dc_1004_15

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ÚJ MÓDSZEREK A DAGANATOK GENETIKAI JELLEGZETESSÉGEINEK ÉS HETEROGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATÁRA

Dr. Méhes Gábor

DEBRECENI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
PATHOLOGIAI INTÉZET

Debrecen, 2015

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 5

1. Bevezetés 7

1.1. A rák, mint genetikai betegség 7

1.1.1. A szomatikus génhibák és a karcinogenezis 7

1.1.2. Klonalitás és heterogenitás 7

1.1.3. A genetikai heterogenitás mint szelekciós tényező 8

1.2. Karcinogenezis és genomikus instabilitás 9

1.2.1. A DNS eltérések jellege 9

1.2.2. Nukleotid-szekvencia szintű DNS eltérések 10

1.2.3. Kromoszomális instabilitás (chromosomal instability, CIN) 10

1.2.4. Szerkezeti eltérések, „durva" kromoszómahibák (GCR - gross chromosomal rearrangements) 12

1.2.5. Chromoanagenesis 13

1.3. Az aneuploidia és a kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok 15

1.3.1. Az aneuploidia jelensége 15

1.3.2. Mitotikus kinázok és sejtosztódási defektusok 17

1.3.3. Egyéb mitotikus kinázok – Plk, Nek 21

1.3.4. A mitotikus kinázok klinikai jelentősége 21

1.3.5. Centroszóma diszfunkció és aneuploidia 22

1.3.6. Poliploid és aneuploid óriássejtek képződése 24

1.3.7. Vírusok indukálta genetikai instabilitás/aneuploidia 26

1.3.8. Aneuploidia gyakorisága és okai a különböző daganatokban 28

1.3.9. A genetikai eltérések hatása a tumoros fenotípusra, genetikai alapú kóros génexpresszió 29

1.4. Szövettani in situ technológiák és szerepük a genetikai instabilitás és az azzal összefüggő szöveti eltérések tanulmányozásához 30

1.4.1. Morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok 30

1.4.2. In situ hibridizáció 31

1.4.3. Citometria és morfometria alkalamzása a genetikai heterogenitás kimutatására 32

2. Célkitűzések 34

3. Citometriai és molekuláris morfológiai módszerek a genetikai és fehérjeexpressziós sajátosságok in situ vizsgálatára 36

3.1. Laser scanning citometria a DNS-ploidia és fehérjeexpresszió együttes vizsgálatára: DNS-index és receptor státusz meghatározás emlőkarcinomában 36

3.2. Az automatizált immunfluoreszcencia plusz FISH (AIPF) technológia ritka sejtek kimutatására 38
3.3. Új eljárások a FISH technika hatékonyabb alkalmazásához 40
3.3.1. Egynapos in situ hibridizáció (IQ-FISH) a klinikai gyakorlatban 40
3.3.2. Automatizált képanalízis FISH jelek kiértékelésére 40
3.4. Képanalízis digitálisan scannelt immunhisztokémiai preparátumokban 43
3.5. Nem-destruktív autofluoreszcencia paraméterek alkalmazása szövet- és egyéb biológiai preparátumok képanalitikai jellemzésére 44
3.6. Mutáns fehérjék kimutatása mutáció specifikus antitestek alkalmazásával: a BRAF-mutáció szövettani kimutatása 47
3.7. Szöveti és sejtszintű vizsgálatok perspektívái a molekuláris genetika és genomszekvenálás korában 49
4. A kromoszomális eltérések előfordulása és jelentősége a daganat progresszió és heterogenitás létrejöttében 51
4.1. DNS-ploiditás és kromoszomális instabilitás onkogén HPV fertőzéssel összefüggésben cervix citológiai preparátumokban 52
4.1.1. Cervikális léziók és HPV infekció 52
4.1.2. HPV indukálta genomikus eltérések 53
4.1.3. DNS-tartalom eltérések HPV-asszociált cervikális léziókban: a súlyosan aneuploid sejtek (>5c, >9c) kimutatása LSC módszerével 54
4.1.4. Kromoszómális instabilitás vizsgálata magas-rizikójú SIL-ben 58
4.2. Disszeminált daganatsejtek azonosítása és jellemzése genetikai és immunmarkerek alapján 62
4.2.1. Neuroblastoma sejtek csontvelői disszeminációjának vizsgálata 62
4.2.2. Keringő daganatsejtek funkcionális állapotának vizsgálata AIPF metodikával 65
4.3. A sejtosztódás szabályozási zavarainak szerepe a kromoszomális instabilitás és a genetikai heterogenitás létrejöttében 69
4.3.1. A mitotikus szabályozás és az Aurora kinázok vizsgálata szöveti körülmények között 69
4.3.2. A sejtciklus és a relatív Aurora B kináz expresszió 70
4.3.3. Az Aurora B kináz és a vele interakcióban lévő regulátorok expressziója agresszív nagy B-sejtes limfómákban 76
5. Megbeszélés 82
5.1. A genom kópiaszám eltérései és az aneuploidia jelentőségének újraértékelése 82
5.2. In situ molekuláris vizsgálatok 83
5.3. HPV asszociált aneuploidia és óriássejt képződés 84
5.4. A daganatsejt disszemináció genetikai és funkcionális jellegzetességei 87

5.4.1. A hematogén disszemináció klinikai jelentősége 87

5.4.2. A kromoszóma aberrációk stabilitása progresszió során neuroblasztómában. 88

5.4.3. Funkcionális vizsgálatok disszeminált (keringő) daganatsejtekben 90

5.5. Az Aurora B kináz és sejtciklus dereguláció lehetséges szerepe az aneuploidia kialakulásában 92

5.5.1. Sejtkinetika és relatív kinázexpresszió 92

5.5.2. Az AURKB lókusz eltérései emlőrákban és limfómákban 94

5.5.3. Az Aurora-kináz szövettani meghatározásának jelentősége 94

5.6. Az aneuploidia és az allélikus heterogenitás összefüggése és hatása a tumorgenom stabilitására 96

5.7. Perspektívák a genomikai heterogenitás megismerésében 97

6. Összefoglalás 99

7. Irodalomjegyzék 101

8. Saját in extenso közlemények jegyzéke 126

8.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények 126

8.2. Egyéb in extenso közlemények jegyzéke 128

8.3. Nemzetközi szabadalom 136

9. Scientometriai adatok 137

Rövidítések jegyzéke

AGUS: atypical glandular cells of unknown significance

ALK: anaplastic lymphoma kinase

AMI: AuroraB/Mib-1 index

ASCUS: atypical squamosus cells of unknown significance

AuA: Aurora A

AuB: Aurora B

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BCR: breakpoint cluster region (9q32 kromoszóma lókusz)

CGH: comparative genome hybridization

CIN: cervikális intraepitéliális neoplázia

CIN: chromosomal instability

CML: chronic myeloid leukaemia

CMV: citomegalia vírus

CPC: chromosome passenger complex

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma

DNS: dezoxiribonukleinsav

DSB: double-standed breaks

EBV: Epstein-Barr vírus

EGFR: epidermal growth factor receptor (felszíni növekedési faktor receptor)

EWS: Ewing sarcoma

FISH: fluorescens in situ hibridisatio

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

GCB: germinal centre B-cell-like

GCR: gross chromosomal rearrangement

Her-2: humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa

HPV: humán papilloma vírus

HR: homológ rekombináció

HRS: Hodgkin-Reed-Sternberg-sejtek

HSIL: high-grade squamosus intraepithelialis lesion

IPSS: international prognostic scoring system

K-ras: „Kirsten”-ras proto-onkogén

LCH: Langerhans-sejtes hisztiocitózis (Langerhans cell histiocytosis)

LOH: loss of heterozygosity

LSC: laser scanning cytometry

LSIL: low-grade squamosus intraepithelial lesion

MMR: mismath repair

nCIN: numerical chromosomal instability

NHEJ: non-homologous end joining

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PIk: polo-like-kináz

RNS: ribonukleinsav

sCIN: structural chromosomal instability

SIL: squamosus intraepithelialis lesion

SKY: spectral karyotyping

SNP: single nucleotide polymorphism

TAMEE: tissue array management and evaluation environment

TERC: telomerase

TMA: tissue microarray

TP53: p53 tumor szupresszor gén

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase mediated uridine nick-end labeling

1. Bevezetés

1.1. A rák, mint genetikai betegség

1.1.1. A szomatikus génhibák és a karcinogenezis

Az elmúlt évtizedekben folyamatosan gyűltek az adatok annak az alátámasztására, miszerint a kancerogenezis valójában szomatikus genetikai eltérések láncolatán keresztül megy végbe [1]. A különféle daganattípusok kialakulása lazán asszociált lókuszok öröklött vagy szerzett, több lépésben bekövetkező hibáinak köszönhető [2]. A génhibák természetes körülmények között, spontán is megjelennek a normális sejtekben, nukleotid hibák 10^{-6}-10^{-7} /sejtosztódás frekvenciával [3], génátrendeződések, törések ennél egy nagyságrenddel gyakrabban, 10^{-4}-10^{-5} /sejtosztódás gyakorisággal [4]. A génhibákra való esetlegesen fennálló hajlam, vagy az azokat előidéző hatások a spontán hibák, a genetikai instabilitás mértékét tovább fokozzák és jelentősen hozzájárulnak a malignus transzformációhoz. A genetikai hatások összességének eredményeként még így is évekig tarthat, mire a driver mutációk tényleges neopláziához és annak progresszióhoz vezetnek, a köztes állapotokat prekancerózus elváltozásnak, diszpláziának hívjuk (pl. adenomatózus polip, Barrett-özofágusz, cervix diszplázia/intraepithelialis neoplázia).

1.1.2. Klonalitás és heterogenitás

A rák kialakulásának általános, több lépéses modellje feltételezi, hogy léteznek korai biológiai eltérések, melyek minden sejtre egyaránt jellemzőek és későbbi, a progresszió során kialakuló jellemzők, melyek a „darwini” szelekció elvét követve maradnak fent. A biológiai paraméterek genetikai, génexpressziós és fehérje szinten is megközelíthetők. Fontos azonban leszögezni, hogy a folyamatok rendkívül összetettek, így számos genetikai eltérés génexpresszióra gyakorolt hatása nem ismert, míg gyakran tapasztalunk olyan fehérje expressziós eltérést, melynek hátterében genomikai okot egyelőre nem lehet kimutatni. Részben, modell szinten magyarázattal szolgálnak minderre a kromatin szerveződésének bonyolult szabályozási mechanizmusai és a poszt-transzkripciós modifikációk különböző módjai, a mikro-RNS-ek hatásának, az mRNS hasítási variánsok jelentőségének megismerése.

