

**ÚJ MÓDSZEREK A DAGANATOK GENETIKAI
JELLEGZETESSÉGEINEK ÉS HETEROGENITÁSÁNAK
VIZSGÁLATÁRA**

Dr. Méhes Gábor



Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Patológiai Intézet

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
1.1. Daganatok kromoszomális instabilitása	3
1.2. Aneuploidia.....	4
1.3. A mitotikus szabályozás zavarai, a mitotikus kinázok.....	5
1.4. Vírus indukált aneuploidia	7
1.5. Új lehetőségek a ploiditás és a kromoszomális eltérések vizsgálatára	7
2. Célkitűzések.....	10
3. Eredmények.....	12
3.1. Módszertani fejlesztések	12
3.2. HPV indukálta aneuploidia vizsgálata cervix citológiai mintákban.....	15
3.3. Disszeminált daganatsejtek genetikai és funkcionális vizsgálata.....	17
3.4. Az Aurora B mitotikus kináz relatív expressziója	18
4. Megbeszélés	22
5. Hivatkozások jegyzéke.....	26
6. A doktori műhöz felhasznált saját közlemények jegyzéke	31
7. Scientometria	35

1. Bevezetés

1.1. Daganatok kromoszomális instabilitása

A rák kialakulásának általános, több lépéses modellje feltételezi, hogy léteznek korai, minden sejtre egyaránt jellemző és későbbi, a progresszió során kialakuló genetikai/biológiai eltérések, melyek a „darwini” szelekció elvét követve maradnak fent. Egy daganatos sejtpopuláció sejtjei tehát bizonyos szempontból nagyon hasonlítanak egymáshoz, ami a közös eredetre vezethető vissza (monoklonalitás). A daganat progressziója során azonban a tumorsejtek genomikai változásokon mennek keresztül, viselkedésük jelentősen megváltozik (agresszív fenotípus) és működésük a túlélésre, szaporodásra és a szétterjedésre összpontosít, a specifikus funkciók háttérbe szorulnak, elvesznek.

Az egyre agresszívabb hibák megjelenése mellett azonban nincs kizárva a kevésbé proliferatív kombinációk kialakulása sem, sőt, akár egyes meghatározó eltérések elvesztése is előfordulhat. A folyamat így fokozatosan vegyessé, heterogénné válik, mely egyaránt mutatja a leghatásosabb „driver” és az ismeretlen jelentőséggel bíró „passenger” eltéréseket is.

Általánosságban a molekuláris vizsgálatok eredményei és a kezelésekre adott válasz különbözősége is azt támasztja alá, hogy egy adott daganat genetikailag és funkcionálisan is heterogén. Ennek a heterogenitásnak és az agresszív klónok fejlődésének, szelekciójának a kérdése a daganatkutatás egyik központi kérdése. Nyilvánvaló, hogy a progresszió hátterében leginkább genetikai okokat kell keresni, de ezek kialakulása igen változatos folyamatok révén történik. A genom eltérései lényegesen gyakoribbak, mint a biológiailag/klinikailag jelentős ismert mutációk, aberrációk előfordulása, ezért a kérdést

ebben az összefüggésben, globálisan, a genomikai instabilitás oldaláról is érdemes megvizsgálni.

Valamennyi malignus daganattípusban gyakori a kromoszómák szerkezeti és számbeli összetételének a megváltozása (kromoszomális instabilitás, CIN). A kromoszóma abnormitások végső soron a gének pozíciójára, aktivációjára és mennyiségére egyaránt hatással vannak, mely a neoplasztikus sejtek genomjának átprogramozását eredményezi. Az átállás legalább öt szinten történhet: (I) a regulatórikus szekvenciák áthelyeződésével a génexpresszió megváltozik; (II) a kópiaszám változása kapcsán az aktív gének dózisa eltér; (III) szerkezeti változások révén aktiváció-inaktiváció jön létre (fúzió, in/del, stb); (IV) a környező szekvenciák megváltozásával bizonyos gének hozzáférhetősége módosul; (V) ezzel egyidejűleg a törésekre, vesztésre való hajlam változik [1].

A CIN lényegében minden esetben a genomikus DNS összmennyiségének a megváltozását is jelenti. A több, vagy kevesebb kromoszómaszám a kóros poliploidizáció, ill. ezzel párhuzamosan a kromoszómák profázisos kialakulása (kondenzáció) és anafázisos elrendezése (szegregáció) körüli zavar következménye [2,3]. A 2n genomikus DNS-tartalom eltérése mellett a vesztések, duplikációk révén egyes génlókuszokra a heterozigótaság elvesztése (LOH) jellemző, ami egyes tumor szupresszor gének működése szempontjából döntő fontosságú.

1.2. Aneuploidia

A normálistól eltérő kromoszómaszám és szerkezeti összetétel következtében megváltozó nukleáris DNS-mennyiséget *aneuploidia*nak nevezik. A DNS mennyiségi eltéréseket hagyományosan kariotipizálással, DNS citometriával és molekuláris

módszerekkel lehet kimutatni. Megkülönböztetünk hipodiploid (DNS vesztés) és hiperdiploid (több DNS) aneuploidiát. A sejtmagi DNS arányos megtöbbszöröződése a poliploidizáció, mely – mint látni fogjuk – fiziológiásan és egyes adaptív, nem neoplasztikus folyamatokban is létrejöhet.

Újabban az aneuploidia két formáját különböztetjük meg a daganatokban: stabil és dinamikus változó aneuploidia. Stabil esetben a sejtek döntő többségében ugyanazok a gyakran szerkezetileg is abnormális kromoszóma eltérések láthatók, melyek ritka, vagy csak átmeneti kromoszóma szegregációs zavar eredményei és a hiba valahol az őssejt szintjén, founder jelleggel keresendő. Instabilitás esetén a jelentős mértékű nyerések/vesztések a kromatin folyamatos szegregációs zavarának és töréseinek eredménye és magának a mechanizmusnak a fixált jellegére utal. Az instabil aneuploidia így végső soron megegyezik a kromoszómális instabilitás (CIN) fogalmával és igen gyakori jelenség szolid tumorokban (carcinomák, szarkómák).

1.3. A mitotikus szabályozás zavarai, a mitotikus kinázok

Az onkopatológiai gyakorlatban gyakran szembesülünk tumoros óriássejtek kialakulásával. Ezek a sejtek, akár izolált formában, akár klonális jelleggel, leginkább a sejtciklus, ill. a sejtosztódás hibáinak következtében alakultak ki és ha nem is egyértelműen rendelkeznek túlélési előnnyel, de mindenképpen a kifejezetten malignus fenotípust képviselik. Jelenlétükkel párhuzamosan a mikroszkópos vizsgálatok során gyakran észlelhetők aberráns mitózisok, ami a malignitás egyik igen markáns citológiai/szöveti jele.

A sejtosztódás korai szakában, a genom kromoszómákban való elrendeződése után a mitotikus orsóhoz való kötődés feltételeinek is

teljesülni kell. Ez a sejtmag és a kromatin igen komplex átalakulását jelenti, ami finom szabályozás alatt áll [4]. A kromatin kondenzációját több mechanizmus is indukálhatja különféle célokból. Normális körülmények között a sejtciklus G2 fázisának végén a kromoszómák a kromatin hiszton komponensének a modifikációja révén kezdenek kialakulni, mégpedig úgy, hogy a kromatinhoz célirányosan ún. „passenger” fehérjék (chromosome passenger complex – CPC) kötődnek.

