

MOLECULAR CYTOGENETIC STUDIES ON CHILDHOOD THYROID TUMOURS FROM BELARUS

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ДЕТЕЙ БЕЛАРУСИ

H. Zitzelsberger^{1,2}, J. Smida¹, K. Salassidis¹, L. Heiber², M. Bauchinger²

¹Institute of Radiation Biology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany
²GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Radiobiology,
D-85764, Neuherberg, Germany

Г. Зитзельсбергер^{1,2}, Дж. Смида¹, К. Салассидис¹, Л. Гейбер², М. Баухингер²

¹Институт радиационной биологии, Людвиг-Максимилианс университет, Мюнхен, Германия
²Национальный исследовательский центр GSF охраны окружающей среды и здравоохранения,
Институт радиобиологии, D-85764, Нюгерберг, Германия

Since 1992, tissue specimens from 264 childhood thyroid tumours from Belarus were received by the Institute of Radiobiology at GSF. For control, tumour samples from Belarussian adults, papillary carcinomas without radiation history and secondary thyroid tumours developed after radiotherapy were also collected. Based on this tissue and cell culture collection, several molecular cytogenetic studies were carried out investigating aberrations in subgroups of these tumours at the chromosomal and molecular level. These studies include the quantification of chromosomal aberrations by FISH-painting (Lehmann L. et al., 1996), G-banding and breakpoint analyses of chromosomal aberrations (Lehmann L. et al., 1997; Zitzelsberger H. et al., in press), analyses of p53 mutations (Smida J. et al., 1997) and *RET* rearrangements (Smida J. et al., in press) and an expression profiling of activated tyrosine kinase genes. This presentation focuses on cytogenetic studies and the investigation of *RET* rearrangements.

CYTOGENETIC STUDIES

Thyroid carcinoma incidence is increased significantly following ionising irradiation, however the possible mechanisms are not, as yet, identified. To provide clues for an understanding of the radiation-induced transformation of thyroid epithelium, we karyotypically analysed 56 cases of Belarussian childhood thyroid tumours which appeared after the Chernobyl nuclear accident in 1986. We also studied 8 secondary tumours that developed after radiotherapy. Metaphase preparations obtained from primary cultures were analysed by G-banding. Clonal structural aberrations were found in 13 of 56 Belarussian cases and in 6 of 8 secondary tumours developed after radiotherapy. Furthermore, we detected multiple chromosomal aberrations as well as complex rearrangements in some of these tumours and performed detailed analysis of a single case using spectral karyotyping (SKY) and comparative genomic hybridisation (CGH). Using these advanced techniques, we