Mindez előre vetíti, hogy egy daganatsejt populáció sejtjei csak bizonyos szempontból hasonlítanak egymáshoz, ami a közös eredetre vezethető vissza (monoklonalitás). Egyes esetekben, így bizonyos hematológiai malignitások és ritkább szolid tumorok egy részében

erre egyértelmű jelek utalnak. A legkoraibb, már túlélési előnnyel járó eltéréseket „founder" mutációknak nevezzük. A Philadelphia-kromoszóma pozitív leukémiákban (CML, ALL) pl. a génfúzió a leukémiás klón minden sejtjében ugyanúgy jelen van, mivel a klonogén őssejt szinten jelentkezik az eltérés és jelentős túlélési előnyt jelent a sejtklón számára [5;6]. Ehhez hasonlóan az EWS gén aktivációval járó transzlokációi határolják körül a Ewing-szarkóma családhoz besorolható daganatokat [7]. Ugyanakkor az immunglobulin nehéz- és könnyűlánc gének átrendeződéséből eredő klonalitás egyértelműen jelzi a B-sejtes limfómák monoklonális eredetét és a klonogén „ősi" sejt jellegére utal, azonban itt a génátrendeződés önmagában a klinikai progresszió szempontjából nem meghatározó [8]. Ilyen esetekben is alkalmas azonban a kimutatott klonális paraméter, esetlegesen több paraméter mintázata a tumoros klón azonosítására és követésére.

1.1.3. A genetikai heterogenitás mint szelekciós tényező

A daganat progressziója során a tumorsejtek viselkedése jelentősen megváltozik (agresszív fenotípus), a sejtek működése a túlélésre, szaporodásra és a szétterjedésre összpontosít, a specifikus funkciók háttérbe szorulnak, elvesznek. Ennek oka a terjedést irányító új, „driver" gének expressziójának megjelenése, aktivitásának fokozódása, mellyel párhuzamosan a szupresszor gének funkciója csökken, elvész. Mindez a daganat kialakulásának igen korai fázisától jelentkezhet. A rákmegelőző állapotokban, korai rákokban a monoklonalitás a változatos genetikai hibák ellenére még csak korlátozottan kimutatható, mivel az immortalizált sejtekben a proliferációs előny még nem jelent meg.

A fenotipikus eltérések a progresszió során egyre agresszívabb formát öltenek, azonban ez nem zárja ki a kevésbé proliferatív kombinációk kialakulását, jelenlétét sem. A folyamat így fokozatosan vegyessé, heterogénné válik, mely egyaránt mutatja a leghatásosabb „driver" és az ismeretlen jelentőséggel bíró „passenger" eltéréseket is. A daganat szempontjából nyilvánvalóan a legagresszívabb szubklón szerepe a mérvadó, de ennek jellege gyakran nem egyértelmű. Létezhetnek lokálisan proliferációra és inkább invázióra hajlamosító, vagy a terápiás hatást semlegesítő eltérések, ezek egyensúlyából adódik majd a daganatos betegség tényleges lefolyása.

Sajnos még egy-egy gén, vagy konkrét kromoszóma hiba esetén sem teljesen világos, hogy a vizsgált sejtek milyen mértékben tartalmazzák az eltérést, ill., hogy az eltérés ténylegesen sejtenként, sőt, allélonként mennyire aktív. A humán genom projekt és az azzal párhuzamosan folyó technológiai fejlesztések eredményének köszönhetően daganattípusonként több ezer genetikai/genomikai vizsgálat adatai állnak rendelkezésre. A

jelentősebb adatbázisok (Cancer Genome Atlas, TCGA; International Cancer Genome Consortium, ICGC) elsősorban az egyes szövettani-klinikai típusok intertumorális heterogenitására fókuszálnak. Az ezek segítségével kialakult mutációs és génexpressziós szignatúrák rengeteget tettek hozzá az egyes tumortípusok jellemzéséhez, vagy az egyes biológiai altípusok azonosításához. Ugyanakkor az adatok az adott tumorra vonatkoznak általánosságban. Többnyire betegenként egyetlen minta egyben került feldolgozásra, így a tumoron belüli viszonyok, az egyes tumorrégiók eltérései, a progresszióval, terjedéssel, metasztázis képződéssel kapcsolatos jellemzők egyelőre lényegesen kevésbé ismertek. Ehhez hozzá tartozik, hogy az egyes genetikai eltérések néha kizárják egymást, máskor részben egymásra épülnek, sőt, a mutációk hatása a génkópia szám függvényében is más értelmet nyerhet.

Általánosságban a molekuláris vizsgálatok eredményei és még a molekulárisan célzott kezelésekre adott válasz különbözősége is azt támasztja alá, hogy egy adott daganat genetikailag és funkcionálisan is meglehetősen 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, ezért a kérdést ebben az összefüggésben, globálisan, mint a genomikai instabilitás problematikáját is érdemes megközelíteni.

1.2. Karcinogenezis és genomikus instabilitás

1.2.1. A DNS eltérések jellege

A genomikus instabilitás környezeti genotoxikus hatásnak (sugárzás, DNS-károsító reaktív vegyületek, vírusok) illetve az endogén DNS-replikáció, hibajavítás (repair) és kromoszomális funkciók hibáinak egyaránt köszönhetők. A hatás következtében a genom különböző pontjai különböző mértékben és szerveződési szinteken károsodhat. A rövid felsorolás jól szemlélteti a daganatokban kialakuló mutációk spektrumát (1. táblázat).

Mutáció típusa		***Kimutatás módja***
báziscsere (SNP)		PCR, DS
rövid inszerció/deléció		PCR, DS
szegmentális LOH		FISH, SB, PCR, DS
strukturális (CIN)	*szubkromoszomális kópiaszám eltérés*	kariotípus, CGH, FISH, WGA, PCR
	kiegyensúlyozatlan transzlokáció	
	kiegyensúlyozott transzlokáció	
kromoszóma aneuploidia		kariotípus, CGH, FISH, WGA, PCR

1. táblázat. A daganatokban kialakuló mutációk spektrumának osztályozása az eltérés méretének megfelelően és a kimutatás módszertani platformjának megadásával (PCR=polimeráz láncreakció, DS=direkt szekvenálás, FISH=fluoreszcens in situ hibridizáció, CGH=komparatív genomhibridizáció, WGA=teljes genom amplifikáció és szekvenálás)

1.2.2. Nukleotid-szekvencia szintű DNS eltérések

Egyszerű és izolált szekvencia eltérések egy, vagy néhány egymás utáni nukleotidot érinthetnek. Leggyakrabban egyetlen bázis kicserélődése (single nucleotide polymorphism=SNP), kereteltolódással járó rövid (néhány bázisos) inszerció, deléció (in/del), vagy valamelyest hosszabb szegmentumok elvesztése (loss of heterozygosity = LOH) következik be. Hatásukra a kódoló (és nem-kódoló) régiókban a szekvencia sorrend megváltozik, ami a kódolt géntermék expressziójára vagy funkciójára is hatással lesz. Többnyire a spontán, vagy mutagén hatásra (pl. UV-sugárzás) fellépő hibák kijavításának elmaradása révén maradnak fenn, de a sejt számára esetlegesen azonnali túlélési, növekedési előnnyel járhatnak. Ide sorolandók a mismatch-repair deficiencia (MMR) kapcsán kialakuló mikroszatellita mutációk, melyek pl. a vastagbélrákok 15%-ában felelősek a daganat kialakulásáért.

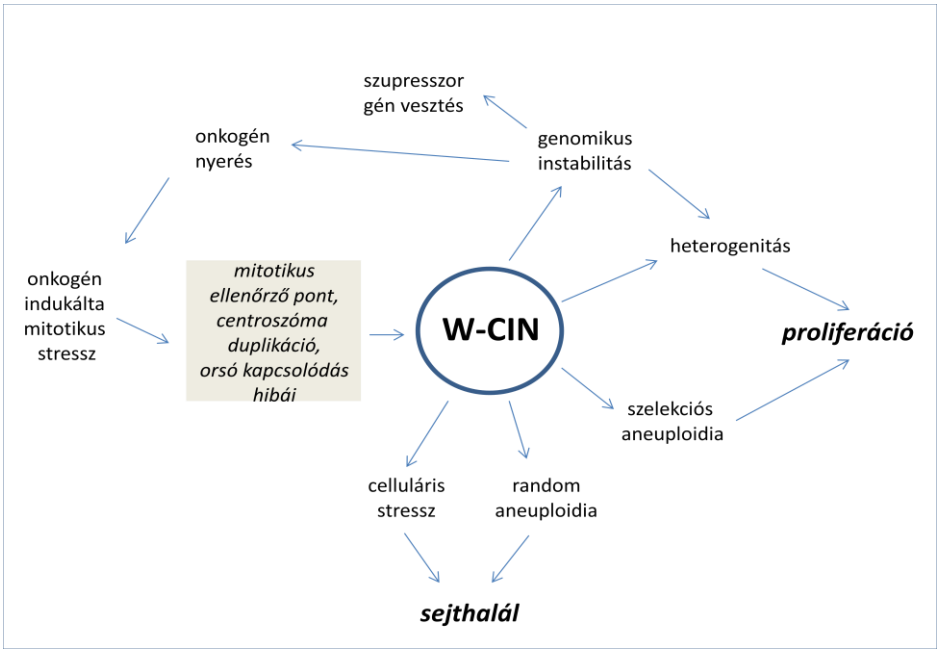
1.2.3. Kromoszomális instabilitás (chromosomal instability, CIN)

Valamennyi malignus daganattípusban gyakori a kromoszómák összetételének (strukturális CIN = sCIN) és kópiaszámának (numerikus CIN = nCIN) a megváltozása. A kromoszóma abnormitások végső soron a gének pozíciójára, aktivációjára és mennyiségére egyaránt hatással vannak, mely a tumoros genom átprogramozásához vezet. Az átprogramozás legalább 5 szinten történhet: (1) a regulatórikus szekvenciák áthelyeződésével a génexpresszió megváltozik; (2) a kópiaszám változása kapcsán a gének dózisa eltér; (3) szerkezeti változások révén aktiváció-inaktiváció jön létre (fúzió, in/del, stb); (4) a környező szekvencia megváltozásával a gének hozzáférhetősége módosul; (5) ezzel egyidejűleg a törésekre, vesztésre való hajlam is változik [9].

A több, vagy kevesebb kromoszómaszám a kromoszómák kialakulása (kondenzáció) és anafázisos elrendezése (szegregáció) körüli zavarra vezethető vissza [10;11]. A 2n genomikus DNS-tartalom tényleges eltérése mellett a vesztések, duplikációk révén egyes génlókuszokra a heterozigótaság elvesztése (LOH) jellemző, ami egyes tumor supresszor gének működése szempontjából döntő fontosságú.

A CIN kialakulása számos mechanizmussal, gyakorlatilag a mitózis folyamatának bármely pontjának elégtelen működése miatt bekövetkezhet. Így pl. a mitotikus orsó checkpointok szabályozási zavara, a centroszómák duplikációja, sokszorozódása, a testvérkromatidák kohéziójának elvesztése, az elégtelen kinetochora-mikrotubulus kapcsolódás egyaránt aránytalan osztódásokhoz vezet [12].

Nehéz ugyanakkor élesen elválasztani a számbeli és a szerkezeti kromoszómaaberrációkat, mert előfordulásuk többnyire egyidejű és a keletkezés mechanizmusában is számos átfedés található. Mára nomenklatúrai problémát is jelent a CIN, a kromoszomális átrendeződés (GCR, lásd alább) és az aneuploidia fogalmának elkülönítése. A kérdést jól szemlélteti a daganatos sejtben bekövetkező adaptív elváltozások egymásra épülését bemutató séma komplexitása (2. ábra).