Az Aurora B a CPC egyik prominens tagja, lényegében az enzimatikus effektor szerepét tölti be. A kromatin kondenzáció fő ingere a nukleosomális H3 hiszton (Ser10, Ser28) foszforilációja. A foszforilációt az Aurora B kináz végzi a vele interakcióban lévő fehérjék (INCENP, survivin, borealin) kíséretében, miután a G2 fázis során a sejtmagban expressziójuk fokozatosan emelkedik. A foszforiláció révén részt vesz a mitotikus orsó kialakításában is, legalább két ponton ismert a hatása (mikrotubulus stabilizálás – stathmin; mikrotubulus depolimeráz gátlás – MCAK) [5]. Ugyanakkor jelentős a hatása a kromoszómák orientációjában, mozgásában is a mikrotubulus-kinetochora kapcsolat folyamatos alakításával (oldás-kötés)[6]. Az igen szemléletes hipotézis szerint ebben a fázisban az AuroraB egyik fő feladata a téves kötődések következtében létrejövő feszülési és mozgatási hibák elkerülése, azaz a centromérák fizikai kivonása a „veszélyes zónából”.

A mitotikus kinázok overexpressziója a szolid és hematológiai malignitásokban egyaránt gyakori, az irodalom elsősorban az Aurora A és B szerepével foglalkozik. Fokozott Aurora B expressziót számos daganat esetében közöltek [7,8,9,10,11,12], egyértelműen csökkent expresszióról ugyanakkor nincs információnk. A fokozott Aurora B expresszió az irodalom alapján rossz prognózissal jár, ami azonban általánosan igaz a magas sejtproliferációval rendelkező tumorokra is.

1.4. Vírus indukált aneuploidia

Az egyes daganattípusok virális asszociációja már évtizedek óta feltételezett. Legismertebbek az Epstein-Barr vírus (EBV) és néhány prominens limfoproliferatív betegség, valamint a humán papilloma vírus (HPV) és egyes laphám eredetű tumorok, így a cervixrák, valamint a fej-nyaki régió daganatainak kapcsolata. A perzisztáló magas rizikójú, azaz onkogén potenciállal rendelkező HPV típusok hatásukat elsősorban a genom összetételének megváltoztatásával érik el. Ezzel párhuzamosan már a korai léziókban számbeli kromoszóma eltérések is megjelennek [13]. A kromoszómák gyakori numerikus eltéréseit ugyanakkor a vírusgenom által kódolt E6 és E7 onkoprotein fokozott expressziója és ennek részben eltérő következményei is magyarázzák. Míg az E6 fehérje centroszóma felszaporodást okoz, az E7 dirket módon zavarja a centroszóma ciklust és nagyobb komplexek kialakulásával járó centroszóma overduplikációhoz vezet [14]. Mindezen folyamatok eredményeképpen az immortalizált, esetlegesen túlélési előnnyel rendelkező laphámsejtek jelentős mennyiségű irreleváns genetikai hibával is rendelkeznek, gyakran kifejezett aneuploidia is fellép, mely akár a diszplasztikus/tumoros óriássejt mértékét is eléri.

1.5. Új lehetőségek a ploiditás és a kromoszomális eltérések vizsgálatára

A daganatsejt populációkban rejlő heterogenitás felismerése és vizsgálata biológiai és klinikailag is egyre nagyobb jelentőségű, hiszen a progresszió során az egyes sajátosságok eltűnése vagy megjelenése, új szubklónok keletkezése a folyamat megváltozását, klinikai viselkedését és a kezelés hatékonyságát döntően

befolyásolhatja. Az aneuploidia és annak változatossága legkorábban a genomikus DNS-tartalom mérésekkel, DNS-index meghatározásával volt megközelíthető [15]. A fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) a 90-es évek elejétől a sejtekben kimutatható kromoszomális eltérések igen hatékony és széles körben elterjedt módszere lett [16]. In situ jellegénél fogva a megcélzott eltérés sejtenként kimutatható és értelmezhető, sok sejt elemzése kapcsán pedig egy mintán belül különböző szubpopulációk határozhatók meg.

A 1990-es évek második felétől nyílt meg a lehetőség arra, hogy pásztázó mikroszkópok, citométerek segítségével nagy felületen elhelyezkedő sok sejt jelölődési sajátosságait több csatornában megmérve megvizsgáljuk. Mára technikailag többféle megközelítés került kidolgozásra, a legfontosabbak a (1) a lézeres scanning citometria (LSC), (2) az automatizált mikroszkópos képanalízis, ill. (3) a digitális szkennert alapú képanalízis.

- (1) A *lézert scanning citométer* (LSC) az áramláscitometria elvét követve az adott fluoreszcencia tartományban energiákibocsátást észlelve a jelölt sejteket, mint objektumokat regisztrálja a tárgylemezen és annak intenzitása alapján a sejteket grafikusán fel is tünteti (dot plot), ami sejtpopulációk azonosítását is lehetővé teszi. Ugyanakkor tényleges képet a mérés során nem rögzít az eseményről [17]. Ezt utólag, a rendszer mikroszkópján keresztül a kiválasztott események automatikus visszakeresésével lehet megtenni, amely a sejtekhez tartozó koordináták segítségével végezhető. Az LSC technika többek között a diagnosztikus citológiában keltett nagy reményeket, ahol az egyes sejtek morfológiai megítélésén túl bármely további sejszintű paraméter nagy segítséget jelenthet.
- (2) Az LSC „real time” elvével ellentétben a *mikroszkópos képanalízis* a mikroszkópos preparátum digitálisan felvett képének utólagos elemzését jelenti [18]. Ebben az esetben az összetevők

azonosítása, majd jellemzése képről képre, előre meghatározott, a jelöléseknek megfelelő algoritmus szerint történik. A többszínű jelöléseket külön fluoreszcencia csatornánként meghatározva és jellemezve végül valamennyi csatorna képének összevetésével további értelmezési lehetőségek lehetségesek. Egy tárgylemezről felvett sok kép esetén az azon elhelyezkedő azonosított sejtes elemek, struktúrák statisztikai kiértékelése lehetséges úgy, hogy a jellemző objektumok eleve tárolásra kerülnek és visszakereshetők. A képanalízis automatizációja természetesen megfelelő optikai kialakítású és nagyfelbontású kamerával ellátott motorizált mikroszkóppal precíz autofókuszálást követően lehetséges.

- (3) A képanalízis nyújtotta lehetőségeket tovább szélesítette a kb. 10 éve megjelent *digitális szkennerek* térhódítása. A tárgylemez szkennerek kifejlesztése és elterjesztése terén magyar szakemberek úttörő munkát végeztek [19]. Az eleinte csak fénymikroszkópos területen, de mára a fluoreszcenciával is kiváló technika szakít a hagyományos mikroszkópok felépítésével és a hangsúlyt az automatizáció minél jobb hatásfokára fekteti [20]. A digitális információ természetesen jó lehetőséget nyújt egyes képparaméterek elkülönítésére, mérésére. A virtuális mikroszkópia ezen formája napjainkban megy keresztül mindazon validációs folyamatokon, melyek a jövőbeni elfogadottságot, a klinikai diagnosztikában való alkalmasságot hivatottak alátámasztani [21,22,23].

