

POLYMORFISMUS CHROMOZOMŮ A JEJICH INSTABILITA V PERMANENTNÍM RŮSTU LINIE VUP Z MALIGNÍHO MELANOMU UVEY

POLYMORPHISM OF CHROMOSOMES IN THE CELL LINE OF UVEAL MELANOMA AND THEIR INSTABILITY IN PERMANENT IN VITRO GROWTH

VRBA M., ČÍHALOVÁ V., HOFMANOVÁ L., PROCHÁZKOVÁ D., JURÁŠKOVÁ V.

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ZDRAVÍ DÍTĚTE, BRNO

Souhrn: Předmětem studie bylo jak klasickými tak v molekulárně cytogenetickými (FISH) metodami analyzovat variabilitu chromozomů u permanentní buněčné linie VUP 1, vypěstované z lidského maligního melanomu uvey, postiujícího ženu. Studie byla zaměřena na všechny autosomy a gonosom X. Bylo zjištěno, že chromozom 13 jako jediný není v standardní formě zachován a je v karyotypu přítomen v několika typech přestavb. Přestavbám nejvíce podléhají chromozomy 13,1 a 7. Nové metody molekulární cytogenetiky (FISH) upřesňují a rozšiřují ve větší míře možnosti odкрыtí numerický i strukturální polymorfismus chromozomů, častý v populacích nádorových buněk. Velmi často jsou tyto výsledky zcela odlišné nejen od výsledků, dosažených konvenčními cytogenetickými metodami, ale i metodami sekvenčního barvení chromozomů (GTG).

Klíčová slova: permanentní růst, buněčná linie, uveální melanom, polymorfismus, chromozomy 1-22,X, instabilita

Summary: Heteronuclear permanent cell line VUP 1 derived from the human malignant melanoma of the femal uvea was our object of the longitudinal cytogenetical study (FISH). Numerical and structural polymorphism of all chromosomes except structural once of 15 and 22 are discovered. Most changes was found in chromosomes 13,1 and 7. Development of the molecular-cytogenetical technics follows into the possibility to discover more and more numerical and structural polymorphism of the chromosomes in cancer cell lines.

Key words: permanent growth, cell line, uveal melanoma, polymorphism, chromosomes 1-22,X, instability

Úvod

Zavedení molekulárně cytogenetických technik do genové diagnostiky neoplasí přináší překvapivé poznatky. Dříve s jistotou stanovené karyotypy klasickými a sekvenčními technikami jsou nejen novými technikami upřesněny ve smyslu dalších podrobností, ale řada chromozomových přestavb má zcela odlišný podklad, než bylo dříve určeno. V našem příspěvku zveřejňujeme poznatky, které jsme získali všemi dostupnými cytogenetickými technikami včetně FISH. Studie byla zaměřena na chromozomy 1-22 a X v permanentní linii VUP z maligního melanomu lidské uvey, kterou jsme isolovali na našem pracovišti v r. 1971 (1, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24).

Materiál a metodika

Permanentní linie VUP (1, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) byla izolována v r. 1971 z maligního melanomu lidské chorioidey smíšeného typu, který postihoval ženu. Melanom byl středně pigmentován. Vyrůstal z cévnatky. Části nádoru byly fascikulární s typickým palisádovitým uspořádáním vřetenitých buněk. Technika fragmentové kultivace na monofilu z umělé hmoty umožnila získat z maligního melanomu lidské chorioidey dlouhodobě kultivovatelnou buněčnou kulturu. V současné době uplynulo od získání linie 30 let. Uchovala si heteronukleární charakter a stejné rozložení růstových a základních cytologických vlastností. Je permanentní linií obdobného charakteru jako řada lidských linií dlouhodobě pěstovaných a odvozených z nejrůznějších lidských tkání. Bylo vyklonováno několik klonů. I jejich základní vlastností je heteronuklearita a numerická variabilita chromozomů. Buňky linie neobsahují melanin ani vývojová stadia melanogeneze. Preparáty k vyšetření chromozomů jak ke klasickému, tak sekvenčnímu barvení GTG byly připraveny obvyklým způ-

sobem. Pro FISH techniku bylo postupováno podle doporučení producentů sond fy Oncorn. Užili jsme sond celochromozomových i centromerických.