2. ábra: A kromoszomális instabilitással összefüggésben jelentkező, a genom egészére kiható, részben ciklikus mechanizmusok sémás ábrázolása (W-CIN=whole genome chromosomal instability, módosítva Roschke AZ. és Rozenblum E. után).

1.2.4. Szerkezeti eltérések, „durva" kromoszómahibák (GCR - gross chromosomal rearrangements)

Az egész kromoszómák nyerése-elvesztése mellett kromoszómákon belüli durva átrendeződések, törések (GCR) is megjelennek a carcinogenezis ill. progresszió során (transzlokációk, inverziók, deléciók, amplifikációk, stb.). A legelső és leghíresebb strukturális eltérés a már említett Philadelphia-kromoszóma, melyet már 1960-ban, fénymikroszkópos körülmények között azonosítottak krónikus mieloid leukémiában (CML) [13]. A lókusz amplifikációk közül igen fontos klinikai szerepe lett pl. a HER-2/neu gén kópiaszám változásának emlő- és gyomorkarcinómában, mivel a receptor gátló terápia ezekben az amplifikált esetekben bizonyul hatékonynak.

A GCR az aktuális szemlélet szerint a kijavítatlan kettősláncú-DNS törések (double-stranded breaks - DSB) eredményeként jön létre. A töréseket okozhatja külső hatás (ionizáló sugárzás, genotoxikus hatás), azonban többségükben a DNS-replikáció vagy rekombináció hibáiból származnak. A DNS-rekombináció alapvetően fiziológiás jelenség, szükséges pl. az adaptív immunrendszer (B- és T-limfociták) alkalmazkodó képességének fenntartásához [14], de így van biztosítva a kellő fokú diverzitás az ivarsejtek esetében is. A DSB a genom integritása szempontjából igen kritikus, mivel minden esetben potenciális DNS-vesztéssel is jár, ezért ellene különféle hatékonyságú mechanizmusok védenek. A törvégek gyors egyesítésére nemhomológ-végegyesítés (non-homologous end joining - NHEJ) és homológ rekombináció (HR) egyaránt alkalmas, igaz, a mechanizmus sikere a sejtciklus fázisától is függ [15]. A DSB-k leghatékonyabb, lényegében hibamentes kijavítására a HR alkalmas, ez azonban a testvérkromatida meglétét feltételezi, amire leginkább csak S- és G2-fázisban van mód. Az alternatív, de kevésbé precíz NHEJ javítómechanizmus kisebb deléciók, inszerciók, duplikációk bennmaradásával jár [16;17]. A hibajavítást mindkét esetben zavarhatja a nagy kópiaszámú repetitív szekvenciák (pl. Alu) közelsége, melyek eleve valószínűsítik az illegitim rekombinációt és így a strukturális kromoszómahibák létrejöttét.

A GCR kialakulásának egyik további fontos mechnizmusa a DNS-szintézishez köthető [18]. Egyes onkogének (pl. a CMYC) igen intezív sejtproliferációt és ezzel együtt DNS-szintézist indukálnak. Mindez az S-fázis checkpoint zavarát és replikációs stress-t eredményez, ami pl. a DNS-replikációs villa erőltetett előrehaladása és a nukleotidok lokális kínálata, depléciója közötti aránytalanságba torkollik és törékeny pontok (DSB-k) kialakulásának kedvez [19].

A GCR a replikációtól függetlenül, a McKlintock által leírt klasszikus törés-fúzió sorozatok [20] eredményeképpen is jelentkezhet. A kromoszómavégek (telomérák) progresszív rövidülése a kettősláncú DNS törésével ekvivalens módon NHEJ mechanizmussal javítódik

ki. Ennek kapcsán a telomeráknál fúzionált óriási kromoszómák képződhetnek, melyek ráadásul dicentrikusak. A mitotikus anafázisban az ebből származó térbeli feszülés csak újabb törés bekövetkezte révén küszöbölhető ki, amely később a szabad végek egyesülésével újabb kromoszómafúziókhoz vezet. A ciklikusan lezajló törések és fúziók nem-kiegyenlített transzlokációk sorát, a genom fokozatos átépülését eredményezik [21].

1.2.5. Chromoanagenesis

A hagyományos felfogás szerint a strukturális (sCIN) és numerikus (nCIN) kromoszóma eltérések a leggyakrabban ugyan együtt fordulnak elő, de kialakulásuk ideje és a patomechanizmus is különbözik [22]. A malignus tumorokból teljes genom szekvenálással nyert adatok azonban újabban arra világítanak rá, hogy a nCIN és az sCIN között eddig ismeretlen mechanikus kapcsolat létezik. A szerkezeti kromoszóma eltérések hátterében ugyanis genomszekvenálással számos igen komplex szekvencia eltérés igazolható, amelyekhez lokálisan további jelentős kópiaszám változás is tartozik. A kromoszómák teljeskörű átépülésének jelenségét *kromoanaszintézis*nek, újabban *kromoanagenezis*nek nevezték el [23].

Hosszú ideig a kromoszóma eltéréseket kizárólag kariotipizálással lehetett megközelíteni. Az elmúlt 10 évben megjelent néhány kulcsfontosságú módszer lehetővé tette a genom „durva” szerkezeti eltéréseinek egyidejű vizsgálatát. A comparatív genomhibridizáció (CGH) és annak array rendszerű változata (aCGH) elsősorban a genom relatív mennyiségi eltéréseit tudja kimutatni egy sejtpopuláció szintjén és a kromoszómák, kromoszómalókuszok nyerését/vesztését mutatja [24;25]. A spektrális karyotipizálás (SKY) módszere a normálistól eltérő kromoszómaszerkezet precíz azonosítását teszi lehetővé [26;27;28]. Mindkét módszer a daganatokban előforduló genetikai eltérések összetettségére hívja fel a figyelmet. Egy korai munkában kimutatták, hogy sejttenyészetből származó szolid daganatsejtekben átlagosan 16 kromoszómaszerkezeti eltérés van jelen [29], de a genom részletes szekvenálásával a tényleges mutációk száma ennek legalább a 10-szerese [30;31]. Egyes tumorokban klaszterek formájában DSB eredetű kromoszomális aberrációk százai azonosíthatók [32]. Az ilyen nagyszámú genetikai eltérés nyilvánvalóan a sejt homeosztázisának gyökeres átalakulását eredményezi. A frekvencia és eloszlás alapján a sok eltérés közös eredetre, egyidőben bekövetkező mechnizmusra vezethető vissza. A jelenséget ezért újabban a „*chromothripsis*” névvel illetik (darabokra hullás, görög).

Az átépülés során a kép gyakran teljesen új felépítésű kromoszómákat mutat, melyek izolált formában bekövetkező sokszoros fragmentáció és újrarendeződés révén jöhettek létre

[33]. A meghatározott kromoszómákat érintő masszív elváltozásról (chromothripsis) feltételezik, hogy egyszeri esemény és a kromoszóma hibás szegregációjával hozzák összefüggésbe, mely mikronukleusz képződésével jár [34]. Ha a mikronukleusz állapotában a soron következő S-fázisban a DNS-replikáció lezajlik, a kromoszóma sok darabra törik és random szegregációt követően a következő interfázisban a képződött izolált DNS szakaszokból újraépül. A mikronukleusz képződés szolid tumorokban gyakori és elsősorban az anafázisról lemaradó kromoszómák alkotják, amelyek így függetlenedve nem tudnak az újonnan kialakuló sejtmagba belekerülni. A lemaradás egyik gyakori oka a centroszóma diszfunkció miatt jelentkező multipolaritás lehet.

A *chromothripsis* eredménye paradox eltérés, a genomban elsősorban kiegyensúlyozalan többlet (plusz kromoszómák, kromoszóma szegmentumok) alakul ki, ugyanakkor egyenként kismértékű, de összmennyiségében mégis jelentős genetikai veszteség (homozigóta deléciók) is jelentkezik. A mechanizmus konkrét szerepét emlő- és vastagbélkarcinómák genetikai eltéréseinél is igazolták és jelenleg is intenzíven kutatják [35;36].

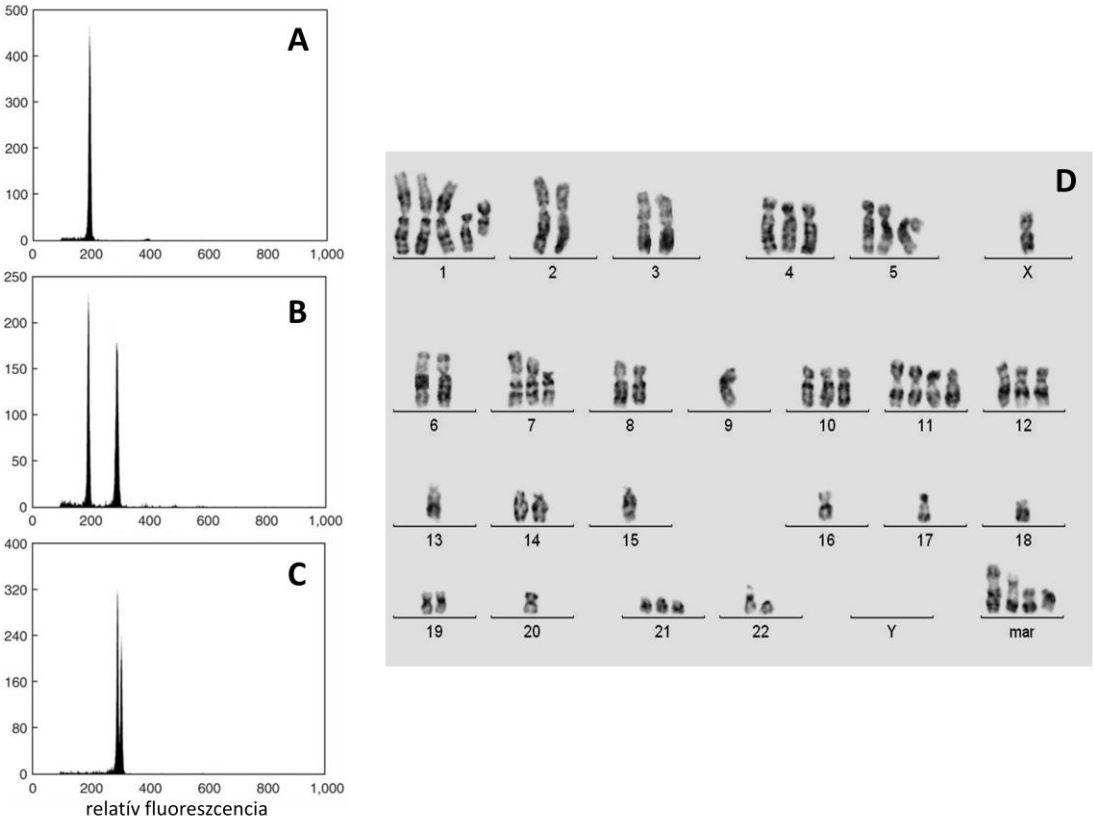
A viszonylag újnak nevezhető fogalom a *„chromoplexia”*, amely szerteágazó numerikus és strukturális eltérések genomszintű megjelenését jelenti, mely inter – és intrakromoszomális átrendeződések láncolata. A chromoplexia jelenségét először prosztatarák genomszekvencia vizsgálata során észlelték [37]. A láncreakcióban létrejövő aberrációk száma akár a negyvenet is elérte egyes esetekben, melyek azonban több (akár 6) kromoszómára terjedtek szét. A megvizsgált daganatok 60%-ában ráadásul több egymásutáni láncreakció-szerű átrendeződés jelei is kimutathatók voltak. A biostatisztikai számítások alapján az átrendeződéseknek viszonylag szűk időtartamon belül és egymásra épülve kellett bekövetkezniük. Mindezek alapján a tumorprogresszió lassú, többlépcsős alakulásáról alkotott elképzelést alaposan át kell értelmezni [38]. Az időszakos kromoszómakárosodások a legújabb feltételezések szerint közvetlenül kapcsolhatók aktuális stresszszituációkhoz, pl. hipoxiához [39;40].

