Unterschiedliche koexistierende Genotypen in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468

Chromosomale Instabilität führt bei einer Vielzahl von Tumoren zu genomischen Alterationen. Während Verluste häufig die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken, können Zugewinne zur Aktivierung von Onkogenen führen. In humanen Tumoren finden sich hierbei häufig Mitglieder aus 3 Familien: *ras*, *myc* und *erbB* [3]. Ein prominentes Mitglied aus der *erbB*-Familie ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, „Epidermal Growth Factor Receptor“), der eine bedeutende Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung und der Ligan denantwort auf z. B. EGF („Epidermal Growth Factor“) oder TGF- α („Transforming Growth Factor α “) spielt [2].

Konsequenterweise findet man die Überexpression von EGFR nicht nur in zahlreichen Tumoren, sondern auch direkt mit der Transformation von Zellen korreliert [7, 18]. Obwohl die Expression von EGFR auch auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, findet man häufig genetische Zugewinne von transkriptionsaktiven Bereichen oder des gesamten Gens mit einer Überexpression assoziiert [17]. Eine solche direkte Regulation, die über die Gendosis vermittelt wird, findet sich auch für zahlreiche andere Gene in z. B. Lungen- und Brustkrebs.

Die Amplifikation des *egfr*-Gens stellt sich häufig als homogene intrachromosomale Struktur dar. Dabei sind ein strickleiterähnlicher Aufbau sowie der Verlust

der entsprechenden 7p-Telomere charakteristisch. Ein möglicher Mechanismus, der nicht nur für eine solche Genamplifikation, sondern auch für eine heterogene Zellpopulation verantwortlich sein könnte, ist der bereits von McClintock [13] beschriebene Mechanismus der „Breakage Fusion Bridge Cycles“ („BFB-Cycles“). Hierbei entsteht eine heterogene Zellpopulation mit gleichzeitig existierenden Zellen, die sich deutlich in der Amplifikation des Gens und damit in der Expression des Proteins unterscheiden. In solch einer Population finden sich dann sogar Zellen, die eine Amplifikation völlig vermissen lassen, die jedoch durch den Mechanismus der „BFB-Cycles“ in der Lage sind, eine Amplifikation neu zu initiieren. All diese Charakteristika finden sich auch in Brustkrebsfällen. Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, welcher Mechanismus der *egfr*-Gen-Amplifikation zugrundeliegt.

Methoden

Zellkultur

MDA-MB-468-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (PAA) kultiviert, welches zusätzlich mit 5% fötalem Kälberserum angereichert wurde.

Immunfärbung

Für die extrazelluläre Immunmarkierung des EGFR wurden zunächst Einzelzellsuspensionen der Zellkulturen präpariert. Hierzu wurden 1- bis 3-mal 10⁶ Zellen mittels 0,5 mM EDTA in PBS für 5 min gelöst, zentrifugiert und 2-mal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Der Blockierung mit 1% BSA in PBS für 30 min folgte die Inkubation (1 h, +4°C) mit dem FITC-markierten EGFR-Antikörper (EGFR 528, Santa Cruz Biotechnology). Nach 2 weiteren Waschschritten wurden die Zellen in PBS resuspendiert und bis zur Messung bei +4°C dunkel gelagert.

Flow-Zytometrie

Die Fluoreszenzsignale wurden direkt nach der Markierung mittels eines FACSVantage-SE-Flowzytometers (Becton Dickinson) bestimmt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms CELLQUEST von Becton Dickinson.

Die Isolierung der einzelnen Subpopulationen erfolgte aufgrund der EGFR-Expression, sodass niedrig und hoch exprimierende Zellen getrennt werden konnten. Die Zellen wurden entweder direkt mittels FISH, quantitativer PCR oder CGH untersucht oder nach entsprechender Zellkultur.

Abb. 1 ◀ Isolierung und Reanalyse von MDA-MB-468-Zellen mit **b** geringer und **c** hoher EGFR-Expression

Abb. 2 ◀ CGH-Profil von MDA-MB-468-Zellen mit geringer (**a**) und hoher (**b**) EGFR-Expression. Beide Klone zeigen einen Zugewinn im *egfr*-Genlocus 7p11-14, jedoch mit deutlichen Unterschieden im Grad. Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede gezeigt werden

Abb. 3 ◀ Anstieg der *egfr*-Gen-Amplifikation bei der Zelllinie MDA-MB-468 im Verlauf der Zellkultur

Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH wurde, wie bereits an anderer Stelle veröffentlicht, durchgeführt [4]. Dabei wurden nur Metaphasen ausgewertet, die eine Hybridisierung von starker Intensität sowie geringer Granularität aufwiesen. Abweichungen von der Norm-Ratio wurden ab einem Schwellenwert von 1,25 als Zugewinne und ab 0,75 als Verlust gewertet. Jedes CGH-Experiment beinhaltete auch eine Kontroll-Hybridisierung, bei der statt Tumor-DNA die Kontroll-DNA eingesetzt wurde.

Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Für die qPCR wurden Primer eingesetzt, die den ersten CA-Mikrosatelliten im Intron 1 des *egfr*-Gens flankieren (CAIfor: 5'-tgaagaatttgagccaacaaa-3' und CAIrev: 5'-cacttgaaccaggacagca-3'). Als Sonde kam dabei ein FAM-markiertes Oligonukleotid von 15 CA-Wiederholungen zum Einsatz. Für die Normalisierung wurden zusätzlich Primer und eine Sonde für das Referenzgen *Superoxid Dismutase* eingesetzt (SOD2for: 5'-Ggagaagctgacgctgc-3', SOD2rev: 5'-Ccttattgaaaccaagccaacc-3', Sonde: 5'-CAACCTGAGCCTTGGACACCAACAGA-3'). Die PCR-Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Amplifikation des *egfr*-Gens wurde bei MDA-MB-468-Zellen entweder direkt nach der EGFR-basierten Sortierung durchgeführt oder aber nach der folgenden Zellkulturphase.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die FISH an Metaphasen wurden sich teilende Zellen durch eine 4-stündige Inkubation mit Colcemid blockiert, wohingegen für die FISH an Interphasen diese Zellkulturen direkt eingesetzt wurden.

Die Sonde für die Detektion des *egfr*-Gens wurde von dem humanen PAC Klon RP5-1091E12 generiert, der die Exone 1 bis 20 des *egfr*-Gens umfasst. Zuvor über eine Nicktranslation mit Digoxigenin markiert, wurde die Sonde für 5 min bei 70°C in 70% Formamid/0,6 x SSC denaturiert. Die Hybridisierung selbst erfolgte gemeinsam mit Cot-1-DNA (Gibco) und HPL-DNA (Sigma) über Nacht bei 37°C in 50% Formamid-1 x SSC-10% Dextran. Nach der Hybridisierung wurde 2-mal bei 45°C in 50% Formamid/2fach SSC gewaschen und anschließend mit 3% BSA in 4 x SSC bei 37°C blockiert. Die Detektion der Sonde erfolgte über einen Maus-Anti-DIG- sowie einen Cy3-markierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper. Die Chromosomen bzw. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem Olympus BX61 Mikroskop, welches durch das Kamerasystem DP50 erweitert wurde.

Zusammenfassung · Abstract

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:333–337 DOI 10.1007/s00292-008-1021-3
© Springer Medizin Verlag 2008

K. Agelopoulos · H. Schmidt · E. Korsching · H. Buerger · B. Brandt Unterschiedliche koexistierende Genotypen in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468

Zusammenfassung

Starke genomische Heterogenität von Tumoren erschwert nicht nur eine Diagnose, sondern könnte auch häufig zum Versagen von Therapien führen. Ziel dieser Studie war es, chromosomale Veränderungen zu untersuchen, die eine solche Heterogenität bewirken. Hierzu wurden Klone der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 isoliert, die sich in der Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR, „Epidermal Growth Factor Receptor“) unterscheiden. Genomische Veränderungen dieser Klone wurden über CGH und Mapping-Arrays dargestellt, die Amplifikationen des *egfr*-Gens mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und qPCR. Die Klone zeigten direkt nach der Isolierung deutliche Unterschiede im Grad der *egfr*-Amplifikation. Dabei fanden sich bis zu 60fache

Amplifikationen bei den EGFR hoch exprimierenden Klonen und weniger als Verdopplungen bei schwach exprimierenden Zellen. Diese Unterschiede waren jedoch nach zahlreichen Zellkulturpassagen nicht mehr so deutlich, da die schwach exprimierenden Klone eine neue Amplifikation des *egfr*-Gens zeigten. Diese Amplifikation war genauso heterogen wie die ursprüngliche. Ein genaueres Verständnis der Prozesse, die hierzu führen, könnte auch die Mechanismen klären, die *in vivo* eine Rolle spielen und somit nicht nur die Diagnose, sondern auch die Therapie der entsprechenden Tumoren verbessern.