2. Célkitűzések

Kutatási céljaink között elsősorban a daganatos és prékancerózus betegmintákból (citológiai preparátum, perifériás vér, csontvelő, szövettani metszet) származó sejtpopulációk genetikai összetételének, ezen belül az aneuploidia, kromoszomális kópiaszám eltérések minél precízebb jellemzése, valamint a kromoszomális instabilitás kialakulásának és progressziójának mechanizmusa és klinikai összefüggéseinek tanulmányozása szerepelt.

- *Technológiai fejlesztések:* a mikroszkópos képfeldolgozó technikák megjelenésével hatékony és érzékeny sejtszintű genomikai vizsgálatok kidolgozását tűztük ki célul. A lézer scanning citometria alkalmazásával a daganatsejtek ploiditását és kromoszomális összetételét párhuzamosan kimutató lehetőséget kívántunk kialakítani. Ennek alternatívájaként vizsgáltuk, milyen mértékben alkalmazható egy automatizált képanalízis rendszer a ritkán előforduló, disszeminált daganatsejtek citogenetikai és funkcionális elemzésére. A digitális metszetszkenner előnyös tulajdonságait a szövettani metszetek autofluoreszcens, „nem destruktív” vizsgálatára és egyes komplex molekulák immunhisztokémiai értékelésére kívántuk hasznosítani. A FISH technika fejlődésével megjelent, fokozott affinitással rendelkező „IQ-FISH” próbák előnyeit az emlő tumorok Her-2 genetikai tesztelésének gyorsított eljárásában kívántuk meg tapasztalni. Hasonlóképpen az elsők között vizsgáltuk klinikai mintákon, hogy a mutáns BRAF-fehérje elleni antitest klón milyen mértékben lehet hatékony a PCR-alapú módszerek kiváltására.
- *A daganatsejtek ploiditásának és kromoszomális összetételének jelentősége cervix prekancerózus állapotokban:* a korai

karcinogenezisben jellemző durva kromoszómahibák kialakulását és az aneuploidia klonális eredetének kérdését kívántuk tanulmányozni az LSC módszerével és összevetni a HPV fertőzés és a Bethesda-osztályozás szerinti citológiai elváltozásokkal. Azt kérdeztük, milyen mértékben egálálhatók és használhatók-e a magasan aneuploid hámsejtek a magas rizikójú cervikális eltérések jellemzésére. Meg kívántuk vizsgálni, hogy módszerünkkel észlelhetők-e a karcinogenezis ezen korai szakaszában a vírus transzformáló hatására jelentkező speciális, kromoszomális szintű eltérések.

- *A perifériás vérben keringő, ill. a csontvelőben kimutatható disszeminált daganatsejtek detektálása és genetikai jellemzése:* célul tűztük ki egyes szolid daganatokban (neuroblasztóma, emlőkarcinoma) kimutatható keringő, disszeminált tumorsejtek további elemzését automatizált mikroszkópiával támogatott in situ hibridizációval disszeminált neuroblasztómás betegek csontvelőmintáiban. Vizsgálatainkban a primer daganatra jellemző kromoszomális aberrációk gyakoriságára és az esetleges heterogenitás mértékére voltunk kíváncsiak. Hasonló módszerrel a vérkeringésben kimutatott daganatsejtek integritására, túlélési potenciáljára kerestünk in situ molekuláris (TUNEL) metodikával kimutatható jellegzetességeket.
- *Az Aurora B mitotikus kináz relatív expressziójának és deregulációjának meghatározása emlőkarcinoma és limfóma esetekben:* Hipotézisünk szerint az Aurora B expressziójának változása összefügg a daganatok ploiditásával és az agresszív fenotípussal. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a kináz expresszió meghatározható-e objektív módon a sejtkinetikai változók figyelembe vételével. Összefüggéseket kerestünk továbbá az

Aurora B expresszió és a kromoszomális instabilitás és a ploiditás változásának jelei között.

3. Eredmények

3.1. Módszertani fejlesztések

Az *LSC metodika* kiválóan alkalmasnak bizonyult standardizált szöveti preparátumok citometriai elemzésére. Így az emlőrákok receptorstátuszának és DNS-indexének együttes meghatározására új metodikát fejlesztettünk. Hasonlóképpen alkalmaztuk a DNS-index meghatározást cervikális citológiai preparátumok elemzésére és a HPV-asszociált ploiditás kimutatására (l. 3.2. fejezet).

Az automatizált immuncitokémiai/FISH (AIPF) kombináció kísérleteink alapján vetekszik a PCR-technika adta érzékenységgel. Immunfluoreszcencia körülményei között a megvizsgált sejtek mennyisége a sejtmagok festődése alapján megadható és eredményeink szerint egy tárgylemezre felvitt 1 millió (10^6) csontvelői sejtből az immunfluoreszcencia alapján akár 1-3 célsejt (esetünkben daganatsejt) megbízhatóan megtalálható volt. Ezek az immunpozitív sejtek az automatizált mikroszkópos rendszer (RCDetect, MetaSystems GmbH, Altlussheim, Németország) segítségével visszakereshetők és analizálhatók voltak, a sejtek azonosítását követően a második körben elvégzett (gyakran többszörös) FISH reakció az esetek döntő többségében jól értékelhetőnek bizonyult. Metodikai kísérletezés eredményeképpen a műszeres relokalizációval legalább három citogenetikai eltérést tudtunk kimutatni sejtenként hagyományos próbajelölés és összeállítás alkalmazásával. Az AIPF módszer segítségével nagyobb számban végeztünk méréseket a csontvelői és a perifériás vérben kimutatható korai disszemináció

kutatására neuroblasztómában és emlőkarcinómában. Megállapítottuk, hogy a ritka daganatsejtekben FISH módszerrel azonosítható jellegzetes citogenetikai eltérések a kromoszómaszám heterogenitása mellett is meglehetősen stabilnak mondható (l. 3.3. fejezet).

Munkáink során először volt lehetőségünk a DAKO cég által kifejlesztett, új összetételű DNS próbaelegy alkalmazásával, összesen 4 óra alatt elvégezhető, „egynapos” FISH módszert (IQ-FISH pharmDX, DAKO, Glostrup, Dánia) a klinikai gyakorlatban alkalmazni. Tanulmányunkban az eredményeket a hagyományos kétnapos módszerrel (HER2 pharmDX, DAKO) tudományos szempontok alapján statisztikailag is össze tudtuk vetni emlőkarcinoma eseteinkben. Tapasztalataink alapján a diagnosztikus célból végzett HER2 génamplifikáció kimutatás az új FISH módszerrel ugyanolyan megbízhatóan, de lényegesen gyorsabban elvégezhető, az előkezelések és a próba összetétele hatására a fluoreszcens jelek minősége (tisztaság, intenzitás) az esetek egy részében kifejezetten fokozódott. Tanulmányunk alapján az egynapos FISH (IQ-FISH) a rutin diagnosztika számára előnyös és ajánlható, kevesebb idő és reagens ráfordítással jár.