Výsledky

Heteronuklearita je v permanentní linii pevně geneticky zakódována. Počtovou i strukturální variabilitu dokázalo i rozdělení chromozomů do skupin podle již klasických prvotních norem ICSN i současných kritérií standardizace a nomenklatury (6). Po podstatně užší variabilitě počtu a struktury po prvotních konvenčních hodnoceních, sekvenční techniky identifikace chromozomů rozšířily výrazně variační šíři jak numerického polymorfismu, tak i polymorfismu, podmíněného strukturálními přestavbami (24). Strukturální změny identifikovatelné sekvenční technikou barvení GTG zahrnují především delece a nejrůznější přestavby. ŘADU Z NICH NELZE ANI PŘESNĚJI DEFINOVAT. Přehled jednotlivých typů aberrací, odкрыtých technikou GTG i FISH je v tab. č. 1. Centromerickou sondou prokázaný chromozom se vždy neshoduje se standardním (24). Může být významně strukturálně přestavěným. Schéma 1. Celochromozomovými sondami bylo prokázáno, že polymorfismus jak strukturální tak numerický je základní vlastností permanentní linie VUP. Zahrnuje více či méně všechny chromozomy. Proti GTG pruhování, technika FISH odkrývá o 30 % vyšší počet variant chromozomů.

Diskuse

Již konvenční techniky znázornění chromozomů jadernými barvivy, bez pruhování chromatid (24), přinesly poznatek, že chromozomální výbava dlouhodobě pěstované kultury má vysoce aneuploidní charakter. Jak velikostí tak morfologií se chromozomy lišily a běžné jejich rozdělení do skupin podle

Tab. 1. Srovnání numerických a strukturálních změn nalezených technikou GTG a FISH (celochromozomové sondy).

chromozom	numerické změny počet v %						strukturální změny počet n (pouze typy)			
	hyposomie		modální počet		hypersomie		delece		přestavby	
	G	F	G	F	G	F	G	F	G	F
1.	3	29	89D	67D	8	4	1	15	7	14
2.	–	2	70D	89D	30	9	0	3	6	3
3.	44	3	44D	87D	12	10	3	5	7	6
4.	3	37	94D	62D	3	1	0	8	0	5
5.	74	96	74M	95M	–	–	0	6	7	6
6.	3	4	57D	62T	40	69	4	1	6	1
7.	–	25	82D	58D	18	17	0	11	5	11
8.	43	13	57D	81D	–	6	1	2	3	4
9.	56	14	44D	80D	–	6	1	1	3	3
10.	6	3	91D	83D	3	14	–	–	1	2
11.	11	20	86D	67D	3	13	0	1	3	2
12.	11	8	89D	77D	–	15	0	6	4	6
13.	18	–	79D	–	3	–	0	13	6	22
14.	33	–	60D	92D	7	18	0	1	3	1
15.	–	–	60T	86T	15	96	1	0	2	0
16.	3	2	48D	93T	49	96	0	3	2	3
17.	8	2	89D	88T	3	92	3	3	2	2
18.	11	49	89D	51D	–	–	3	2	1	2
19.	3	1	89D	96D	8	3	0	2	0	2
20.	7	3	67D	78T	26	88	0	4	0	6
21.	9	18	55D	41D	36	41	0	1	4	2
22.	9	6	62D	68T	29	76	0	0	1	0
X	6	6	94D	92D	–	2	0	1	10	1

Tab. 2. Srovnání rozdělení typů chromozomů do skupin různými technikami jejich znázornění.