Schlüsselwörter

EGFR · Amplifikation · Überexpression · Chromosomale Instabilität

Different coexisting genotypes in the breast cancer cell line MDA-MB-468

Abstract

Intratumor genetic heterogeneity, a well-known characteristic of numerous cancers, often confounds a precise diagnosis and leads to therapy resistance. This study deals with such chromosomal variability, which may be due to an inherent genetic instability affecting heterogeneity and clonal effects. Subpopulations of the breast cancer cell line MDA-MB-468 were isolated according to epidermal growth factor receptor (EGFR) expression by FACS. Whole genome profiling (CGH; mapping arrays) and determination of *egfr* gene amplification (fluorescence in situ hybridisation, FISH; qPCR) were done directly after sorting or after several passages of cell culture. Subpopulations differed in the amplification of the *egfr*-locus 7p11-14 showing *egfr* gene amplification rates of up to 60-

fold in high-level expressing populations and less than 2-fold in low-level expressing populations. However, after several passages the original low-level cells showed a new amplification of the *egfr* gene, which was as heterogeneous as the original amplification detected in MDA-MB-468. Additional, spontaneously expressed fragile sites could be shown in FISH analyses which may affect cell culture heterogeneity. Understanding the precise chromosomal process would clarify mechanisms *in vivo* and improve both diagnosis and therapy of corresponding cancers.

Keywords

EGFR · Amplification · Overexpression · Chromosomal instability

Abb. 4 ◀ Die Zellpopulation der Zelllinie MDA-MB-468 weist eine große Heterogenität im *egfr*-Locus auf. Es koexistieren Zellen mit keiner, mittlerer bis sehr starker Genamplifikation

Ergebnisse

Mittels FACS-Analysen konnten 2 MDA-MB-468-Subpopulationen isoliert werden, die sich deutlich in ihrer EGFR-Expression unterschieden (▣ **Abb. 1 a–c**).

Die anschließende CGH-Analyse zeigte bei beiden eine chromosomale Amplifikation im *egfr*-Genlocus 7p11-14. Dabei unterschieden sich jedoch die beiden Populationen eindeutig im Grad dieses Zugewinns. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass bei MDA-MB-468 die Expression des EGFR über die Gendosis reguliert wird. Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede in den CGH-Ratio-Profilen gefunden werden (▣ **Abb. 2 a, b**).

Die Unterschiede im Grad der *egfr*-Amplifikation konnten mit Hilfe der qPCR bestätigt werden, jedoch nur direkt nach der Sortierung der Zellen. So stieg der Grad der *egfr*-Gen-Amplifikation im Laufe der Zellkultur bei den Zellen mit zunächst geringem Zugewinn wieder an. Dieses konnte sowohl mittels FISH als auch qPCR gezeigt werden (▣ **Abb. 3**).

Die resultierende höher amplifizierte Zellpopulation blieb dabei jedoch im *egfr*-Genotyp heterogen. So fanden sich parallel gar nicht bis gering amplifizierte Zellen gemeinsam mit sehr stark amplifizierten Zellen in der Kultur (▣ **Abb. 4**). Die höher amplifizierten Zellen waren dabei zu Beginn der Zellkultur nicht vorhanden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Steigerung der Gendosis auf einem klonalen Effekt beruht, bei dem bereits vorhandene hoch-amplifizierte Zellen durch einen Wachstumsvorteil eine echte Reamplifikation simulierten. Zudem konnte gezeigt werden, dass in der Zellkultur gering amplifizierte

Zellen sogar schneller proliferieren als die entsprechenden hoch amplifizierten Zellen (Ergebnis nicht gezeigt). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es zu einer echten Reamplifikation gekommen ist. Die Zellen mit hoher *egfr*-Gen-Amplifikation müssen folglich erst im Verlauf der Kultur entstanden sein.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Zelllinie MDA-MB-468 besteht aus einer heterogenen Mischung von Zellen, die sich deutlich im Grad der *egfr*-Gen-Amplifikation unterscheiden. Diese unterschiedlichen Amplifikationen führen konsequenterweise zu unterschiedlichen EGFR-Expressionen. Wie durch nachfolgende Untersuchungen gezeigt werden konnte (CGH, FISH, qPCR), führte eine flow-zytometrische Sortierung der Zellen in niedrig und hoch exprimierende entsprechend auch zu einer Trennung von Zellen mit geringer und hoher *egfr*-Gen-Amplifikation.