A legújabb szöveti vizsgálati technikák (fehérje és nukleinsav alapú vizsgálatok) azt igénylik, hogy a sejtek és szövetek azonosítása mellett a minta integritása megmaradjon, azaz a szövet feldolgozása vagy vizsgálata ne rontsa le a célmolekulák hozzáférhetőségét. Ennek az igénynek a kizárólag endogén molekulák fényemisszióján alapuló *szöveti autofluoreszcencia vizsgálata* kiválóan megfelel. Az elvet a gyakorlatban is hatékonyan alkalmaztuk festetlen szövettani metszetek sorozatvizsgálatával. Az autofluoreszcencia beszkennelése után a molekuláris vizsgálatra leginkább alkalmas minták kiválaszthatók, a megvizsgált minta pedig eredeti, változatlan formában kerülhet további feldolgozásra. Az ismert és kevésbé ismert

alkotók több hullámhosszon gerjesztve viszonylag szövetspecifikus emissziós mintázatot mutattak, ezek egymásra vetítésével pedig a szöveti kép összerakható volt. Gyakorlatunkban a hagyományosnak nevezhető UV (390 nm), kék (410 nm) és zöld (515 nm) gerjesztés mellett, három autofluoreszcens kép egymásra vetítésével az egyes szövettani preparátumok főbb sajátosságai, összetétele jellemezhetőek voltak. Munkánk eredményét az EPO (2006-ban) majd a WIPO által 2007-ben regisztrált szabadalmi beadványban foglaltuk össze (*WO2007062444 és WO2007062443*).

A mutáns fehérjék szöveti kimutatása a DNS-vizsgálatok hatékony alternatívája lehet. Az esetek egy részében a szekvencia hiba a fehérjék konformációjára jelentős hatással van, ami specifikus antitestekkel kimutatható új epitópok megjelenésével is jár. Az utóbbi évek egyik leghatékonyabb ilyen fejlesztése a BRAF fehérje ellen termelt antitest, mely a V600E mutáns specifikus kötésével szövettani vizsgálatokra is alkalmas (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A VE1 antitesttel kapott immunhisztokémiai eredményeink kiváló egyezést mutattak a szövetből izolált DNS-ből végzett, PCR reakciót követően kimutatott szekvenálási adatokkal Langerhans-sejtes hisztiocitózisban is (LCH). Az ugyanabból a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetből párhuzamosan elvégzett DNS-alapú PCR és immunhisztokémiai elemzés 14/15 esetben (93,3%) mutatott egyezést. BRAF mutációt 8/15 esetben (53,3%) tapasztaltunk. A nyolc V600E mutáns LCH-ből 4 végződött a beteg halálával, míg a BRAF vad típusú betegek mindegyike meggyógyult. Az egyes metszetekben a pozitivitás mértéke jellemzően konstans volt, eltéréseket az egyes tumorsejt göcökön belül és a göcök között sem tapasztaltunk egyazon mintában. Az intenzitás mértéke ugyanakkor esetről esetre eltért, ennek azonban az expresszió biológiai hátterén túl számos technikai oka lehet.

3.2. HPV indukálta aneuploidia vizsgálata cervix citológiai mintákban

A HPV valamennyi típusában leírták a vírus poliploidizáló hatását, azaz olyan sejtek képződését, amelyek endomitosis révén a normális genom (2c) egészszámú többszörösét tartalmazzák [24,25,26]. Ez a folyamat önmagában poliploid óriássejtek kialakulásához vezet, melyek DNS tartalma 4c, 8c, esetenként ennél lényegesen magasabb. Ezzel párhuzamosan a vírus indukálta kromoszomális instabilitás is fellép (nCIN, sCIN). A mechanizmus eredményeképpen az abnormális, aneuploid sejtek képződése viszonylag egyértelműen a magas rizikójú léziókra jellemző. Vizsgálatainkban elsőként a citológiaiilag egyértelműen a SIL (squamosus intraepitheliális lézió) valamelyik kategóriájába eső mintákat hasonlítottunk össze, 63 low-grade (LSIL) és 49 high-grade (HSIL) elemzésére került sor. A preparátumokban az aneuploid sejtek száma viszonylag alacsony volt, >5c sejteket mintánként 1-100, >9c DNS-tartalmú sejteket pedig 1-19 számban tudtunk kimutatni. Pozitívnak egy mintát akkor tekintettünk, ha legalább két, a mikroszkópban morfológiailag is igazolt ilyen esemény előfordult. Az aneuploid sejtek megjelenése az alacsony (LSIL) és magas rizikójú (HSIL) csoportban jelentős eltéréseket mutatott. A HSIL csoportban a teljesen negatív esetek aránya 3/49 (6,1%), ugyanez a LSIL esetében 18/63 (28,6%) volt ($p < 0,05$). Ezzel párhuzamosan a >9c sejtek előfordulása a HSIL esetén 45/49 (91,8%), míg LSIL diagnózis kapcsán csupán 5/63 (7,9%)-nak bizonyult ($p < 0,05$). Onkogén HPV típus jelenléte volt igazolható az LSIL esetek 76%-ában és a HSIL esetek 96%-ában. A HPV negatív, vagy nem onkogén besorolású (low-risk) HPV fertőzés esetén az LSC vizsgálat nem tudott egyértelműen magas aneuploid sejteket kimutatni. Összesen 44 ASCUS mintát megvizsgálva 27%-ban észleltünk onkogén HPV genomot, 7,0%-ban pedig durva aneuploid (>9c) sejteket. A vírustipizálás és a DNS-tartalom mérések egyaránt azt mutatták, hogy az ASCUS kategória

biológiaiilag leginkább a békésebb LSIL csoporthoz hasonlít, de a kiegészítő vizsgálatokkal a progresszív hajlamot mutató esetek jól megközelíthetők.

A >9c sejtek előfordulása szorosan kapcsolódik a követés során észlelt cervikális intraepitelialis neoplázia (CIN) mértékéhez. A legtöbb >9c aneuploid sejtet a legsúlyosabb szövettani elváltozásokban lehetett kimutatni, a CINIII/carcinoma in situ szövettani eredménnyel összefüggésben a gyakoriság 29/31 (93,5%), a tanulmányban szereplő két microinvasiv carcinoma mindegyike pozitívnak bizonyult.

A kromoszomális háttér részletes tanulmányozására az aneuploid sejtek, sejtpopulációk azonosítása után az egyes kromoszómák számának sejtenkénti meghatározásával a FISH módszere kiváló lehetőséget nyújtott. Az automatikus DNS-tartalom mérés (LSC készülékkel) ezt a megközelítést különlegesen hatékonyan támogatta. A hyperdiploid kóros sejteket a 3-as és a 17-es kromoszómára specifikus FISH reakciót követően az LSC mikroszkópjában relokalizálva elemeztük újra. A két centroméra jelölése alapján meghatározott kópiaszám a tapasztalataink szerint általánosságban jól jellemzi az egyes sejtmagokban fennálló mennyiségi DNS változásokat és a DNS-index-szel a kópiaszám jól korrelált. Ugyanakkor a két kromoszóma mennyisége sokszor nem párhuzamosan változott és gyakran kaptunk a normális többszörösétől eltérő, egyértelmű aneuszómiára utaló értékeket is. A DNS-ploidia fokozódásával ráadásul nem csak a kópiaszám emelkedett, hanem a két kópia aránya is egyre inkább eltért a normálistól (1:1), a jelentős aránytalanságokat a kromoszomális instabilitás (imbalance) mértékeként interpretáltunk.