Linie VUP z maligního melanomu uvey Skupiny chromozomů podle ISCN Počet ve skupinách									
A	B	C+X	D	E	F	G	aber	n	metodika
4	2	29	6	8	8	6	1	64	Giemsa
6	3	16	7	6	4	6	83	64	GTG
6	3	16	5	8	5	5	102	64	FISH
6	4	16	6	6	4	4	0	46	Kontrola diploidní
9	6	24	9	9	6	6	0	69	triploidní

uložení centromery a centromerického indexu v různých pasážích vykazovalo polymorfismus především počtový (24).

Při srovnání výsledků z druhé pasáže s dalšími a z různých etap jejich longitudinálního sledování vyplývá, že buněčná populace stále udržuje širokou počtovou variabilitu chromozomů, jak ve skupinách tak celkovou. Modálními buňkami byly ty, jejichž karyotyp obsahoval 62 až 64 chromozomů. Počtovou i strukturální variabilitu dokázalo i rozdělení chromozomů do skupin podle prvotních klasifikací (18, 20, 21, 23, 24). Nejpočetnější byly zastoupeny chromozomy řazené do skupiny C, nejvíce ztrát bylo ve skupině A, B, D. Tab. 2. Nejkonstantnější zastoupení se objevovalo u chromozomů ze skupiny G. I tento polymorfismus, prokázaný prvotními kritérii standardizace, se neliší od nálezů, získaných hodnocením chro-

mozomů pouze podle pozice centromery (8,24). Sekvenční techniky obarvení chromozomu polymorfismus upřesnily a typy variant rozšířily. Tab. 1. 2.