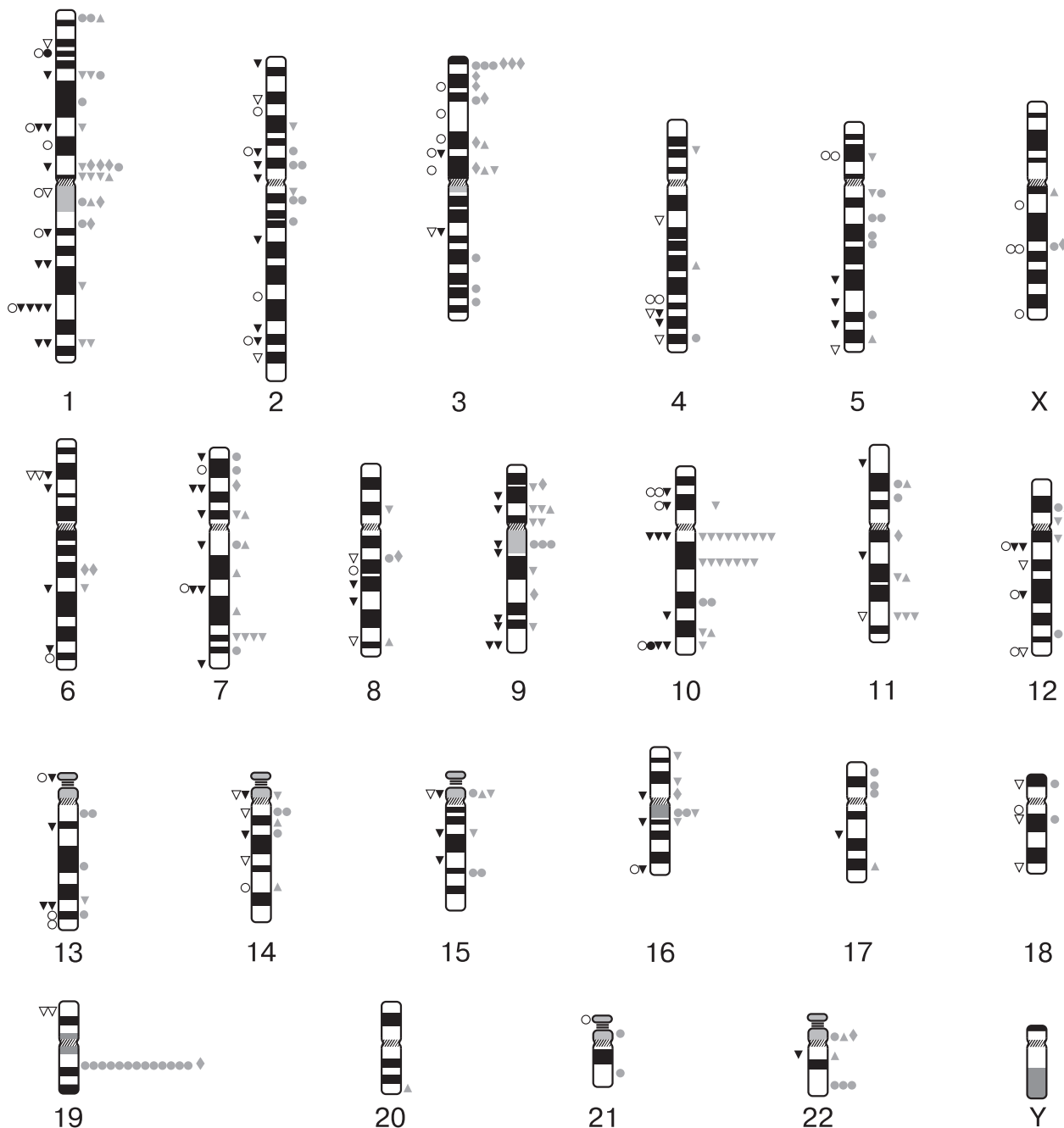
С 1992 г. в Институт радиобиологии GSF поступали образцы ткани опухолей щитовидной железы, взятые у 264 детей из Беларуси. В качестве контроля использовали образцы опухолей, взятые у взрослых жителей Беларуси, папиллярной карциномы — у необлученных лиц и вторичных опухолей щитовидной железы, развившихся после радиотерапии. На основе собранных тканей и клеточных культур проведены молекулярные цитогенетические исследования для изучения aberrаций в подгруппах этих опухолей на хромосомном и молекулярном уровнях. Исследования включали количественную оценку хромосомных aberrаций при использовании FISH-метода (Lehmann L. et al., 1996), анализа точек разрывов в хромосомных aberrациях при G-окраске (Lehmann L. et al., 1997; Zitzelsberger H. et al., в печати), анализа мутаций p53 (Smida J. et al., 1997) и *RET*-перестроек (Smida J. et al., в печати) и профиля экспрессии активированных генов тирозинкиназы. В данном сообщении представлены результаты цитогенетических исследований и изучения *RET*-перестроек.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