A magasan aneuploid cervikális hámsejtekben a látszólag random alakuló kromoszomális rendezetlenség mellett a részletes FISH vizsgálat azt mutatta, hogy bizonyos fixált kromoszóma aránypárok (piros/zöld imbalance) a véletlen statisztikai valószínűséget messze

meghaladva fordulnak elő egyes, előrehaladott esetekben. A tanulmány keretében FISH-sel részletesen megvizsgált HSIL esetek 23,1%-ában (3/13) a >9c aneuploid sejtek jelentős része (>50%) fixáltan aberráns 3-as és 17-es kromoszóma arányt mutatott. A HSIL kiszűrt eseteiben a HPV fertőzött patológiás hámsejtek kromoszomális eltérései tehát a folyamat részleges klonalitására utalnak.

3.3. Disszeminált daganatsejtek genetikai és funkcionális vizsgálata

A kidolgozott AIPF kombináció segítségével igazoltuk a korábbi felvételeket, miszerint lokalizált neuroblastomában is az esetek jelentős részében kimutatható csontvelői disszemináció. A diagnóziskor végzett automatizált mikroszkópos csontvelővizsgálat valamennyi stádiumra vonatkozóan igen magas arányú, 86,3%-os (57/66) neuroblasztómás disszeminációt mutatott a hagyományos csontvelőkenetek vizsgálatával tapasztalt 46,9%-kal szemben (31/66 eset) a neuroblastoma diagnózisa idején ($p > 0,05$). Ennél még markánsabb különbség volt tapasztalható a kezelések kontrolljaként végzett követések alkalmával, amikor az automatizált AIPF keresés 50,0%-os találati rátája mellett a hagyományos citológia csupán 12,8%-ban állapított meg maradvány csontvelő érintettséget ($p > 0,05$). Az összesen 198 neuroblasztómás beteg csontvelőmintájára kiterjedő vizsgálatunkban 94 esetén (47,5%) kevesebb, mint $100/10^6$ (azaz 0,01%) daganatsejtet azonosítottunk.

A rendszerszerűen megvizsgált három leggyakoribb genetikai eltérés (NMYC, 1p36 és 17q) szempontjából a hibalehetőségek kizárása után lényeges heterogenitást a szóródott neuroblaszt sejtek között egyetlen mintában sem találtunk. NMYC génamplifikáció esetén a csontvelői disszeminált tumorsejtek teljes egésze amplifikáltnak

bizonyult, ennek mértéke állandó volt és a kópiaszám tekintetében megegyezett a primer tumorban észlelttel. Hasonlóképpen stabil eltéréseket észleltünk 17q gain és 1p36 deléció esetén is.

Módszerünkkel az előrehaladott emlőrákos betegek perifériás vérében meglepően nagy arányban, 42,1%-ban (8/19) lehetett keringő CK+/MUC1+ kettős pozitív daganatsejteket kimutatni, ezek gyakorisága preparátumonként 1-128 sejt volt. A mikroszkóp által kiszűrt pozitív események morfológiai vizsgálata során egyértelműen látszott, hogy az intakt tumorsejtek mellett „degenerált” küllemű alakok is jelen voltak a keringő vérben, melyek a sejtek progresszív jellegű citoplazmikus és sejtmag eltéréseket mutattak. Leginkább a fluoreszcensen feltüntetett citokeratin (CK) filament hálózat átalakulása volt feltűnő, míg a sejtfelszíni MUC1 expresszió viszonylag változatlan maradt. Mintáinkban a másodlagosan elvégzett TUNEL reakció a kettős immunpozitív tumorsejtek mikroszkópban való repozicionálása után tökéletesen igazolta, hogy az aberráns, apoptotikus CK mintázattal párhuzamosan kettősláncú DNS-törések is jelen vannak a sejtmagban. A viszonylag kisszámú megvizsgált vérminta alapján is megállapítható volt, hogy az apoptotikus tumorsejtek többségben lehetnek az intakthoz képest sőt, 3/19 (15,8%) emlőrákos esetben kizárólag apoptotikus sejteket azonosítottunk átlagosan 10^6 vérsejt vizsgálata során.

3.4. Az Aurora B mitotikus kináz relatív expressziója

Az aneuploidia kialakulásának egyik jelentős mechanizmusa a mitotikus kinázok működésének és kóros expressziójának a zavara. Míg az Aurora A szerepéről viszonylag egységes kép alakult ki a szakirodalomban, az Aurora B kináz deregulációjának megítélése sokáig nem volt egyértelmű. A sejtciklus egy meghatározott

szakaszára jellemző expresszió a sejtciklus sebességétől, tartamától és a sejtciklusban lévő sejtek számától is függ. Mindezek alapján a G2 fázis mértéke és az azt reprezentáló ciklikusan expresszáldó fehérjék mennyisége nem lehet független a teljes proliferációs frakció mértékétől. Immunhisztokémiai tanulmányainkban a fentiekben vázolt összehasonlításban kísérletük megvizsgálni az Aurora B és a Ki67 (Mib1) fehérjék expresszióját és egymáshoz való viszonyát. Az AuB/Mib1 (AMI) index mérőszámmal a sejtciklusban lévő sejtekhez viszonyítva adtuk meg az AuB expresszió mértékét egy adott daganatpopulációban. Normálisan proliferáló sejtvonalak immunfluoreszcens és szövettani tanulmányozása, valamint áramláscitometriás mérések alapján meghatározható volt, hogy kiegyensúlyozott körülmények között, intenzíven proliferáló sejtpopulációkban a G2+M frakció mértéke reálisan nem haladja meg a 25%-ot. Nagyobb értékekkel csak a G2/M fázis blokkolása, ill. a szabályozás súlyos deregulációja kapcsán lehet számolni.

Tanulmányunkban összesen 50 invazív emlőrák vizsgálatát végeztük el (45 duktális invazív, 5 lobuláris invazív karcinóma). A kiértékelés után a sejtproliferáció mértéke (Mib-1) és az AuB expressziója között viszonylag szoros lineáris korrelációt találtunk ($r=0,77$), az egyes szövetmintákban azonban nagyon eltérő értékeket kaptunk (1-95% vs 1-35%). A Her-2 státusz függvényében tovább elemezve, mind a Mib-1, mind az AuB expresszió magasabbnak bizonyult a Her-2 amplifikált csoportban ($p<0,05$), az AuB expresszió mértéke szorosan követte Mib1 pozitivitást, alátámasztva elképzelésünket, miszerint az AuB expresszió a fokozott sejtproliferáció velejárója.

Az AuB relatív expresszióját az AMI kiszámolásának segítségével közelítettük meg, mely igen változatos volt, értéke a teljes spektrumot felölelte (0-0,99; átlagosan $0,32\pm0,28SD$). A megvizsgált emlőkarcinómák közül 20/50 esetben (40,0%) lehetett emelkedett AMI értéket igazolni, azaz ezekben az esetekben abnormális

(over)expresszióról beszélhetünk. Az AMI értéke és az overexpresszió jelenléte statisztikailag függetlennek bizonyult a daganatok Her-2 státuszától ($p=0,19$).