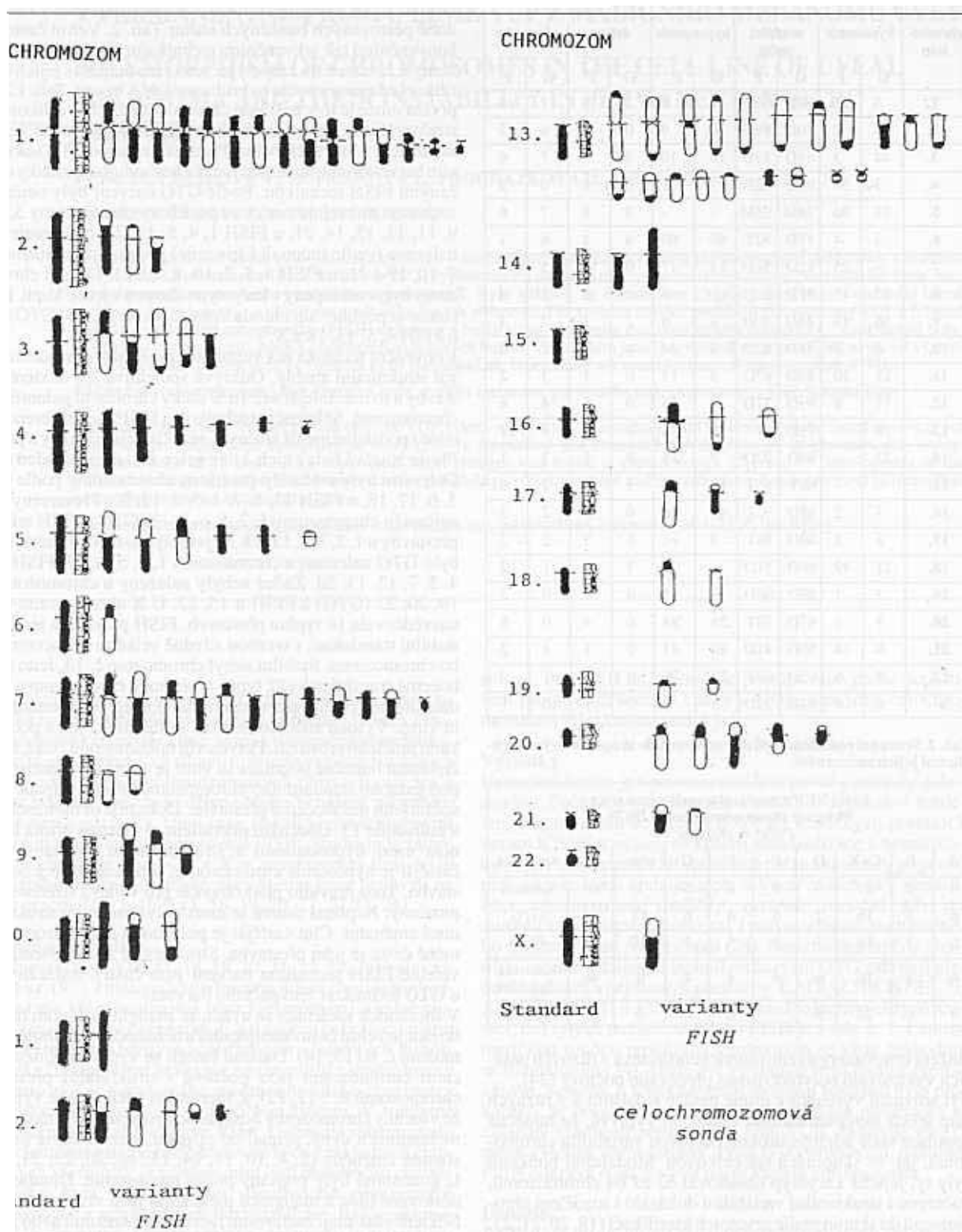
Molekulárně cytogenetické techniky znázornění chromozomů (FISH) ještě výrazněji rozšířily počet numerických a strukturálních změn nalézáných u chromozomální výbavy dlouhodobě pěstovaných buněčných kultur. Tab. 2. Velmi často, jak konvenčními tak sekvenčními technikami stanovené chromozomy a zařazené do karyotypu, zcela nesouhlasí s jejich identifikací a řazením podle hybridizace DNA in situ. Tab. 1.2. Na prvním místě je to v naší linii chromozom 13. Jak velikostí tak strukturálně se chromozom vždy liší od standardu ISCN. Jeho kopie není v linii zachována. Poznatky získané GTG sekvenčním barvením chromozomů se také neshodují s poznatky dosaženými FISH technikou. Podle GTG barvení byly nejčastěji ztrátovou mutací numerickou postiženy chromozomy 5, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 21, u FISH 1, 4, 5, 11, 21. Nulisomie byla nalezena (vedle mono, di i trisomie) pouze u chromozomů 8, 9, 10, 19 a 21, u FISH 4, 5, 7, 10, 8, 20, 21. Ostatní chromozomy byly zastoupeny v karyotypu alespoň v jedné kopii. Polysomie nepostihovala chromozomy 5, 8, 9, 12, 18 (GTG) a X, u FISH 4, 5, 13, 18 a X.