Az egyes génlókuszokat, régiókat, kromoszómákat érő hatások mellett az egész genom szerveződését érintő szabályozási defektusok is jelentős szerepet játszanak, melyek masszív mennyiségi DNS eltérésekhez, aneuploidiához vezetnek.

1.3. Az aneuploidia és a kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok

1.3.1. Az aneuploidia jelensége

A normálistól eltérő kromoszómaszám és szerkezeti összetétel következtében megváltozó nukleáris DNS-mennyiséget *aneuploidiá*nak nevezik. A DNS mennyiségi eltéréseket hagyományosan kariotipizálással, DNS citometriával és molekuláris módszerekkel lehet kimutatni. Megkülönböztetünk hipodiploid (a normálisnál kevesebb DNS) és hiperdiploid (több DNS) aneuploidiát. A DNS arányos megtöbbszöröződése a poliploidizáció, mely – mint látni fogjuk – fiziológiásan és egyes adaptív, nem neoplasztikus folyamatokban is létrejöhet. Az abnormális kromoszóma összetétel volt a daganatos sejtek első nyilvánvalóan felismerhető biológiai/morfológiai jellegzetessége, amit Leo Hansemann már 1890-ben gyönyörű rajzsorozat formájában is megörökített. Ezeken az ábrákon rákos szövetekben észlelt aszimmetrikus és multipoláris sejtosztódások láthatóak, melyekről a szerző is kifejti, hogy eredményeképpen abnormális kromatintartalmú sejtek képződnek [41;42]. A megfigyelést T. Boveri is magáévá teszi a ráksejtek korai jellemzése kapcsán, T. Caspersson pedig méréseivel is igazolta, hogy a daganatsejtek a normálissal ellentétben jelentősen különböző és gyakran nem is állandó mennyiségű nukleáris DNS-sel rendelkeznek. A későbbiek folyamán fokozatosan vált csak világossá, hogy a mennyiségi eltérések mellett a strukturális kromoszómahibák milyen rendkívül széles spektruma lehet jelen (3. ábra). A daganatgenetika korai időszakában a DNS-tartalom vizsgálat, a DNS-index citometriai módszerekkel történő meghatározása a technikailag jóval bonyolultabb kromoszómavizsgálat hatékony kiegészítőjeként, a genom instabilitás kimutatásának reális alternatívájaként indult, az azonban hamar kiderült, hogy a tumorspecifikus eltérések terén sokkal mélyrehatóbb információkra van szükség. Az 1990-es évektől folyamatosan gondozott Mitelman adatbázisban összesített több mint 62.000 tumoros kariotípus a durva kromoszómahibák változatosságát kiválóan dokumentálja [43] (http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman)

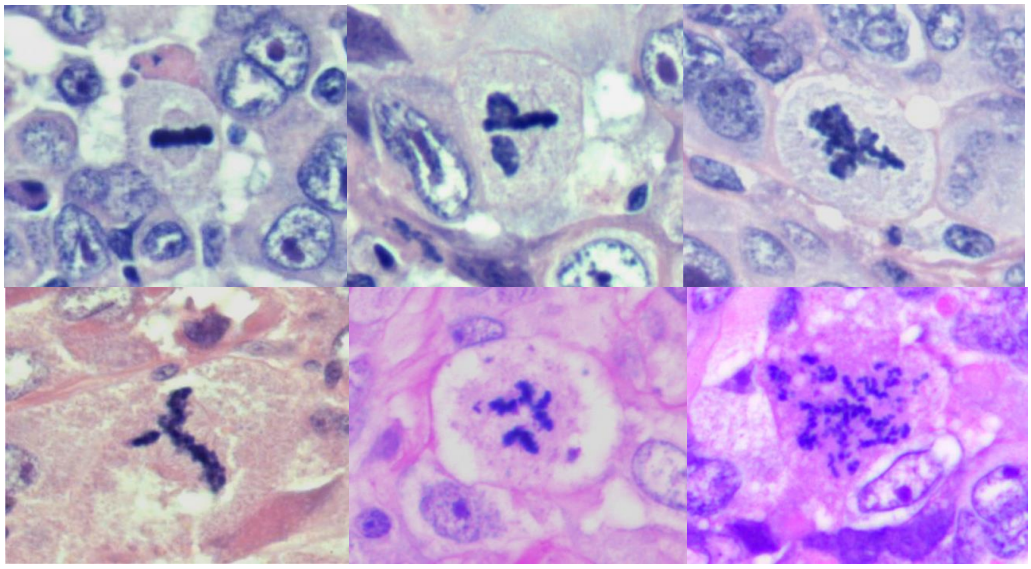


3. ábra. Az aneuploid sejteket jellemző DNS eltérések kimutatása az össz-DNS mérésén alapuló áramlás citometria is alkalmas. Az 1990-es évek közepén Partec készülékkel (Görlitz, Németország) agresszív limfómákban végzett vizsgálataink reprezentatív eredményei (saját anyag). A: normoploid, B: triploid, C: near-diploid aneuploid sejtpopulációk. A mennyiségi eltérések hátterében egész kromoszómák vagy egyes kromoszóma régiók kópiaszám eltérése a kariotípus szintjén jól látható (D: triploid tendenciát mutató komplex kariotípus, leginkább a B görbének megfelelő mennyiségi eltérésekkel)

Újabban az aneuploidia két formáját különböztetjük meg a daganatokban: stabil és dinamikusan 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. Instabil esetben viszont az eltéréseknek csak kis része egyezik meg és folyamatos jelleggel jelentős mértékű nyerések/vesztések keletkeznek változatos formában. Az instabilitás a kromatin állandósult szegregációs zavara és töréseinek eredménye és magának a mechanizmusnak a fixált jellegére utal. Az instabil aneuploidiát nevezhetjük végső soron kromoszomális instabilitásnak (CIN) és sokkal gyakoribb a szolid tumorokban (carcinomák, szarkómák), mint leukémiákban.

A sejtciklus szabályozás lényege, hogy a DNS megkettőződése és a sejt osztódásának fázisai megfelelően legyenek összehangolva, valamint a hibák legyenek kijavítva az utódsejtek integritásának biztosítása céljából. Ennek a ciklikus folyamatnak fontos része a mitózis

időzítése, ezen belül a kromoszómák kialakulása és kondenzációja, valamint a kromoszómák mozgatását (citokinezis) alapvetően befolyásoló centroszómák replikációja és működése. Az aneuploidia okai között a gyakori centroszóma diszfunkció mellett az osztódás szabályozásának elemei (kinetochore-mikrotubulus kapcsolódás, orsó-ellenőzőpont, kromoszóma kondenzáció/kohézió, citokinezis) játszhatnak fő szerepet. A hibák morfológiai szinten aberráns mitotikus alakok megjelenését eredményezik (4. ábra).

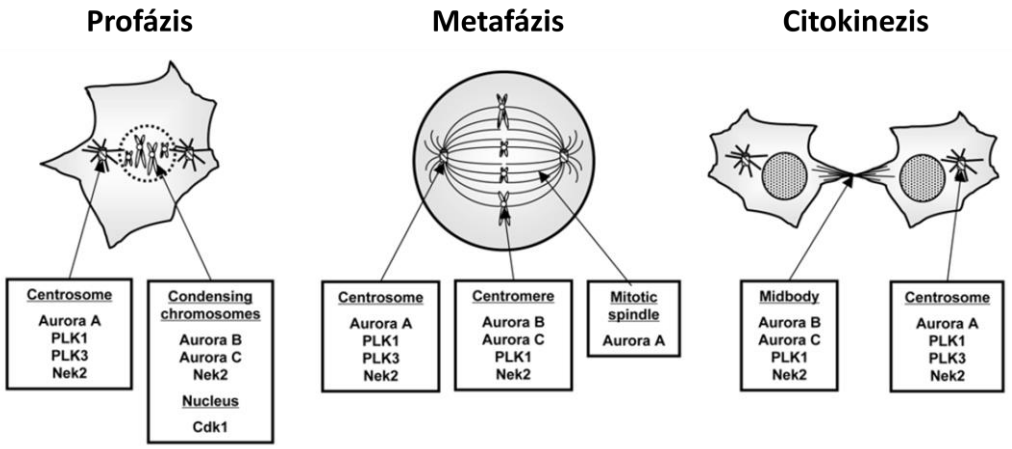


4. ábra. Aberráns sejtosztódások morfológiai jellegzetességei rosszindulatú, magas grádusú (anaplasztikus) daganatok szövettani preparátumaiban (tripoláris, multipoláris osztódás, fragmentáció, pulverizáció). A normális sejtosztódás szokványos morfológiája (metafázis síkba rendezett kromoszómákkal) balra fent látható (HE festés, 100x eredeti nagyítás)

1.3.2. Mitotikus kinázok és sejtosztódási defektusok

A sejtosztódás korai szakában, a genom kromoszómákba való elrendeződése után a mitotikus orsóhoz való kötődés feltételeinek is teljesülni kell. Ez a sejtmag és a kromatin igen komplex átalakulását jelenti, ami szigorú szabályozást feltételez [44]. 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. Ezek a komplexek a profázisban elsődlegesen a kromatidák kialakításában játszanak szerepet, de később a kinetochora kapcsolódás és a microtubulusok dinamikus

változásában (polimerizáció/depolimerizáció), az orsó elongáció, a kromatida kohézió folyamataiban is jelentős a hatásuk (5. ábra).A CPC organizációja és az egész sejtosztódás fő effektorai a mitotikus kinázok.