Bei Glioblastomen [16] sowie anderen Karzinomen [12] konnte ein solcher direkter Effekt der *egfr*-Gen-Dosis auf die Expression bereits gezeigt werden. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen diesen Effekt auch für weitere Gene bei Tumoren des Pankreas [9] sowie bei Brustkrebs [11, 15]. Zusätzlich zu den Untersuchungen der *egfr*-Gen-Amplifikation direkt nach der Sortierung wurde diese auch nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultur nach einer Sortierung bestimmt. Die hierbei beobachtete Steigerung der Genamplifikation während der Zellkultur deckt sich nicht mit dem erwarteten Ergebnis aus der Literatur. Hier zeigen native Tumoren mit *egfr*-Amplifi-

kation ein rasches Verschwinden dieser, wenn man die Zellen in Kultur nimmt [1, 14]. Möglicherweise liegt das an der etwas schnelleren Proliferation von niedrig amplifizierten Zellen unter Zellkulturbedingungen, wie wir sie auch in unserem Zellkulturmodell zeigen konnten. Dabei würden die stark amplifizierten Zellen im Verlauf der Zellkultur immer weiter ausgedünnt. Die beobachtete Steigerung der Amplifikation kann folglich nicht auf eine proliferative Begründung zurückgeführt werden. Vielmehr muss es sich dabei um einen Mechanismus handeln, der trotz der starken Proliferation der niedrig amplifizierten Zellen wirksam ist. Die beobachtete Amplifikation in der Zelllinie führte dabei zu einem heterogenen Bild, wie es *in vivo* auch häufig gefunden wird. Zeitgleich existierten dabei Zellen mit keiner, mittlerer und massiver *egfr*-Gen-Amplifikation. Ein möglicher Mechanismus hierfür findet sich in BFB-Zyklen, deren charakteristische Ausprägungen wie Telomerverlust, dizentrische Chromosomen und ein strickleiterähnlicher Amplikonaufbau sich in der Zelllinie MDA-MB-468 wiederfinden lassen. In der Literatur wurde dieser Mechanismus bereits mit genomischer Heterogenität [8] und Genamplifikation [5, 6, 10] in Zusammenhang gebracht.

Das Wissen über den genauen zugrundeliegenden Mechanismus in der Zellkultur könnte auch für das Geschehen *in vivo* von Bedeutung sein. Daher sind weitere Untersuchungen und das Übertragen auf native Tumoren von großer Bedeutung, da eine große Heterogenität *in vivo* nicht nur die Diagnose erschwert, sondern auch zu einem unterschiedlichen Therapieansprechen der einzelnen Klone innerhalb eines Tumors führen kann.

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. K. Agelopoulos

Gerhard Domagk Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 17, 48149 Münster
agelopoulos@uni-muenster.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ et al. (1990) Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50: 8017–8022
2. Brandt B, Meyer-Staekling S, Schmidt H et al. (2006) Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 12: 7252–7260
3. Brison O (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155: 25–41
4. Buerger H, Otterbach F, Simon R et al. (1999) Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 187: 396–402
5. Ciullo M, Debily MA, Rozier L et al. (2002) Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA71. *Hum Mol Genet* 11: 2887–2894
6. Coquelle A, Pipiras E, Toledo F et al. (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 89: 215–225
7. Difiore PP, Pierce JH, Kraus MH et al. (1987) ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237: 178–182
8. Gisselsson D, Hoglund M, Mertens F et al. (1998) Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in mesenchymal tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 203–212
9. Heidenblad M, Lindgren D, Veltman JA et al. (2005) Microarray analyses reveal strong influence of DNA copy number alterations on the transcriptional patterns in pancreatic cancer: implications for the interpretation of genomic amplifications. *Oncogene* 24: 1794–1801
10. Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW et al. (2002) A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* 1: 89–97
11. Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S et al. (2002) Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 62: 6240–6245
12. Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N et al. (1989) Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 59: 559–562
13. McClintock B (1942) The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28: 458–463
14. Pandita A, Aldape KD, Zadeh G et al. (2004) Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 29–36
15. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM et al. (2002) Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12963–12968
16. Sauter G, Maeda T, Waldman FM et al. (1996) Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas. *Am J Pathol* 148: 1047–1053
17. Tidow N, Boecker A, Schmidt H et al. (2003) Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development. *Cancer Res* 63: 1172–1178
18. Velu TJ, Beguinot L, Vass WC et al. (1987) Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 238: 1408–1410