FISH eredményeink alapján a megvizsgált emlőrákok 38%-ában (19/50) volt jellemző 17-es aneuszómia/poliszómia. E mellett a 17p13 eltérések is gyakran előfordultak, ez minden esetben lókuszt vesztésként jelentkezett. 10 esetben észleltük a TP53 lókuszt (20,0%) és 6 esetben az AURKB lókuszt (12,0%) vesztését, az utóbbi hatnál mindkét lókuszt érintett volt (kodeláció). Kópiaszám elemkedést, amplifikációt nem tapasztaltunk. Érdekes módon a 17-es kromoszómaszám és a TP53, ill. AURKB vesztés között szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető, a lókuszt vesztése a poliszómiás/aneuszómiás csoportban volt jellemző. A 17-es kromoszóma számának emelkedése és 17p13 lókuszt érintettsége (vesztése) között igen határozott volt az összefüggés, intakt 17p13 esetén átlagosan 2,1 centromérikus jel volt jelen, míg a TP53 és/vagy AURKB vesztés esetén átlagosan 3,14 jel volt megfigyelhető sejtenként ($p < 0,001$).

Míg a szakirodalom elsősorban az overexpresszió jelentőségével foglalkozik, az általunk alkalmazott relatív AuB expresszió (AMI) meghatározásával esetenként az expresszió csökkenését is tapasztaltunk. Az AURKB lókuszt vesztése és 17-es aneuszómia esetén az AMI mértéke alacsonyabbnak bizonyult, a csoportba tartozó eseteknél az expresszió tartománya beszűkült. Statisztikailag azonban egyértelmű összefüggés a 17p13 lókuszt vesztése és a kináz jelenléte között nem volt jelentős ($p=0.1$).

Az előzőekhez hasonlóan agresszív limfómák kinetikai sajátosságait is meghatároztuk a reaktív kontrollhoz képest. Ennek kapcsán észleltük a reaktív nyiroktüszők igen kifejezett sejtproliferációját, mely szignifikáns mértékben meghaladta a limfóma proliferációs kapacitását (Mib1 átlag 77,8% vs 63,6%). Ezt érdekes módon követte

az AuB expresszió mértéke, mely váratlanul magasnak bizonyult (30,45 vs 28,2 %). A kiszámított relatív AuB expresszió így a limfómákban minimálisan magasabb (AMI 0,39 vs 0,44), a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($p=0,65$). Meglepő ugyanakkor, hogy mindezek mellett az átlagos mitotikus aktivitás (H3 hiszton jelölődés alapján) lényegesen alacsonyabb agresszív limfómában, mint a reaktív centrum germinatívum B-sejtjeiben.

Az AuB expresszió fokozódását limfómában így is abban az esetben tekintettük mérvadónak, ha az elérte a sejtciklusban lévő sejtek 50%-át (AMI $>0,5$). Ilyen értéket 13/50 esetben (26,0%) tapasztaltunk. Egyes limfómákban az AMI kifejezetten emelkedett és meghaladta még a 0,75 értéket (8/50, 16,0%). Az AuB expresszió hátterében nem meglepő módon feltűnik a survivin expresszió dinamikus változása is, a survivin pozitivitás mértéke az AuB jelölődést az esetek döntő többségében meghaladta és statisztikailag a Mib1, az AuB és a survivin expresszió mértéke erős korrelációt mutatott. Az AMI abnormis emelkedését limfómában a survivin expresszió százalékos aránya is követte ($p<0,005$). A várakozásnak megfelelően a fokozott kináz expresszió/aktivitás mellett a mitotikus sejtfrakció is szignifikáns mértékben növekedett ($p<0,05$), jelezvén, hogy a közel azonos Mib1 jelölődés mellett jelentős sejtkinetikai eltérések állhatnak fenn a limfómák egyes csoportjaiban).

Genetikailag fixált mechanizmus direkt hatását az emlőtumorokhoz hasonlóan limfómában sem tudtunk kimutatni, az AuB expresszió a 17p13 lókuszt és a 17-es kromoszóma FISH módszerrel meghatározott kópiaszámát függvényében nem különböztött. A megvizsgált limfómák jelentős részben aneuszómiát találtunk a 17-es kromoszómára nézve. Összesítve 16/50 esetben (32,0%) észleltünk diszómiát, míg 25/50 esetben (50,0%) triszómia és 9/50 esetben (18%) tetraszómia közeli állapotot észleltünk. Ugyanakkor a 17-es kromoszóma számbeli eltérései szerint csoportosítva az eseteket a sejtproliferáció, a

survivin, az AuB és a foszfo-H3 expresszió tekintetében sem mutatkozott mérhető különbség. A 17-es kromoszóma eltéréssel reprezentált genom instabilitás tehát pusztán a mitotikus kináz expresszióval ill. a sejtklón agresszivitásával nem magyarázható.

Összesen 11/50 esetben tapasztaltuk a 17p13 lókuszt érintettségét, minden esetben vesztésről volt szó, ami kizárólag az aneuszómiával járó esetekben jelentkezett. AURKB vesztés önmagában nem, kizárólag a TP53 lókusszal együtt volt megfigyelhető. Mindössze 4 olyan limfóma volt található, ahol a két szomszédos lókuszt együttes vesztése igazolódott (8,0%). A régió érintettsége az agresszív limfómák alcsoportjaiban nem tért el lényegesen, nem tapasztaltunk jellemző kópiaszám különbségeket sem. Egyedül a B-ALCL-ben volt feltűnő, hogy valamennyi megvizsgált eset egyöntetűen TP53 vesztést mutatott.

4. Megbeszélés

Vizsgálataink során a malignus transzformáció során bekövetkező durva genomikus eltérésekkel, ezen belül a ploidotással, a kromoszómák számának, ill. egyes régiók kópiaszámának kimutatásával, a kialakulás mechanizmusaival és jelentőségével foglalkoztunk, többnyire újszerű megközelítésből, műszeres szövettani vizsgálatok keretében. Mindezt a digitális mikroszkópos technikák és a molekuláris módszertan gyors fejlődése tette lehetővé. Lényegében valamennyi, az elmúlt 20 évben megjelent fő technikai irányvonalat kipróbáltunk és eredményeinket nagyban köszönhetjük a laser scanning citometria (LSC), az automatizált mikroszkópos képanalízis, ill. a digitális szkennerek technikák alkalmazásának.

Tanulmányaink idején a HPV fertőzés biológiája és a sejtciklusra gyakorolt hatása csak részben volt ismeretes. Megfigyelésünk szerint a DNS-tartalom alapján patológiás cervix preparátumokban jelentősebb ploiditás eltérések mutathatók ki, melyek HPV asszociált óriássejt képződés formájában extrém méreteket is ölthetnek (>5c, >9c DNS tartalom). A ploiditás spektruma alapján a mintákban normális diploid, poliploid és aneuploid sejtek egyaránt jelen vannak, az eltérések – azaz a DI mértéke - meglehetősen random jellegűek. A véletlenszerűen kialakuló eltérések között progresszív esetekben ugyanakkor már viszonylag korán várható azon szubpopulációk megjelenése is, melyek szelekciós előnnyel rendelkeznek és genetikailag is klonális eltérést mutatnak.