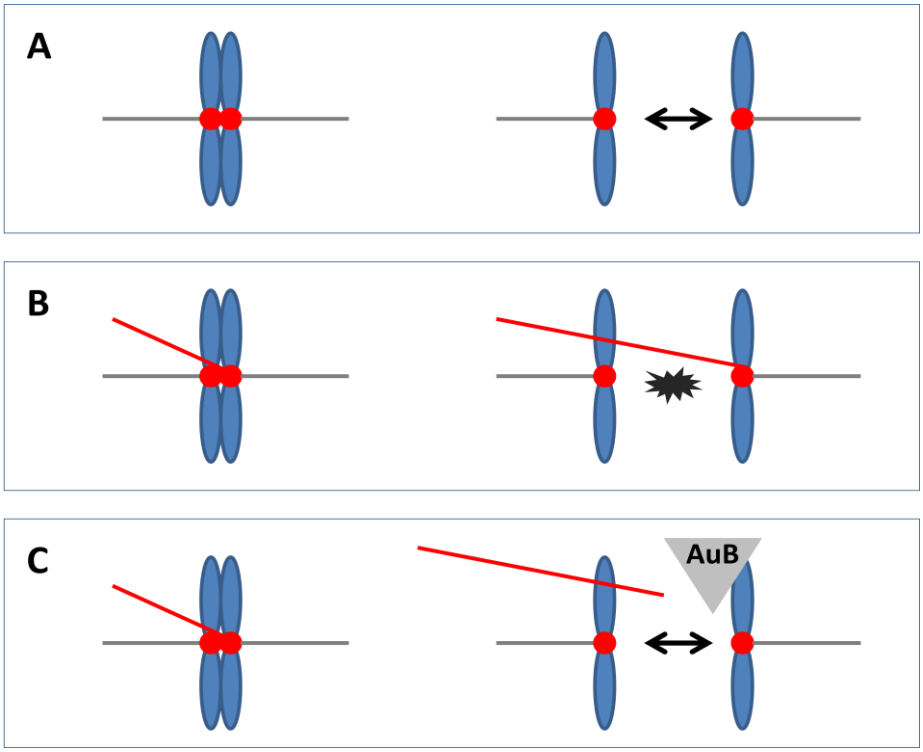


5. ábra. A mitotikus kinázok megjelenése és munkamegosztása a sejtosztódás különböző fázisaiban. A ciklin B1 hatására a sejtmagban aktiválódó Cdk1-gyel párhuzamosan beindul a G2 fázis végére felhalmozódó kinázok aktivitása. A kináz hatás ellensúlyozására a telofázisban fokozott ATPáz aktivitás jelentkezik (C. Lindon, Cambridge, UK sémás ábrája alapján)

Az Aurora foszfokináz család A, B és C tagból áll és evolúciós szempontból konzervált módon intranukleáris peptidláncok szerin/treonin foszforilációjáért felelősek. Az Aurora A és B szerkezete és szekvenciája igen hasonló és a katalitikus domén is mintegy 70%-ban egyezik [45;46]. Mindennek ellenére a két rokon kináz különböző saját szubsztrátokat foszforilál, az átfedés csekély (pl. Kif2, MCAK szubsztrátok) és időben ez is elkülönül. Az AuA kináz általánosan „pólus-kináz” néven is ismert, mivel a centroszóma ciklus szabályozásában jelentős a szerepe. Ebből kifolyólag megjelenése a sejtben citoplazmikus (mitotikus orsó, centroszóma).

Ezzel szemben az Aurora B a CPC egyik prominens tagja, lényegében az enzimatikus effektor szerepét tölti be. A kromatin kondenzáció fő ingere a nukleoszomális 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 expresszójuk fokozatosan emelkedik. Míg az INCENP és a borealin a kináz aktivációját fokozza, a survivin-nak a CPC centromerikus lokalizációjában van döntő szerepe. A kötődéssel párhuzamosan a H3 foszforiláció is fokozódik, ami a kromatin lokális kondenzációjához vezet [47]. A kondenzáció a pericentromerikus régiókból telomerikus

irányba terjed, ami jól beleilleszthető abba a nézetbe, miszerint a kromoszómát, mint funkcionális egységet valójában a centroméra definiálja. A CPC a metafázisig a centromérához asszociált, majd áttevődik az orsó középzónájába és onnan a citokinezissel az újonnan képződő sejt középpontjába (midbody) [48]. Az Aurora B ebből következően a CPC részeként a bipoláris orsó stabilitásáért is felelős. A foszforiláció révén részt vesz a mitotikus orsó kialakításában is, legalább két ponton ismert a hatása (mikrotubulus stabilizálás – stathmin; mikrotubulus depolimeráz gátlás – MCAK) [49]. Ugyanakkor jelentős a hatása a kromoszómák orientációjában, mozgatásában is a mikrotubulus-kinetochora kapcsolat folyamatos alakításával (oldás-kötés) [50]. Az igen szemléletes felfogás szerint ebben a fázisban az AuroraB egyik fő feladata a téves kötődések következtében létrejövő feszülési és mozgatási hibák elkerülése, azaz a centromérák kiszabadítása a „veszélyes zónából". Az orsó feszülés ugyanis az anafázis iniciációjának a legfontosabb ingere (spindle assembly checkpoint, SAC) és ennek korai bekövetkezte az osztódási hibák egyik jelentős forrása (6. ábra).



6. ábra: A normális (A) és a hibás (B) orsó kapcsolódása a kromatidához, utóbbi a citokinezis súlyos zavarához és kromoszómális aberrációhoz (számbeli eltéréshez) vezet. A CPC effektoraként működő AuB kináz hatására (C) a hibás kötődés felszabadul és a kromoszóma mozgatás iránya helyreáll (Schmidt TL, 2007 után)

Az Aurora A és B esetében jelentős expressziós eltérések ismertek, míg az Aurora C előfordulása és szerepe a daganatképződésben kevéssé világos. Az ***Aurora A*** overexpresszióját eleinte poliploid sejtekben észlelték és összefüggést mutatott a p53 fehérjeaktivitás hiányával [51;52]. Az Aurora A expresszió deregulációja a kísérletes körülmények között lelassult mitózist eredményez, a sejtosztódást kromoszóma összerendeződési zavar, hibás centroszóma szeparáció, multipoláris orsók kialakulása és a citokinezis defektusai jellemzik.

A fokozott expresszió hátterében malignus daganatokban az AURKA gén (20q13 kromoszóma lókusz) amplifikációja állt, melyet emlőrákban kiterjedten tanulmányoztak, az AURKA lókusz amplifikáció és az ezzel párhuzamosan jelentkező Aurora A fehérjeexpresszió kifejezetten rossz prognózissal járt. [53;54]. A génamplifikációt vastagbél [55;56], hólyag [57], petefészek [58] és hasnyálmirigy rákban [59] is igazolták, minden esetben Aurora A kináz expressziójával volt összefüggésbe hozható. Bár a kináz expresszió és a sejtciklus adatok nem kerültek közvetlen összehasonlításra, a genetikai háttér a hatást egyértelműen magyarázhatná. Nem minden esetben volt azonban kimutatható kapcsolat a kináz expresszió és a folyamat biológiai jellegzetességei között. mRNS szinten magasabb expressziót tapasztaltak pl. myelodysplasiás szindróma (MDS) különböző csoportjaiban, ez azonban nem függött össze a klinikai rizikóbesorolással (IPSS score), a csontvelői blasztok arányával, de az MDS-re jellemző genetikai eltérésekkel, vagy a genetikai instabilitással sem [60;61].

Az ***Aurora B*** expressziója és genetikai háttere ezidáig kevesebb figyelmet kapott. Az expresszió hiánya kromoszóma instabilitást és aneuploidiát okozott, a kináz gátlása jelentős poliploidiát és sejthalált eredményez [62;63;64]. Ezzel szemben a többször is leírt overexpresszió hátterében gén amplifikációt vagy specifikus mutációt kimutatni nem tudtak. A funkcióvesztéshez hasonlóan az overexpresszált esetekben többmagvú sejtek, aneuszómia képződött, különösen a p53 funkció társult csökkenése esetén. Érdekes, hogy az AURKB gén a 17-es kromoszóma rövid karján ugyanabban a gyakran érintett lókuszban helyezkedik el, ahol a TP53 is (17p13.1 kromoszómalókusz). Mindez a kromoszóma szegregációs zavar és a p53 defektus (genetikai) kapcsolatára is utalhat.

A Ser10 foszforiláció a G2 fázisban a heterochromatin protein 1a (HP1a) disszociációját eredményezi a H3-tól, így megnyitva az utat a kromatin reorganizációja előtt a mitózisba lépéshez. A helyzet megfordul a sejtosztódás befejeztével, amikoris az Aurora B disszociál a kromoszómákról és a Ser10 ill. Ser28 foszforiláció fokozatosan elvész. Ezzel párhuzamosan a chromatin dekondenzálódik és az interfázisra jellemző állapot visszatér.

Fokozott Aurora B expressziót számos daganat esetében közöltek [65;66;67;68;69;70], egyértelműen csökkent expresszióról ugyanakkor nincs információnk. Az AuB esetében génamplifikációt kimutatni nem tudtak, az overexpressziót egyértelműen magyarázó biológiai okot egyelőre nem írtak le. Érdekes kérdés, hogy az Aurora B ciklikus megjelenése a G2 fázisban mennyire függ az egyebekben intenzíven zajló sejtproliferációtól agresszív daganatokban. A fokozott Aurora B expresszió a szakirodalom alapján rossz prognózissal jár, ami azonban általánosan igaz a magas sejtproliferációval rendelkező tumorokra is. Az ez irányban végzett vizsgálatainkról e dolgozat későbbi fejezetében fogunk beszámolni.

1.3.3. Egyéb mitotikus kinázok – Plk, Nek

A polo-like-kináz (Plk) család négy tagból (Plk1-4) áll, melyek konzervált C- és N-terminusból, valamint 30 aminosavból álló jellegzetes polo-boksz-okból épülnek fel, utóbbiak határozzák meg a mitotikus struktúrákhoz való kötődésüket és a szubsztrát specificitást [71]. Funkciójuk szerteágazó és a kromoszóma kondenzáció/szegregáció, az orsó kialakulás, a centroszóma érés szintjén is leírták a hatást. A Plk1 overexpressziója kísérletes rendszerben onkogén hatást eredményezett [72], az aktivitás aberráns centroszómához, mitotikus orsóhoz és aneuploidiához vezet [73]. A Nek-kináz család 11 tagból áll és elsősorban a G2/M fázis átmenetben és a centroszóma érés során tulajdonítanak nekik jelentőséget. Érdemi ismeretek a Nek2 és a Nek8 kinázról állnak rendelkezésre. A Nek2 overexpresszió korai centroszóma hasadást, ezzel kapcsolatban kóros kromoszóma szegregációt okoz [74;75]. A Nek2 ill. 8 overexpresszióját ezidáig emlőrákban észlelték [76].