После воздействия ионизирующих излучений значительно увеличивается заболеваемость карциномой щитовидной железы, однако механизмы этого не установлены. Для расшифровки процессов радиационно-индуцированной трансформации тиреоидного эпителия провели кариотипический анализ опухолей щитовидной железы после Чернобыльской аварии у 56 детей из Беларуси. Изучили также 8 вторичных опухолей, возникших после радиотерапии. Препараты метафаз, полученные из первичных культур, анализировали при G-окраске. Клональные структурные aberrации выявлены в 13 случаях из 56 и в 6 из 8 вторичных опухолей, возникших после радиотерапии. Кроме того, обнаружили множественные хромосомные aberrации и сложные перестройки в некоторых из этих опухолей. Проведен детальный анализ одного случая при помощи спектрального кариотипирования (SKY) и сравнительной геномной гибридизации (CGH). Используя эти передовые технологии, изучи-

FIGURE. BREAKPOINTS OF STRUCTURAL CHROMOSOME ABERRATIONS IN RADIATION-INDUCED THYROID TUMOURS AND THYROID TUMOURS WITHOUT RADIATION HISTORY

РИСУНОК. ТОЧКИ РАЗРЫВОВ СТРУКТУРНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРАЦИЙ В ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ И У НЕОБЛУЧЕННЫХ ПАЦИЕНТОВ



Note. Childhood thyroid tumours from Belarus (black symbols on the left side of ideograms) and secondary tumours developed after radiotherapy (white symbols on the left side of ideograms) were analysed by G-banding and SKY and compared with literature data on thyroid tumours without radiation history (gray symbols on the right side of ideograms). Symbols were assigned to different tumour entities: benign tumours (●), papillary carcinomas (▼), medullary carcinomas (▲), follicular carcinomas (◆).

Примечание. Опухоли щитовидной железы у детей из Беларуси (черные символы на левой стороне идеограмм) и вторичные опухоли, возникшие после радиотерапии (белые символы на левой стороне идеограмм), исследовали с помощью G-окраски и SKY, полученные результаты сравнивали с данными литературы относительно опухолей щитовидной железы у необлученных пациентов (серые символы на правой стороне идеограмм). Принятые обозначения: ● — доброкачественные опухоли, ▼ — папиллярная, ▲ — медуллярная и ◆ — фолликулярная карцинома.

studied the composition of several marker chromosomes in a childhood tumour from Belarus with a near-triploid karyotype. While CGH analysis detected losses on 1q and 13q and gains on 1p, 2p and 9q, SKY analysis revealed structural alterations also affecting chromosomes 1, 2, 9, and 13 besides others. A comprehensive breakpoint analysis in the pooled data set (figure) furthermore revealed novel breakpoints on chromosomes 4q, 5q, 6p, 12q, 13q, and 14q found in addition to the known hotspots of alterations in papillary thyroid carcinomas on chromosomes 1q and 10q. Thus, chromosomal aberrations observed in these tumours may provide starting points for positional cloning of genes involved in radiation-induced tumorigenesis.

MOLECULAR GENETIC STUDIES

Rearrangements of the *RET* oncogene were investigated in papillary thyroid carcinomas (PTC) from 51 Belarusian children with a mean age of 3 years at the time of the Chernobyl radiation accident. For comparison, 16 PTC from exposed Belarusian adults and 16 PTC from German patients without radiation history were included in the study. *RET* rearrangements were detected and specified by RT-PCR and direct sequencing using specific primers for *RET*/PTC1, 2 and 3. Only *RET*/PTC1 and no *RET*/PTC3 was found in the adult patients, with a frequency of 69% for the Belarusian cases but of only 19% in the German patients. In contrast, 13 *RET*/PTC3 (25.5%) and 12 *RET*/PTC1 (23.5%) rearrangements were present in PTC from Belarusian children. Thus, our study reveals about a 1:1 ratio of *RET*/PTC3 and *RET*/PTC1 which is in contrast to earlier studies with lower numbers of cases and exhibiting a high predominance of *RET*/PTC3 (ratio about 3:1). A ratio (2.5:1) similar to that in earlier investigations (diagnosed 1991–94) was obtained for cases included in our study that were diagnosed in 1993/94. The present data suggest that *RET*/PTC3 may be typical for radiation-associated childhood PTC with short latency period, whereas *RET*/PTC1 may be a marker for later occurring PTC of radiation-exposed adults and children.