A progresszió során a daganatsejtek – lényegében függetlenül a daganat stádiumától - folyamatosan szóródnak a keringésbe. Bár neuroblasztómában általánosan előforduló specifikus genetikai aberráció nem ismert, a tumorok jelentős része a kimenetelre is hatással lévő kromoszóma eltérést mutat. Az alkalmazott automatizált képanalízis módszere egyedülálló segítséget nyújt az immunfluoreszcens jelölésű (esetünkben GD2-pozitív) sejtek nagy érzékenységgű azonosításához. A sejtek utólagos morfológiai osztályozásával a FISH reakció differenciált kiértékelésére is mód nyílik. Az NMYC, a 1p36 és a 17q23 régiók vizsgálata során a várakozásnak megfelelően leggyakrabban a triszómia jelenségével találkoztunk. Heterogenitást kizárólag a kromoszómák száma tekintetében figyeltünk meg, a specifikus lókuszt eltérések a primer tumorhoz képest lényegében változatlan formában álltak fenn, beleértve az NMYC amplifikáció mértékét is. Következtetésünk alapján a megvizsgált szerkezeti eltérések a daganatban korán, a szisztémás disszeminációt megelőzően klonális jelleggel jönnek létre, és a progresszióhoz a szóródást követően is hozzájárulnak.

Az aktív sejthalál (apoptosis) morfológiai jeleit az automatikusan kiszűrt disszeminált neuroblasztóma sejtek egy részében is tapasztaltuk méréseink során. A folyamat mértékét ugyanakkor emlőrákos betegek véréből származó mintákban sikerült igazolni. A kettős jelöléssel kiválasztott keringő emlőrák sejtek jelentős része mutatott korai apoptotikus jelleget (keratin fragmentáció, inklúziók), és a szekvenciálisan alkalmazott TUNEL reakció a kettősláncú DNS töréseknek a sejtmagban való in situ kimutatásával igazolta a kromatin nukleosomális hasításának tényét. Az AIPF technikát azért is tekintjük igen eredményesnek, mert nem csupán a tumorsejtek túlélését serkentő genetikai tényezőket, hanem a pusztulás kapcsán jelentkező molekuláris változások jelentős részét is képes –igen érzékenyen - kimutatni az egyes sejtekben.

A kromoszomális instabilitás és aneuploidia kialakulásában a mitotikus kinázok hibás működését is feltételeztük. Az Aurora B kináz szövettani vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyes daganat szövetekben a tényleges proliferációt folytató, azaz ciklusban lévő sejtek száma változó, így várhatóan az AuB expressziójának mértéke az adott sejtpopuláció kinetikájával összefügg. Ebből következik, hogy az AuB szöveti meghatározásához a sejtproliferáció mértékének (teljes sejtciklus) ismerete szükséges. Az AuB expresszió sejtciklushoz viszonyított meghatározására általunk kidolgozott relatív érték, az AuB/Mib1 index (AMI) azonban érdekes összefüggéseket mutatott a megvizsgált szövettípusokban. A megvizsgált emlőkarcinómák jelentős hányadában igazolódott relatív overexpresszió, ez azonban – a jelentős proliferációs különbségek ellenére - az emlőrákok egyéb szöveti-biológiai tulajdonságaival nem függött össze. Ugyanakkor az agresszív limfómák tanulmányozásához kontrollként választott reaktív nyiroktüszőkben az AMI eleve nagyon magas volt, aminek magyarázatát a funkcionális okokból adódóan magasabb G2-fázis arányban találtuk. Ezzel ellentétben az agresszív B-

sejtes limfómákban a sejtprolifерáció mértéke szintén viszonylag magas, de ezzel párhuzamosan az AuB expresszáló G2 fázisos sejtek alacsonyabb aránya a G2 fázis rövidülésére utal. Bizonyos limfómás esetekben azonban az AuB relatív expresszió kimagasló ($AMI > 0,5$), amit tényleges overexpresszióként kell értékelnünk.

FISH vizsgálataink alapján az emlőrákok 12,0%-ában (6/50 esetben), a limfómák 8,0%-ában (4/50) a veszteség az AURKB és a TP53 gént egyaránt érintette. A 17p13 régióban észlelhető, citogenetikai szinten mérhető genetikai eltérések ugyanakkor kevés, ill. statisztikailag nem megerősíthető összefüggéseket mutattak az AuB expressziójával a sejtkinetikai szempontok korrigálása után. Az AURKB és TP53 kodelécia viszonylag ritka, de kizárólag 17-es kromoszóma aneuszómia esetén volt tapasztalható. Ez az észlelés felveti annak a lehetőségét, hogy a kodelécia egy esetleges funkcionális szinergizmust is eredményez a sejtek túlélése szempontjából (Aurora B dereguláció és aneuploidia + p53 deficiencia).

A tényleges overexpresszió és a fokozott proliferációs aktivitás egyaránt jó célpontot kínál az Aurora-kináz gátló kezelések számára. Pillanatnyilag azonban még tisztázatlan, hogy mely daganattípusok lesznek az Aurora-blokkolók igazi indikációi a klinikai gyakorlatban. Munkáinkban a szöveti szintű prediktív vizsgálatok egyik kényes kérdésének, a relatív fehérje expresszió egy esetleges klinikai döntést segítő immunhisztokémiai vizsgálatának alapjait is le kívántuk fektetni.

5. Hivatkozások jegyzéke

1. Pihan GA. (2013): Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprograming in cancer
Front Oncol; 3:277.
2. Schwartzman JM, Sotillo R, Benezra R. (2010): Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease
Nat Rev Cancer; 10(2):102-15.
3. Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA. (2010): Mechanisms of chromosomal instability
Curr Biol; 20(6):R285-95.
4. Nigg EA (2001): Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints
Nat Rev Mol Cell Biol; 2(1):21-32.
5. Gadea BB, Ruderman JV. (2006): Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin
Proc Natl Acad Sci USA; 103 (12): 4493-8.
6. Liu D, Lampson MA. (2009): Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase
Biochem Soc Trans; 37(Pt 5):976-80.
7. Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N (2004): High expression of Aurora-B/Aurora and Ip11-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas
J Neurooncol; 67(1-2):53-64.

8. Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D (2006): Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation
Prostate; 66(3):326-33.
9. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, Booton R, Santibáñez-Koref MF, Heighway J (2005): Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability
Br J Cancer; 93(6):719-29.
10. Zeng WF, Navaratne K, Prayson RA, Weil RJ (2007): Aurora B expression correlates with aggressive behaviour in glioblastoma multiforme
J Clin Pathol; 60(2):218-21.
11. Chen YJ, Chen CM, Twu NF, Yen MS, Lai CR, Wu HH, Wang PH, Yuan CC (2009): Overexpression of Aurora B is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients
Virchows Arch; 455(5):431-40.
12. Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, Adachi Y, Nishioka C, Furihata M, Koeffler HP, Yokoyama A (2009): Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma
Lab Invest; 89(12):1364-73.
13. Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, Kamps MA, Herrington CS, Morrison LE, Speel EJ, Smedts F, Ramaekers FC. (2006): Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly

associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer.

J Pathol; 210(4):412-9.