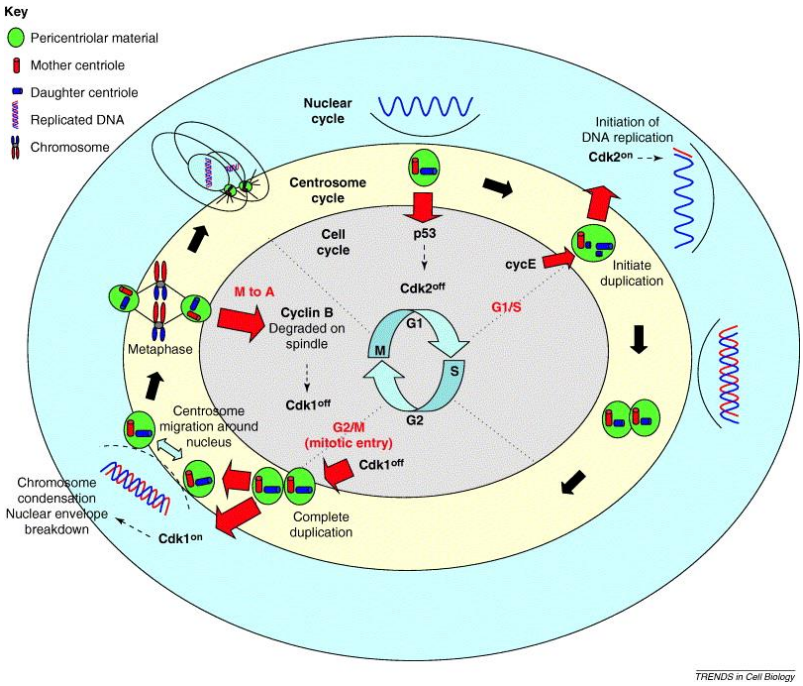
1.3.4. A mitotikus kinázok klinikai jelentősége

A mitotikus kinázok overexpressziója a szolid és hematológiai malignitásokban egyaránt gyakori, az irodalom elsősorban az Aurora A és B szerepével foglalkozik. Az overexpresszió hátterében egyaránt lehet genetikai (génaplifikáció) vagy szabályozási ok, és jelentősége lehet a lebontási útvonalak károsodásának is. Általánosságban elfogadott, hogy a kromatin ill. centroszóma fehérjék hiperfoszforilációja szükséges alapfeltétel a neoplasztikus transzformáció során, azonban önmagában nem elégséges a progresszióhoz. A mitotikus kinázok expressziójának egyensúlya érzékenyen szabályozott és minden kisiklás a CIN és ploidia változása irányában hat. A mitotikus kinázok szerepének fokozatos megértésével és

a gyakori overexpresszió igazolásával előtérbe kerül a szelektív kináz gátlókkal esetlegesen elérhető terápiás hatás lehetősége [77]. Az Aurora kináz gátlók klinikai alkalmazásánál előnyt jelenthet, hogy ezek a nyugvó, vagy lassan proliferáló ép sejtekre kevés hatással vannak. A korlátozottan szelektív VX-680 (Vertex/Merck) nevű kísérleti ATP-kötő hely inhibitor ígéretes eredményeit követően [78] számos hatóanyaggal végeztek kísérleteket, sőt, klinikai 1-2 fázisú kipróbálást és az eredmények egyre bíztatóbbak [79;80].

1.3.5. Centroszóma diszfunkció és aneuploidia

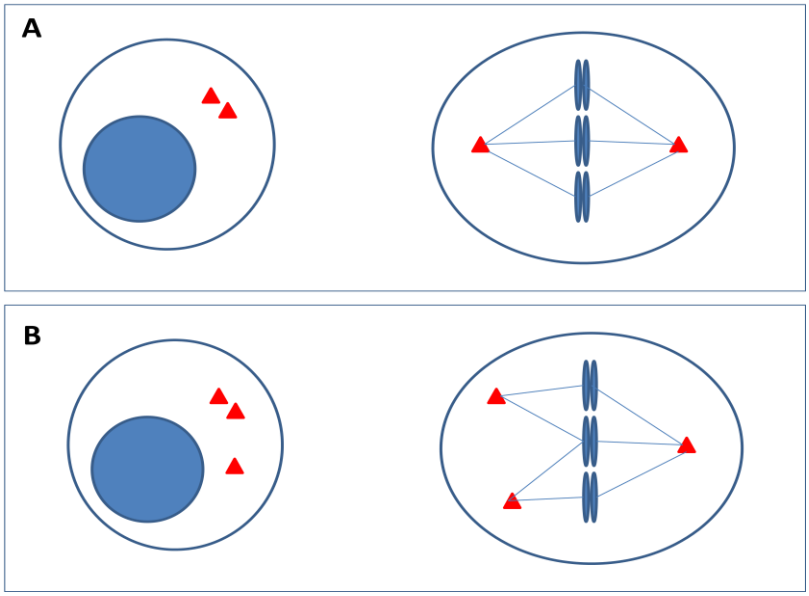
A centroszóma szeparáció a sejtosztódás profázisában, ill. a transzlokációja a prometafázisban központi jelentőségű és alapvető a kromoszómák mozgatása, annak időzítése szempontjából (7. ábra). A centroszómákat Boveri hozta elsőként összefüggésbe a kromoszóma instabilitással karcinogenezis kapcsán. Azt is feltételezte, hogy a centroszóma abnormitások összessége meghatározó, de az igazán jelentős malfunkció nem lehet túlságosan kedvező a transzformált sejt túlélése szempontjából [81].



7**. ábra**. A centroszóma ciklus alakulása a normális sejtciklus előrehaladtával (*forrás: Trends in Cell Biology*). A centroszóma duplikáció a G2/M átmenet idejére befejeződik, ezzel párhuzamosan indul a kromoszómák kondenzációja és a bipoláris osztódási struktúra kialakulása.

Centroszóma aberrációk, amplifikációk a legtöbb daganatban előfordulnak, csupán a krónikus leukémiák és indolens limfómák számítanak talán kivételnek [82]. A centroszóma

amplifikáció és a CIN jelensége találkozik egyes in situ carcinomákban is, ami a mechanizmus korai, primer jellegére enged következtetni. Az amplifikáció egyértelműen összefüggést mutatott a p53 indukált CIN-nel [83] és kizárólag aneuploid daganatokkal kapcsolatban volt kimutatható colorectális rákokban [84]. Ugyanakkor a centroszóma defektusok meglehetősen heterogén formában vannak jelen daganatonként, ami nehezíti azok keletkezési módjának pontos megismerését. A feltételezések szerint a primer funkcionális defektusok mellett ugyanis normális centroszómák felhalmozódása másodlagosan is előfordulhat, például sejtosztódási zavarok eredményeképpen [85;86]. Normális viszonyok esetén az egy centroszóma/ diploid kromoszómagarnitúra arány jellemző. Ennek eltérése esetén fennáll a lehetőség multipoláris mitózisok kialakulására. Az aneuploidia szempontjából fontosabb abnormitások közé a centroszómák számának felszaporodása tűnik a legfontosabbnak, amely tehát létrejöhet (1) *de novo;* (2) meglévő centroszómák amplifikációjával; ill. (3) felhalmozódás útján poliploidizáció, sejtosztódási zavar esetén.



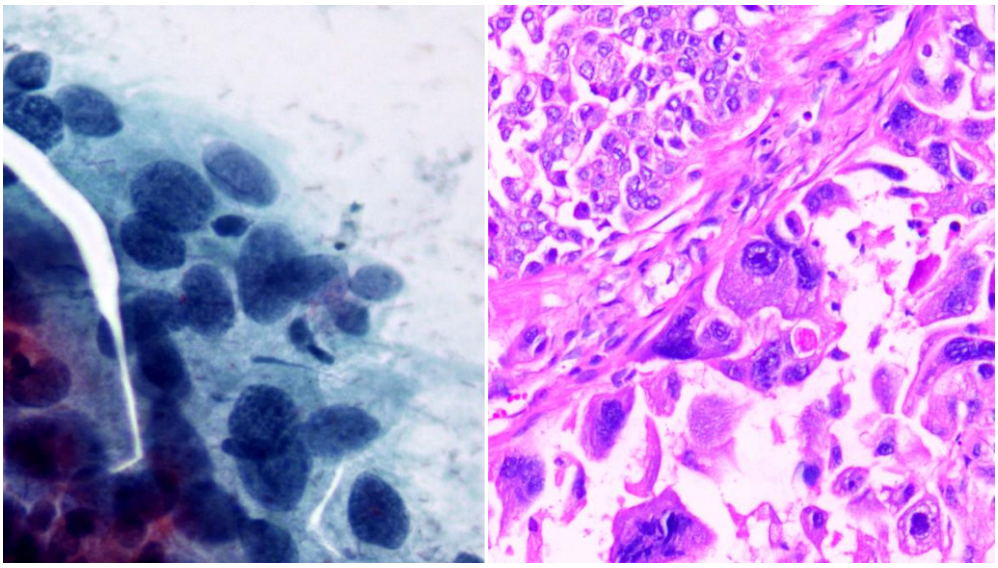
8. ábra. A centroszómák jelentőségének sémás bemutatása normális interfázis és bipoláris sejtosztódás során (A) valamint több centroszóma kialakulása (multiplikáció) esetén (B). A centroszómák számának növekedése a mitózisban a bipoláris elrendeződés felborulásával jár, ami aneuszómiához (több, vagy kevesebb kromoszóma), mikronukleusz képződéshez vagy a sejt pusztulásához vezet. A centroszómák piros háromszög formájában vannak feltüntetve.

A centroszómák számának növekedése mellett azonban funkcionális eltérések is megjelenhetnek, pl. a centriolumok komplexképzési eltérése, acentrioláris centroszómák

formájában [87;88]. Figyelmet érdemel, hogy a humán papillomavírus E6 és E7 fehérjéi a centroszóma duplikáció folyamatát zavarják és ez által mitotikus hibákat indukálnak [89].
A kiváltó okotól függetlenül, ha kettőnél több centroszóma van jelen a sejtciklus G2 fázisában, mindenképpen fennáll a lehetősége annak, hogy az elkövetkező mitózis során multipoláris orsó képződjön, ami a kromoszómák téves szegregációjához (missegregation) vezet (8. ábra). Amennyiben a sejt képes a hibák ellenére a mitotikus orsó ellenőrző pontján (mitotic spindle assembly checkpoint) túljutni és az osztódást befejezni, aneuszómia, aneuploidia fog kialakulni [90]. A mitotikus ellenőrzési pont ugyanakkor nem tűnik direkt formában szabályozni a sejt polaritását, mert annak a kinetochora kötődés és a kialakuló feszülés a fő ingere, ami a multipolaritásból adódóan nem megfelelő, vagy teljesen el is maradhat az extra pólus kialakulásával. Ennek ellentéte a közvetlen intramitotikus okokból kiinduló sejthalál aktiváció (mitotikus katasztrófa), ami a hibák továbbadásának a kivédésére irányul [91;92]. Kísérletesen ugyanakkor az is bizonyítást nyert, hogy a multipoláris mitózisban a metafázis késleltetése lehetőséget ad az extra orsó pólusnak a betagozódásra, azaz „összeolvadással" a normális bipoláris szerkezet visszaállhat és egy orsóhoz centroszómák egész klasztere tartozhat [93]. Ezzel magyarázható, hogy jelentősen emelkedett centroszóma szám mellett is a multipoláris osztódások mennyisége viszonylag ritka [94]. A metafázis idejének rövidülésével azonban a klaszterképződés lehetősége csökken.
A multipoláris sejtek bizonyos esetekben csak az anafázisig jutnak, és nem fejezik be a mitózist. Amennyiben itt a sejtpusztulást sikerül kikerülni, többmagvú tumoros óriássejtek képződnek. A daganatos óriássejtek a nagy malignitású tumorokra jellemzőek, de ezek a sejtek többnyire korlátozott proliferációs kapacitással rendelkeznek.