Konvenční technika má velmi omezené možnosti identifikovat strukturální změny. Odkrývá spolehlivě jen některé přestavby a to rozsáhlejší než 10 % délky chromatid jednotlivých chromozomů. Sekvenční technikou a FISH jsou diferencovatelné i podstatně menší změny. Lze určit i jejich lokusy a původ. Přesto zůstává řada z nich, které nelze ani touto metodou určit. Delecemi byly nejčastěji postiženy chromozomy podle GTG 3, 6, 17, 18, u FISH 13, 1, 7, 4, 5, 3, 12, 20. Přestavby byly nejčastěji chromozomy 1, 2, 5, 6, 3, 13 (GTG). FISH odkryla přestavby u 1, 2, 3, 5, 12, 13. Nejvíce typů strukturálních změn bylo GTG nalezeno u chromozomů 1, 3, 5, 6, 17, FISH 1, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 20. Žádné nebyly nalezeny u chromozomů 4, 19, 20, 22 (GTG) a FISH u 15, 22. U X chromozomu GTG nasvědčovala 10 typům přestaveb, FISH prokázala jen jednu stabilní translokaci s tvorbou středně velkého metacentrického chromozomu. Stabilní nebyl chromozom č. 13. Jeho mnohočetné translokace (22 typů) tvoří nové chromozomy. Jsou důležité pro vitalitu permanentní linie a její permanentní růst in vitro. Vysoká aneuploidie linie je slučitelná jen s podmínkami umělého prostředí. Polymorfii dokumentuje i fakt, že pro životnost buněčné populace in vitro je nutná přítomnost alespoň jednoho standardního chromozomu nebo v případě nulisomie jeho mnohočetná přestavba. Dokazuje to monosomie 5 a nulisomie 13. Obecným pravidlem se ukazuje přímá úměrnost mezi hyposomiemi a strukturálními změnami. Čím častější je hyposomie chromozomu, tím častější je jeho přestavba. Toto pravidlo platí obvykle pro velké a střední chromozomy. Nepřímá úměra je mezi polysomiemi a strukturálními změnami. Čím častější je polysomie chromozomu, tím méně častá je jeho přestavba. Strukturální změny identifikovatelné FISH technikou barvení jsou častější nalézány než u GTG technikou sekvenčního barvení.

V literárních sděleních se uvádí, že maligní melanom lidského oka je velmi často aneuploidní a nenáhodně postihuje chromozom č. 6 (13, 14). Dalšími častěji se vyskytujícími aberacemi chromozomů jsou počtové i strukturální přestavby chromozomů 8, 3, (2, 12). Z literárních sdělení také vyplývá, že všechny chromozomy lidského karyotypu byly v maligních melanomech uvey, případ od případu, více či méně nekonstantně změněny (2, 4, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 23, 24). U gonosomů byly popsány pouze monosomie. Dlouhodobě pěstované linie z maligních melanomů jsou vzácné (11, 12). Některé však mají zachovanou tvorbu melanosomů nebo jejich vývojových stadií a jsou diferencovanými buňkami t.j. melanocyty (2, 4, 11, 16, 19). Naše linie tuto vlastnost ztratila (21, 24). Její genom je však permanentně vysoce aneuploidní a proměnný. V této proměnlivosti však zůstává konstantním (modus vyšší než 80 % při FISH detekci) chromozom 3, 8, 9, 10, 14,

Schema 1. Po analýze FISH technikou je karyotyp sumarizován v idiogram.

IDIOGRAM chromozomů VUP linie z maligního melanomu lidské kůže, sestavený podle nálezu FISH technikou (monocolor FISH). Tmavé úseky představují FISH technikou s příslušnou celochromozomovou sondou prokázané úseky. Centromera je naznačena čarou přetínající chromozom. Velikost chromozomů a jejich morfologie v idiogramu odpovídá relativním hodnotám a shoduje se se standardem ISCN.



19, a X v disomii, 5 v monosomii, 13 v nulismii a 15, 16, 17, 20 v trisomii. Chromozom 6 patří mezi ty, které mají sklon k trisomii a polysomii. Jeho přestavby se manifestují vzácně. Literární sdělení uvádějí především jeho polysomie, ze strukturálních pak delece „q“ ramene.