14. Duensing A, Spardy N, Chatterjee P, Zheng L, Parry J, Cuevas R, Korzeniewski N, Duensing S. (2009): Centrosome overduplication, chromosomal instability, and human papillomavirus oncoproteins
Environ Mol Mutagen; 50(8):741-7.
15. Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H (2010): Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry
Adv Exp Med Biol; 676:137-47.
16. Wilkinson DG (1998): In situ hybridization - a practical approach
Oxford, University Press, New York
17. Pozarowski P1, Holden E, Darzynkiewicz Z (2013): Laser scanning cytometry: principles and applications-an update
Methods Mol Biol; 931:187-212.
18. Wollman R, Stuurman N (2007): High throughput microscopy: from raw images to discoveries
J Cell Sci; 120(Pt 21):3715-22.
19. Molnar B, Berczi L, Diczhazy C, Tagscherer A, Varga SV, Szende B, Tulassay Z (2003): Digital slide and virtual microscopy based routine and telepathology evaluation of routine gastrointestinal biopsy specimens
J Clin Pathol; 56(6):433-8.

20. Varga VS, Bocsi J, Sipos F, Csendes G, Tulassay Z, Molnár B (2004): Scanning fluorescent microscopy is an alternative for quantitative fluorescent cell analysis.
Cytometry A; 60(1):53-62.
21. López AM, Graham AR, Barker GP, Richter LC, Krupinski EA, Lian F, Grasso LL, Miller A, Kreykes LN, Henderson JT, Bhattacharyya AK, Weinstein R (2009): Virtual slide telepathology enables an innovative telehealth rapid breast care clinic.
Hum Pathol; 40(8):1082-91.
22. Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Dasevicius D, Elie N, Plancoulaine B, Bor C, Herlin P (2012): Digital image analysis in pathology: benefits and obligation.
Anal Cell Pathol (Amst); 35(2):75-8.
23. Kayser G, Kayser K (2013): Quantitative pathology in virtual microscopy: history, applications, perspectives
Acta Histochem; 115(6):527-32.
24. Lorenzato M, Clavel C, Masure M, Nou JM, Bouttens D, Evrard G, Bory JP, Maugard B, Quereux C, Birembaut P (2001): DNA image cytometry and human papillomavirus (HPV) detection help to select smears at high risk of high-grade cervical lesions
J Pathol; 194(2):171-6.
25. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M (2004): DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in

intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri

Clin Cancer Res; 10(9):3059-63.

26. Hu L, Potapova TA, Li S, Rankin S, Gorbsky GJ, Angeletti PC, Ceresa BP (2010): Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication.

Virology; 405(2):342-51.

6. A doktori műhöz felhasznált saját közlemények jegyzéke

- 1) Bollmann R, **Méhes G** (2004): Analysis of tissue imprints by scanning laser cytometry.
Curr Protoc Cytom; Chapter 7:Unit 7.22.
- 2) Bollmann R, Torka R, Schmitz J, Bollmann M, **Méhes G** (2002): Determination of ploidy and steroid receptor status in breast cancer by laser scanning cytometry.
Cytometry; 50(4):210-5.
- 3) Ambros PF, **Méhes G** (2004): Combined immunofluorescence and FISH: new prospects for tumor cell detection/identification.
Curr Protoc Cytom; Chapter 8:Unit 8.13.
- 4) **Méhes Gabor**, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur automatischen analyse von biologischen proben / Graz, Oridis Biomed Forshcungs- und Entwicklungs GmbH
<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062444>
- 5) **Méhes Gabor**, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur bestimmung der relevanz von probenarraypreparaten
Graz, Oridis Biomed Forshcungs- und Entwicklungs GmbH
<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062443>

- 6) Bollmann R, **Méhes G**, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M (2003): Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples.
Cancer; 99(1):57-62.
- 7) Bollmann R, **Méhes G**, Speich N, Schmitt C, Bollmann M (2005): Aberrant, highly hyperdiploid cells in human papillomavirus-positive, abnormal cytologic samples are associated with progressive lesions of the uterine cervix.
Cancer; 105(2):96-100.
- 8) Bollmann R, **Méhes G**, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M (2003): Determination of features indicating progression in atypical squamous cells with undetermined significance: human papillomavirus typing and DNA ploidy analysis from liquid-based cytologic samples.
Cancer; 99(2):113-7.
- 9) **Méhes G**, Speich N, Bollmann R, Bollmann M (2004): Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL).
Pathol Oncol Res; 10(3):142-8.
- 10) Ambros PF, **Méhes G**, Ambros IM, Ladenstein R (2003): Disseminated tumor cells in the bone marrow - chances and consequences of microscopical detection methods.
Cancer Lett; 197(1-2):29-34.
- 11) **Méhes G**, Luegmayr A, Kornmüller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF (2003): Detection of disseminated tumor

cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology.

Am J Pathol; 163(2):393-9.

- 12) **Méhes G**, Witt A, Kubista E, Ambros PF (2001): Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic.

Am J Pathol; 159(1):17-20.

- 13) Hegyi K, **Méhes G** (2012): Mitotic failures in cancer: Aurora B kinase and its potential role in the development of aneuploidy.

Pathol Oncol Res; 18(4):761-9.

- 14) Hegyi K, Egervári K, Sándor Z, **Méhes G** (2012): Aurora kinase B expression in breast carcinoma: cell kinetic and genetic aspects.

Pathobiology; 79(6):314-22.

- 15) **Méhes G**, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rózsa T, Kiss C (2014): Activating BRAF V600E mutation in aggressive pediatric Langerhans cell histiocytosis: demonstration by allele-specific PCR/direct sequencing and immunohistochemistry.

Am J Surg Pathol; 38(12):1644-8.

- 16) Thallinger GG, Baumgartner K, Pirklbauer M, Uray M, Pauritsch E, **Mehes G**, Buck CR, Zatloukal K, Trajanoski Z (2007): TAMEE: data management and analysis for tissue microarrays

BMC Bioinformatics; 8:81.

- 17) Bedekovics J, Szeghalmy S, Beke L, Fazekas A, **Méhes G** (2014): Image analysis of platelet derived growth factor receptor-beta

(PDGFR β) expression to determine the grade and dynamics of myelofibrosis in bone marrow biopsy samples.

Cytometry B Clin Cytom; 86(5):319-28

- 18) Hegyi K, Lønborg C, Mónus A, **Méhes G** (2013): One-day FISH approach for the high-speed determination of HER2 gene copy status in breast carcinoma.

Appl Immunohistochem Mol Morphol; 21(6):567-71.

7. Scientometria

Összes in extenso folyóiratcikk száma:	86 (60 angol, 26 magyar)
Első szerzős közlemények száma:	21 (16 angol, 5 magyar)
Utolsó szerzős közlemények:	19 (12 angol, 7 magyar)
Könyvfejezetek száma:	4
Szabadalmak:	2
In extenso közlemények impakt faktora:	148,0
Független hivatkozások száma (összes):	681 (800)
Impakt faktor a PhD megszerzése előtt:	37,1
Impakt faktor a PhD megszerzése után	110,9
Első és utolsó szerzőségű közlemények száma:	40
Impakt faktora:	65,0
Az értekezéshez felhasznált közlemények száma:	16
Impakt faktora:	43,42
Idézettség: független (összes):	265 (298)
Hirsch index:	16

Támogató pályázat:

TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045: „Vaszkuláris és kardiális kutatóhálózat: Az ér- és a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusai, diagnosztikái, farmakológiai befolyásolhatóságuk az alapkutatás szintjén” című pályázat

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszecenylterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