1.3.6. Poliploid és aneuploid óriássejtek képződése

Az onkopatológiai gyakorlatban rengeteg példával találkozhatunk, amikor tumoros óriássejtek kialakulására kerül sor és a legtöbb magas grádusú, differenciálatlan szövettani entitás is megnagyobbodott sejtmaggal, felszaporodott kromatinállománnyal rendelkező sejtekből áll. 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 egy kifejezetten malignus fenotípust képviselnek. Jelenlétükkel párhuzamosan a mikroszkópos vizsgálatok során gyakran észlelhetőek aberráns mitózisok, ami a malignitás egyik igen markáns citológiai/szöveti jele.



9**. ábra.** Daganatos óriássejtek citológiai és szövettani preparátumban. A jelentősen megnagyobbodott és súlyosan atípusos cervixhám sejtek többszörösére növekedett sejtmagja Papanicolau festéssel jelentős kromatin aktivációt is mutat (balra, 100x eredeti nagyítás). Előrehaladott emlőrák anaplasztikus transzformációját differenciálatlan tumoros óriássejtek jelzik (jobbra, 40x eredeti nagyítás)

Ismerünk azonban példákat, amikor nem neoplasztikus körülmények között – stresszhatásra, citokin vagy növekedési faktor stimulus hatására – egy jól meghatározott funkció érdekében óriássejtek alakulnak ki. Ez végbemehet az ún. endoreduplikáció mechanizmusával, vagy sejtfúzióval egyaránt, a sejtmagok az utóbbi esetben többnyire elkülönülten vannak jelen a citoplazmában (pl. makrofág eredetű idegentest típusú óriássejt, de így képződnek az oszteoklasztok is). A differenciálódás során folyamatosan növekvő DNS-mennyiséggel (akár 32-64c) rendelkezik néhány osztódásában korlátozott normális sejttípus, melyek egyidejűleg jelentős citoplazmát is fejlesztenek a funkció függvényében (pl. hipertrófiás kardiomiociták, megakariociták). Biológiailag logikus, hogy a megakariocitákban az intenzív trombocita képződés érdekében a citoplazmából leváló jelentős membrán és sejtalkotó „tömeggyártásához” az átlagosnál lényegesen több normális gén aktivitására van szükség, ami humorális faktorok (elsősorban is a trombopoetin) hatására a genom megsokszorozásával érhető el. Ezen fiziológiás folyamat azonban természetesen véges, a megakariocita, mint óriássejt végül kimerül, a citoplazma az ismert módon „elfogy”, és a sejt elpusztul. A terminális differenciálódás valahol a 64-128c körüli, erősen fokozott DNS-tartalom állapotában végződhet, ennél lényegesen több nukleáris DNS-mennyiségről az irodalom nem tesz említést. A poliploidizáció valódi intracelluláris ingerével és mechanizmusával kapcsolatban azonban egyelőre korlátozottak az ismereteink.

A daganatos óriássejtek annyiban mindenképp különböznek, hogy a kromoszómaszám és készlet a progresszió során a normálistól egyre inkább eltér, ami sokszor komoly egyensúlyvesztést is jelent (aneuploidia). Az anaplasztikus tumorok egy részében ráadásul mindez jelentős növekedési előnnyel is jár. Ehhez társul természetesen az a tény, hogy a tumoros sejtekben a kromoszómák nem arányosan oszlanak el, kevesebb és több kromoszómával is fenn tudnak maradni. A fokozott proliferáció és a sejtosztódások nagy száma ugyanakkor a hibákat nemcsak továbbítja, hanem koncentrálhatja is. Mégis minden jel arra mutat, hogy a tumoros óriássejt képződésnek is kell legyenek határai. Felmerül annak a kérdése, hogy a daganatos progresszió során az aneuploid óriássejtek mikor érik el a kritikus méretet, vagyis azt a genom, ill. DNS mennyiséget, ami fölött a sejtproliferáció, a sejt fennmaradása már nem effektív. A súlyosan anaplasztikus neopláziák változatos kromoszóma összetétellel, de hangsúlyos, egyező (klonális) eltérésekkel is rendelkeznek. Ehhez képest a tumoros óriássejtek ritkábban fordulnak elő, és bár a folyamat jellegzetes morfológiájához hozzájárulnak, feltehetőleg nem ők képviselik a legagresszívabb szubklónokat. Ez lehet a helyzet pl. a klasszikus Hodgkin-limfómában patognomikus Hodgkin-Reed-Sternberg-sejtek (HRS-sejtek) esetében is.

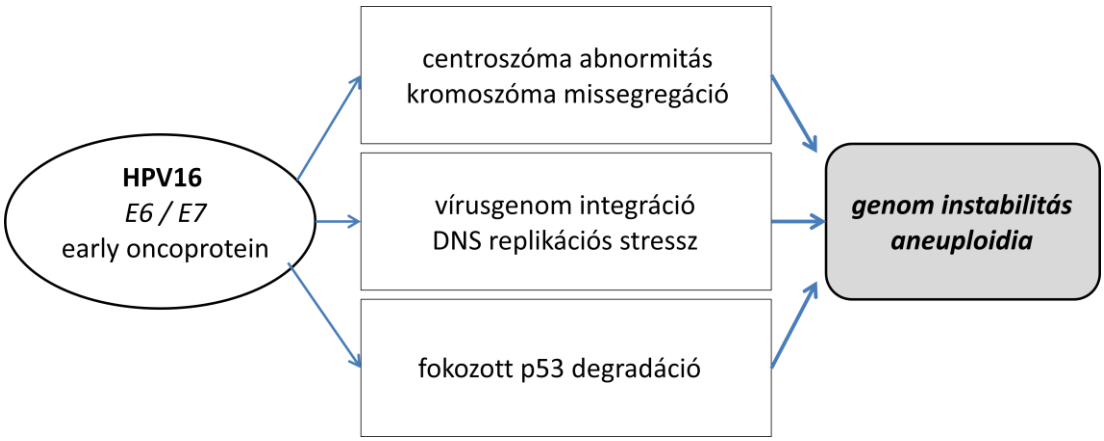
A kóros poliploidia/aneuploidia kialakulásában nem elhanyagolható szempont az a citopátiás hatás, amely különféle vírusfertőzések kapcsán jelentkezik. A citomegalia vírus (CMV) például a jellegzetes megnagyobbodásról, sejtmag eltérésről kapta a nevét, de hasonló módon ismert a parvovírus B19 fertőzés a genomra gyakorolt hatása is. A legtöbb vírus képes a gazdasejtben poliploidizációt indukálni (pl. HPV, EBV), a vírus által okzott morfológiai atípia jelensége részben erre is vezethető vissza.

1.3.7. Vírusok indukálta genetikai instabilitás/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 az orofaringeális rák kapcsolata. Mivel munkáinkban a HPV asszociált cervixfolyamatokkal foglalkoztunk részletesebben, ezért itt röviden a HPV-indukálta genomikai eltérésekre térünk ki csupán.

A perzisztáló magas rizikójú, azaz onkogén potenciállal rendelkező HPV típusok hatásukat elsősorban a genom összetételének megváltoztatásával érik el. Ennek feltétele, de egyben legfontosabb oka, hogy a vírus genom a hámsejtek kromoszómaállományába integrálódik.

Ezzel párhuzamosan már a korai léziókban számbeli kromoszóma eltérések is megjelennek [95]. Az onkogén vírusgenom integrációja a fennálló diszplázia progressziójával párhuzamosan jelentkezik. A vírusgenom integrációja bizonyosan zavarja, megváltoztatja a hámsejt némely celluláris onkogénjének működését, erre utaló jellegzetes elváltozások a magas rizikójú cervikális diszpláziákban is kimutathatók voltak [96]. E mellett jelentős kromoszomális instabilitás, lókuszok, régiók nyerése és vesztése is jellemző, melyet részben a jelentősebb számú integrációs hely fokozott törékenységére vezetnek vissza. A jellegzetes és visszatérő rendellenességek között a 3q26 kromoszóma régió többszöröződését is leírták, melyben a humán telomeráz (TERC) génje is elhelyezkedik [97]. A kromoszómák gyakori numerikus eltéréseit ugyanakkor a vírusgenom által kódolt E6 és E7 onokprotein fokozott expressziója és ezek 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 [98]. Mindezen folyamatok eredményeképpen az immortalizált, esetlegesen túlélési előnnyel rendelkező laphámsejtek jelentős mennyiségű irreleváns genetikai hibával is rendelkeznek, esetlegesen kifejezett aneuploidia is fellép, mely akár a diszplasztikus/tumoros óriássejt mértékét is eléri (10. ábra). Érdekes ugyanakkor, hogy a kifejezett genom instabilitás és óriássejt képződés a cervixrákok jelentős részében nem prominens, csupán a legmagasabb grádusú daganatokban jellemző.



10**. ábra**. Az elhúzódó humán papillomavírus fertőzés hatásai a hámsejtek genomjának integritására

1.3.8. Aneuploidia gyakorisága és okai a különböző daganatokban

A malignus daganatok mintegy felében észlelhető az aneuploidia manifesztálódása, annak mértéke, az előfordulás gyakorisága és a kialakulás módja azonban rendkívül eltérő lehet. A ploidia mértéke (alacsony vs. magas aneuploidia) és a DNS-hisztogram jellegzetességei már a DNS-citometria korai időszakában a daganatok heterogenitására hívták fel a figyelmet.

Ductalis emlőrákokban igen gyakran, az esetek 65-90%-ában tapasztaltak aneuploidiát, és tumoros óriássejt képződés, durva aneuploidia (>5c, >9c DNS-tartalom) is meglepően magas hányadban (50%) volt jelen statikus citometriás mérések alapján [99]. Az aneuploid sejtklónok jelenléte kedvezőtlen prognózist, rossz túlélést jelentett [100;101]. Az aneuploidiához vezető mechnizmusok tekintetében azonban már kevésbé egybehangzóak az eredmények. Emlőrákban AuroraA overexpressziót 94%-ban észleltek, ehhez azonban csupán 12%-ban tartozott az AURKA lókusz amplifikációja. E mellett az emlőtumorok 80%-ában centroszóma amplifikáció jeleit is leírták [102;103;104]. Ezzel szemben gyomorrákok esetén az aneuploidia mértéke 50-70%, az AuroraA overexpresszió 50%-ban jellemző és csupán 5%-ban van jelen AURKA génamplifikáció. Itt centroszóma eltérések nem ismeretesek [105]. Az irodalmi adatok alapján az emlő, a vese és a hólyag tumorokban az átlagosnál gyakrabban észlelhető aneuploidia. Az abnormitás mértéke a szövettani grádus függvényében is jelentősen fokozódhat, pl. hólyagrákban [106]. A grade 1 hólyagrákokban egyébként a centroszóma multiplikáció mértéke ugyancsak gyakoribb volt, mint a tényleges aneuploidia, ami arra utal, hogy a CIN részeként a kóros osztódási mechanizmus előbb alakul ki és azt később követi a klonális jellegű kromoszomális eltérés. A spektrum másik végén a prosztatrák helyezkedik el, melyek döntő többsége diploid és csak a legagresszívebb esetekben lehet centroszóma amplifikációt kimutatni. A mechnizmus biológiája kevésbé ismert, de az aneuploidia a gyermekkor leggyakoribb szolid daganatában, a neuroblasztómában is igen gyakori. Érdekes kivétel, hogy itt a „hiperdiploid/near-triploid” DNS-tartalom jellemzően kedvező klinikai kimenetellel társul, amennyiben egyéb genetikai eltérés (pl. NMYC génamplifikáció) a hatást le nem rontja [107;108].