Numerické změny v permanentních liniích mají základ jednak v poruchách cytokinese, jednak v nadbytečné replikaci chromozomů, vedoucí především k trisomii. Trisomické se přitom stávají pouze predilekční chromozomy. Bez závislosti na tkáňovém nebo typovém původu permanentních linií jsou to chromozomy 6, 3, 12, 5, 7, 21, 10, 20 (3, 7, 10, 13). V naší linii to je chromozom 6, 15, 16, 17, 20 a 22. Strukturální přestavby chromozomů provázejí proliferaci permanentních linií stejně často jak polyploidisace. Predilekčními místy zlomů, v nichž dochází k následné reparaci vedoucí k translokacím jsou centromerické oblasti chromozomů 1, 3, 5. Intaktní jsou 8, 11. Telomerní oblast je často zaujata do přestaveb především u chromozomů 7, 8, 9, 11 a 14. (10). V četnosti jsou však pozorovány rozdíly. Jiná je u HeLa buněk, jiná u Hep 2, gliomů či leukemických linií. U linie VUP jsou prvořadými mnohočetné přestavby 13 chromozomu a chromozomů 1. a 7. Za typickou změnu v permanentních liniích je pokládána ztráta gonosomů. Především se ztrácí heterochromatinem bohatý X chromozom. Inaktivní X je ztrátový přednostně, a sekundárně aktivovaný druhý X je udržován permanentně v extrakopii. V parciálních polysomiích i kompletních polysomiích jsou obvykle v liniích udržovány chromozomy 1, 3, 5, 12, 16, 20 (10). V melanomových liniích to jsou 7p+, 10p+, 2p+, 2q+. Ztráty postihují 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11 a 17 (3). V naší linii VUP1 jsou predilekčními chromozomy se sklonem k polysomii pouze 6, 15, 16, 17, 20 a 22. Predilekčními místy zlomů jsou centromerická oblast chromozomu X, 3, 5 a telomerická oblast především chromozomu 13, 2. Ztráta X gonosomu není obvyklá. Udržuje se disomie a na nadbytečný centromerický fragment je translokována část, která tvoří delší rameno nově vzniklého chromozomu, který se konvenčně shoduje s morfologií X. Hybridisace DNA in situ však prokazuje, že jen část obsahuje strukturu chromozomu X. Druhá část nebyla identifikována a pochází z některého z autozomů. V parciálních polysomiích i kompletních polysomiích jsou obvykle v liniích udržovány chromozomy 1, 3, 5, 12, 16, 20 (10). V naší linii VUP 1 jsou to 6, 16, 17, 20, 21 a se strukturálními přestavbami Xp+, 3-p, 5p-, q-, 16q+, 19q+. Ztráty postihují 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 21.

Závěr

Heteronuklearita je v permanentní linii VUP z maligního melanomu uvevy pevně geneticky zakódována. Metodou hybridisace DNA in situ (FISH) jsme pozorovali, že všechny chromozomy lidské sady jsou v modálních bunkách numericky i strukturálně změněny. Množství změn jak numerických tak strukturálních je kvantitativně i kvalitativně u jednotlivých chromozomů odlišné. Jednoznačně nejproměnlivějším je chromozom č. 13. Ve všech karyotypech byla jeho struktura přestavěna. Vysoká aneuploidie linie je slučitelná jen s podmínkami umělého prostředí. Polymorfii dokumentuje i fakt, že pro životnost buněčné populace in vitro je nutná přítomnost alespoň jednoho standardního chromozomu nebo v případě nulismie jeho mnohočetná přestavba. Dokazuje to monosomie 5 a nulismie 13. Obecným pravidlem se ukazuje přímá úměrnost mezi hyposomiemi a strukturálními změnami. Čím čas-

