet aangetoond, in adenomen in ongeveer 30% van de onderzochte tumoren en in carcinomen in ongeveer 60% van de onderzochte tumoren. Op basis van de DNA-inhoud zijn de onderzochte carcinomen verdeeld in twee groepen: een (bijna)-diploïde groep en een hypotetraploïde groep. In de (bijna)-diploïde carcinomen wordt een extra chromosoom 7 gevonden in ongeveer 80% van de tumoren: als enige gedetecteerde chromosomale afwijking of in combinatie met andere afwijkingen. In de hypotetraploïde tumoren wordt vooral verlies van de chromosomen 17 en 18 aangetoond, terwijl een extra chromosoom 7 (gerelateerd aan de DNA inhoud) slechts in één tumor wordt aangetoond. Op basis van deze resultaten is een nieuw model voor colon tumorontwikkeling voorgesteld, gebaseerd op twee verschillende routes: in de eerste route treedt in een vroeg stadium trisomie voor chromosoom 7 op, terwijl in de andere route verlies van chromosomen 17 en/of 18 optreedt in combinatie met DNA endoreduplicatie, uiteindelijk resulterend in hypotetraploïde tumoren.

Om in celsuspensies van colonadenomen het celtype te bepalen waarin een trisomie voor chromosoom 7 gevonden wordt, is cytokeratine ICC en FISH met een centromeer specifieke probe voor chromosoom 7 gecombineerd (hoofdstuk 4). Hierbij is aangetoond dat trisomie voor chromosoom 7 wordt aangetroffen in de epitheliale cellen. De aanwezigheid van trisomie voor chromosoom 7 in stromale cellen kon echter niet worden uitgesloten. In hoofdstuk 6 is specifiek in de epitheliale compartimenten van colontumoren de aanwezigheid van trisomie voor chromosoom 7 aangetoond door in weefselcoupes gebruik te maken van gecombineerde dubbele FISH en een immunokleuring voor cytokeratine of vimentine. Chromosomale afwijkingen zijn hierbij gedetecteerd door de verhouding te bepalen van de FISH signalen voor de chromosomen 7 en 17.

Vervolgens hebben we de aanwezigheid van trisomie voor chromosoom 7 aangetoond in de verschillende subtypes van epitheliale differentiatie in colonepitheel, namelijk columnaire cellen, slijmbeker cellen en neuroendocriene cellen. Deze werden gedetecteerd m.b.v. antilichamen tegen respectievelijk villine, Parlam 3 en Chromogranine A. Trisomie voor chromosoom 7 werd hierbij

aangetoond in alle verschillende celtypes, indicatief voor een oorsprong van deze afwijking vanuit de stamcel.

Samengevat kunnen we concluderen dat trisomie voor chromosoom 7 in toenemende mate gevonden wordt in de colorectale adenoma-carcinoma opeenvolging, suggererend dat deze genetische afwijking een prognostisch ongunstige eigenschap is in adenomen. Naar aanleiding van ons gepostuleerde model voor colon tumorontwikkeling concluderen wij verder dat trisomie voor chromosoom 7 met name gevonden wordt in een route waarin geen endoreduplicatie plaatsvindt. Verder is aangetoond dat deze anomalie uitsluitend gevonden wordt in de epitheliale compartiment van colontumoren en niet in de stromale cellen. Waarschijnlijk treedt deze afwijking reeds op stamcel niveau op, aangezien trisomie voor chromosoom 7 gevonden is in de verschillende epitheliale celtypes die m.b.v. ICC aangetoond kunnen worden. In de epiloog (hoofdstuk 7) worden mogelijk toekomstige studies bediscussieerd die meer uitsluitsel kunnen geven over de significantie van trisomie voor chromosoom 7 in colorectale tumorontwikkeling.