REFERENCES

Lehmann L., Zitzelsberger H., Kellerer AM., Braselmann H., Kulka U., Georgiadou-Schumacher V., Negele T., Spelsberg F., Demidchik EP., Lengfelder E., Bauchinger M. Chromosome translocations in thyroid tissues from Belarusian children exposed to radioiodine from the Chernobyl accident measured by FISH-painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1996, 70: 513–516.

Lehmann L., Greulich K., Zitzelsberger H., Negele T., Spelsberg F., Bauchinger M., Weier H.-U. Cytogenetic and molecular genetic characterization of a chromosome 2 rearrangement in a case of human papillary thyroid carcinoma with radiation history. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1997, 96: 30–36.

ли состав нескольких маркерных хромосом в опухолях у детей из Беларуси с околотриплоидным кариотипом. При помощи CGH-анализа обнаружены потери в 1q и 13q, вставки в 1p, 2p и 9q. По данным SKY-анализа выявлены структурные изменения в этих же (1, 2, 9 и 13) и других хромосомах. При анализе точек разрывов в объединенном наборе данных (см. рисунок), кроме «горячих точек» повреждений при папиллярной тиреоидной карциноме в хромосомах 1q и 10q, выявлены новые точки разрывов в хромосомах 4q, 5q, 6p, 12q, 13q и 14q. Таким образом, хромосомные aberrации в этих опухолях могут быть пусковыми точками позиционного клонирования генов, вовлеченных в радиационно-индуцированный канцерогенез.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перестройки *RET*-онкогена изучали на образцах папиллярных тиреоидных карцином (ПТК), взятых у 51 ребенка из Беларуси, которые на момент Чернобыльской аварии были в возрасте в среднем 3 года. В качестве сравнения использовали материалы ПТК, взятые у 16 взрослых пострадавших из Беларуси и у 16 — необлучавшихся пациентов из Германии. *RET*-перестройки выявляли и уточняли с помощью RT-PCR, а упорядочивали — специфических праймеров для *RET*/PTC1, 2 и 3. Частота обнаружения *RET*/PTC1 у взрослых из Беларуси составила 69%, у пациентов из Германии — 19%. *RET*/PTC3 у них не обнаружена. В отличие от этого, в ПТК у детей из Беларуси выявлены 13 *RET*/PTC3 (25,5%) и 12 *RET*/PTC1 (23,5%) перестроек. Таким образом, установлено соотношение *RET*/PTC3 и *RET*/PTC1 примерно 1:1, что противоречит данным более ранних исследований с меньшим числом случаев, свидетельствующим о значительном преобладании *RET*/PTC3 (соотношение около 3:1). Соотношение 2,5:1, сходное с таковым в более ранних исследованиях (1991–1994 гг.), было получено для включенных в настоящее исследование пациентов, выявленных в 1993–1994 гг. Предположено, что *RET*/PTC3 может быть типичным для радиационно-обусловленной ПТК с коротким латентным периодом у детей, тогда как *RET*/PTC1 — маркером более позднего развития ПТК у облученных взрослых и детей.

Smida J., Zitzelsberger H., Kellerer AM., Lehmann L., Minkus G., Negele T., Spelsberg F., Hieber L., Demidchik EP., Lengfelder E., Bauchinger M. P53 mutations in childhood thyroid tumours from Belarus and in thyroid tumours without radiation history. *Int. J. Cancer*, 1997, 73: 1–6

Smida J., Salassidis K., Hieber L., Zitzelsberger H., Kellerer AM., Demidchik EP., Spelsberg F., Negele T., Lengfelder E., Werner M., Bauchinger M. Distinct frequency of *RET* rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int. J. Cancer*, 1998, in press.

Zitzelsberger H., Lehmann L., Hieber L., Weier H.-U.G., Janish C., Fung J., Negele T., Spelsberg F., Lengfelder E., Demidchik E., Salassidis K., Kellerer AM., Werner M., Bauchinger M. Cytogenetic changes in radiation-induced tumours of the thyroid. *Cancer Research*, 1998, in press.