tější je hyposomie chromozomu, tím častější je jeho přestavba. Toto pravidlo je obvyklé pro velké a střední chromozomy. Nepřímá úměra je mezi polysomiemi a strukturálními změnami. Čím častější je polysomie chromozomu, tím méně častá je jeho přestavba. Strukturální změny identifikovatelné FISH technikou barvení jsou častěji nalézány než u GTG sekvenčního barvení. Nejméně přestaveb se objevilo u chromozomů 15, 22, (žádná) a u X, 6, 10, 11 (jedna konstantní). Nejčastěji byl ztrátovou mutací numerickou postižen chromozom 1, 4, 5, 11, 21. Ostatní chromozomy byly zastoupeny v karyotypu alespoň jednou. Polysomie nepostihovala chromozomy 2, 3, 4, 7, 12, 19 a X a naopak polysomické byly velmi často chromozomy 6, 16, 17, 20, 21. Strukturální změny identifikovatelné hybridisací DNA in situ zahrnují v menším počtu delece a nejčastěji nejružnější přestavby. Řadu z nich nelze ani přesněji definovat. Nejvíce přestaveb zahrnuje ve své morfologii (fragment centrický jako základ) chromozom 1, 3, 4, 5, 7, 12, 13, 20. Nejvíce změněny, jak numericky tak strukturálně, (standardní je disomie, prokázaná centromera a standardní velikost chromozomu) jsou chromozomy 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 20, 21. Nejstabilnější numerická sada u jednotlivých chromozomů je disomie a to 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 19, 21, X. Trisomie je u 6, 15, 16, 17, 20, 22. Chybí zcela chromozom 13 a přestavbami tvoří nové typy chromozomů. V nových typech chromozomů jsou nejčastěji chromozom 1, 7, 13. Do žádné přestavby není zahrnut chromozom 15, 22. Jedinou konstantní přestavbu tvoří chromozom X, 10, 14 a 6. Tyto formace jsou rozhodující pro permanentního růst buněčných populací. X chromozom je jednoznačně v genomu buněk heteronukleární linie VUP přítomen v disomickém stavu a ženský původ zdroje, gonosomové konfigurace XX, je v buněčné populaci zachována. Sekvenční techniky barvení odkrývají polymorfismus v podstatně větším počtu. Přesto zařazení chromozomů podle jejich standardního rozložení pruhů a nomenklatury ISCN, často neodpovídá skutečné genové výbavě a skladbě. Metody hybridisace DNA in situ, FISH, dokazují komplikovanost a strukturální odlišnost řady morfologicky shodných chromozomů. Tím také dále rozšiřují nálezy polymorfie chromozomů a jejich genomových skladeb. Např. morfologicky řazený X chromozom je FISH technikou stanoven jako centrický fragmentem X s translokovaným acentrickým fragmentem jiných chromozomů, nebo mar - t, dříve pokládáný za „q“ rameno chromozomu 4 je vlastně tvořen centrickým fragmentem chromozomu 13 a acentrickým fragmentem chromozomu 1. Převažující disomie na př. u chromozomu 6 dokázaná GTG je FISH technikou jednoznačně jen ve čtvrtině buněk a převažuje trisomie, stejně jak disomie 13 zcela chybná pro nulismii prokázanou FISH nebo u 16, 17, 20 a 22 trisomie (GTG disomie).

Buněčné populace v permanentním růstu po 33 letech od izolování in vitro stále zachovávají heteronukleární charakter. Žádná z buněk neobsahuje převládající karyotyp s normální disomickou (diploidní sadou) chromozomů. Polymorfismus chromozomů jak strukturální tak numerický postihuje více či méně všechny chromozomy a tak genom převážně většiny buněk je zcela odlišný od lidského standardu. Idiogram linie je na schematu 1.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 4375 - 3 a NC/6148 - 2

Literatura

1. Buček J., Vrba M.: Ultrastructure of human uveal melanomas cultivated in cell culture. *Neoplasma* 23, 1976.
2. Dahlenfors R., Torqvist G., Wettrell K., Mark J.: Cytogenetical observations in nine ocular malignant melanomas. *Anticancer Research* 13, 1993, 1415-1420.

3. De Waard-Siebinga I., Blom D.J., Griffioen M., Schrier P.I., Hoogendoorn E., Beverstol Danen E.H., Jager M.J.: Establishment and characterization of an uveal-melanoma cell line. *Int.J.Cancer* 1762, 1995, 155-161.
4. Grammatico P., Roccella M., Catricala C., Roccella F., Bucher S., Mordenti C., Amantea A., Di Rosa C., Del Porto G.: Involvement of the 4q21 region in

- human malignant melanomas: cytogenetic and immunocytochemical characterization of three primary cell cultures. *World. J. Surg.* 19, 1995, 350-351.
5. Horsman D.E., Sroka H., Rootman J., White V.A. Monosomy 3 and a uveal melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 45, 1990, 249-253.
6. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995), Karger K., Basel 1996.
7. Kariyama C., Slavutsky I., Larriva I., Morvillo V., Bravo A.I., Bover L., Podhajcer O.L.: Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Res.* 8, 1995, 121-131.
8. Levan A., Fradga K., Sandberg A.A.: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52, 1964, 201. (cit. Riegr R., Michaelis A., Green M.: A glossary of genetics and cytogenetics. Springer 1968 str. 230.)
9. Luyten G. P. M., Naus N. C., Mooy C. M., Hagemeijer A., Kan - Mitchell J., Van Drunen E., Vuzevski V., De Jong T. V. M., Luidet T. M.: Establishment and characterization of primary and metastatic uveal melanoma cell lines. *Int. J. Cancer* 66, 1996, 380-387.
10. Mamaeva S.E.: Karyotypic evolution in cells in culture: A new concept. *Int. Rev. Cytol.* 18, 1998, 1-40.
11. Morse H.G., Moore G.E.: Cytogenetic homogeneity in eight independent sites in a case of malignant melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 69, 1993, 08-112.
12. Naus N. C., van Drunen E., de Klein A., Luyten G. P. M., Paridaens D. A., Alers J. C., Ksander B. R., Beverloo H. B., Slater R. M.: Characterization of complex chromosomal abnormalities in uveal melanoma by fluorescence in situ hybridization, spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes Cancer* 2001, 30, 267-273.
13. Pathak S., Drwina H.L., Hsu T.C.: Involvement of chromosome 6 in rearrangements in human melanoma cell lines. *Cytogen. Cell Genet.* 36, 1983, 573-579.
14. Robertson G.P., Coleman A.B., Lugo T.G.: Mechanisms of human melanoma cell growth and tumor suppression by chromosome 6. *Cancer Research* 56, 1996, 1635-1641.
15. Robertson G., Coleman A., Lugo T.G.: A malignant melanoma tumor suppressor on human chromosome 11. *Cancer Res.* 56, 1996, 4487-92.
16. Singh A.D., Boghosian-Sell L., Wary K.K., Shield C.L., DePotter P., Donoso, L.A., Shield J.A., Cannizzaro L.A.: Cytogenetic findings in primary uveal melanoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 72, 1994, 109-115.
17. Speicher M.R., Prescher G., du Manoir S., Jauch A., Horsthemke B., Bornfeld N., Becher R., Cremer T.: Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridisation. *Cancer Research* 54, 1994, 3817-3826-3.
18. Svejda J., Vrba M., Hornák O.: Karyotype und Ultrastruktur eines bösartigen menschlichen melanoms. *Arch. f. Geschwulst.* 43, 1974, 186-193.
19. Vrba M.: Human malignant melanomas of the uvea in cell culture. *Neoplasma* 21, 1974, 421.
20. Vrba M.: X-chromatin and the chromosome number of the cells from malignant melanoma of the eye. *Neoplasma* 21, 1974, 347.
21. Vrba M.: Human uveal melanoma cell line VUP 1. In *Intraocular tumours*. Bratislava 1989.
22. Vrba M.: Instabilita chromosomů indukovaná komplexy kovů platinové skupiny. 1996, IGA MZ CR 1893-3.
23. Vrba M.: Polymorfismus chromosomů v linii buněk z maligního melanomu uvey a jeho podíl na permanentním růstu in vitro. 1999, IGA MZ CR 4375-3.
24. Vrba M., Anton M., Krížová M., Fialová K., Chálová V., Vymazalová M.: Melanoblastom chorioidy ve dlouhodobé buněčné kultuře. *Cs. oftalmologie* 27, 1971, 282-284.