Az elmondottak alapján kijelethető, hogy az aneuploidia komoly szabályozási zavarok kapcsán képződik a malignus sejtekben, de a kialakulás mechanizmusa változatos. Következménye sem teljesen egyértelmű, függ a tumorképződés aktuális stádiumától, egyaránt lehetnek a progresszióra, de esetlegesen a tumor szuppresszióra irányuló hatásai is.

1.3.9. A genetikai eltérések hatása a tumoros fenotípusra, genetikai alapú kóros génexpresszió

Az instabilitás következtében kialakuló génelváltozás fajtájától függően a kódoló génekben a fehérje expresszió fokozódása vagy annak teljes elmaradása is bekövetkezhet. Különösen génamplifikáció, transzlokáció esetén várható tömegesen fokozott fehérjeexpresszió (overexpresszió), mely onkogén hatással is rendelkezik. Ilyen eltérés az emlő- vagy gyomorkarcinomákban jelentkező Her-2 génamplifikáció, melynek hatása a daganatsejtek membránjában elhelyezkedő c-erb2/neu (Her-2) receptorfehérje tömeges felszaporodásával és a fokozott receptorfunkción keresztül a sejtaktivitás növekedésével jár [109;110;111]. Hasonlóan transzaktiváló jellegű, fehérje overexpresszióval járó eltérést okoz a CMYC gén transzlokációja [112], mely pl. Burkitt-limfómában jellegzetes és a sejtciklus és sejtmetabolizmus egyik leghatásosabb triggere, a daganatsejtek lényegében 100%-át a sejtciklusba hajtja. A nukleotid cserével járó mutációk lehetnek aktiváló és inaktiváló jellegűek. A génexpresszió teljes hiánya bekövetkezhet egyszerűen egy stop kodon kialakulásával, pl. INI1 mutáció esetén akut mieloid leukémiában és rhabdoid tumorban (ATRT) [113], de folyamatos transzkripció és transzláció mellett a mutáns fehérje működése is lehet csökkent. Speciális a helyzet a p53 fehérje esetén, amikoris a számos potenciális mutációs hellyel rendelkező onkoprotein inaktív, mutáns változata a vad típusú fehérjével dimerizálódik és bár ennek működése lényegesen csökkent, a komplex lebomlása is akadályozott [114]. Ennek eredményeképpen a mutáns fehérje szövettani vizsgálat során fokozott mértékben van jelen a p53 mutáns sejtekben, ami a daganatdiagnosztikában szintén fontos és gyakran használt paraméter [115].

Láttuk, hogy a specifikus eltérések jelentős része több módon megközelíthető és az eltérés hatása esetenként jól lemérhető. Nem így van ez a durvább kromoszómaeltérésekkel és az aneuploidiával, melyek hatása nagyon szerteágazó lehet és komplexitásánál fogva nehezen mérhető. Ugyanakkor a DNS-tartalom (DNS-index) növekedése és a komplex kariotípus egyes vagy akár az összes kromoszóma megsokszorozódásával általánosságban kedvezőtlen jel és természetesen az egyes specifikusabb eltérésekkel együtt, vagy azokat követően is jelentkezhet. Egyes esetekben azonban világos, hogy a nagyobb kromoszómaszám is összefüggésben állhat bizonyos fehérjék expressziójával. Ilyen konkrétan a Her-2 fehérje fokozott (3+) expressziója kapcsán észlelt 17-es kópiaszám növekedés. Sokáig vitatott volt a klasszikus génamplifikációnak nem tekinthető, a tetraszómiánál magasabb 17-es kromoszómaszám elvi jelentősége emlőkarcinomában, mely 8-30%-os gyakorisággal szerepel a szakirodalomban [116;117]. A jelenlegi ajánlásokban azonban a

poliszómia/aneuszómia hatásában ekvivalensnek tekintendő a génamplifikációval, amennyiben a fehérje expresszió is ezt támogatja [118;119]. Némileg más azonban a helyzet a gyomorkarcinómák esetében, ahol a Her-2 expresszió a tumorsejtekben kifejezett heterogenitást mutat. Itt a génamplifikáció mellett az esetek további 14-18%-ában lehetett 17-es poliszómiát kimutatni, ezekben az esetekben a Her-2 expresszió igen változatos [120;121], és viszonylag gyakoriak a 17-es kromoszóma poliszómiás, heterogén Her-2 expresszáló gyomordaganatok, melynek klinikai viselkedését, jelentőségét még intenzíven kutatják.

Viszonylag keveset tudunk tehát a ploidia és kromoszóma szegmentumok kópiaszám változásainak következtében létrejövő fenotipikus hatásokról. A ploiditás és a genom átrendeződésének, valamint az ezzel kapcsolatban kialakuló heterogenitás jelentőségének megértéséhez a meglévő, önmagában hatékony sejtszintű vizsgálómódszerekhez olyan műszeres támogatásra, automatizált rendszerekre is szükség van, amelyek a kópiaszám eltéréseket tágabb összefüggéseiben, a kapcsolt genetikai eltérésekkel vagy az esetlegesen kimutatható fölérendelt mechnizmusokkal párhuzamosan elemzik.

1.4. Szövettani in situ technológiák és szerepük a genetikai instabilitás és az azzal összefüggő szöveti eltérések tanulmányozásához

1.4.1. Morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok

A klasszikus morfológiai jelek, az atípia, az invazív hajlam, a szövettani grádus mind a sejtek molekuláris összetételének, génaktivitásának, jelátvitelének az új egyensúlyából erednek. A szöveti elváltozások lényegében valamennyi biokémiai, biológiai tulajdonsága tanulmányozható. Viszonylag egyszerű morfológiai megközelítésekkel a sejtek funkcióira is következtethetünk, így pl. a sejtciklus aktivitásra a mitózisok gyakoriságából, a genom instabilitására a tumoros óriássejtek vagy atípusos sejtosztódások megjelenéséből. Ezek egy részét a fehérjék szintjén, specifikus antitestek segítségével eredeti környezetében (in situ) láthatóvá lehet tenni. A módszer - megfelelő interpretációval - igen hatékony és klasszikus paraffinos metszetekben is széles körben használatos, a szövettani diagnosztika alap módszertanához évtizedek óta hozzátartozik. A fehérje alapú megközelítésre a Her-2 receptor mellett jó példa a transzlokáció következtében a follikuláris limfómákban tapasztalható bcl-2 fehérje overexpresszió a nyiroktüszőkben, vagy a ciklin D1 expressziója köpenysejtes limfómában. A korábban említett mutáns p53 fehérje pl. felhalmozódás révén

mutatható ki szövettanilag. A leggyakoribb, aktivációval járó BRAF mutáció (V600E) a fehérje makroszerkezeti elváltozását eredményezi, ami specifikus antitesttel igen hatékonyan kimutatható, mint azt később bemutatandó munkáink is bizonyították.

A felsorolt példák is mutatják, hogy a genetikai eltérések genetikai módszerekkel, míg azok tényleges hatása gyakran a kódolt fehérje biokémiai vagy szövettani vizsgálatával is megközelíthető. Legtöbbször azonban az immunhisztokémiai pozitivitás nem utal egyértelműen a genetikai háttérre. Ilyenkor gyanú esetén a transzlokáció kimutatása in situ hibridizációval vagy PCR módszerével szükséges. Egy patológiás szövet vagy sejtpopuláció molekuláris vizsgálata során a mennyiségi és minőségi mutatók (génexpresszió, kópiaszám, stb.) magát a populációt jellemzik, az egyes sejtek tulajdonságait, az esetleges sejtenkénti eltérések mértékét, eloszlását sokkal nehezebb izolált molekulák tesztelése során kimutatni. A sejtpopulációkban rejlő heterogenitás felismerése és vizsgálata a daganatokban ugyanakkor biológiailag 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.

1.4.2. In situ hibridizáció

A fluoreszcens in situ hibridizáció a 90-es évek elejétől a sejtekben kimutatható kromoszomális eltérések igen hatékony és széles körben elterjedt módszere [122]. In situ jellegénél fogva a megcélzott eltérés sejtmagonként kimutatható és értelmezhető, sok sejt elemzése kapcsán pedig egy mintán belül különböző szubpopulációk határozhatók meg. A hibridizáció lényege, hogy a jelölt DNS-próba a kimutatni kívánt genomikus szekvenciákhoz kötődik specifikusan, több próba alkalmazása esetén többféle fluoreszcens jelölés alkalmazható. A jelölések kombinációja sokféle lehet, így egyszerű kópiaszám meghatározásnál a fluoreszcens jelek mennyisége számít, a bonyolultabb szerkezeti eltérések vizsgálatára a jelek egymáshoz való viszonya, távolsága a legfontosabb szempont. Különösen jelentős szerepet kapott a FISH technika egyes daganatok diagnosztikájában, miután kiderült, hogy az immunhisztokémiával meghatározott fehérje expresszió mértéke nehezen reprodukálható és interpretálható (l. Her-2 diagnosztika). Ennek oka lehet, hogy a fehérje expressziója nem feltétlen arányos a génkópia számának emelkedésével, de sajnos nagy zavart okozhat a szövet fixálásának és feldolgozásának miként je is. Így vált szükségessé annak az algoritmusnak a kialakítása, mely szerint az emőkarcinomák Her-2

ellenes terápiájához az immunpozitivitás kérdésessége esetén kötelező meghatározni a génkópia számot, azaz az esetleges amplifikáció mértékét. A jelentősebb patológiai laboratóriumok arzenálja ennek megfelelően immár több, mint 10 éve magában foglalja a FISH technikát is. A módszer elterjedéséhez az egyre megbízhatóbb FISH protokollok, próba kit-ek elterjedése is hozzájárult, mára nagyon ritka, hogy saját fejlesztésű FISH-próbákkal dolgozzanak. A FISH rutin alkalmazása ugyanakkor viszonylag munkaigényes, mely a labortechnika részéről sok manuális elemet tartalmaz, de a mikroszkópos kiértékelés is sok időt és tapasztalatot igényel.

1.4.3. Citometria és morfometria alkalamzása a genetikai heterogenitás kimutatására

A mikroszkópban észlelhető morfológiai és biokémiai változók jelentős része a szakember számára – részben empirikus alapon - viszonylag könnyen értelmezhető, azonban az egyes konkrét tulajdonságokról nehéz objektív és összehasonlítható eredményt mondani. A szöveti és sejtszintű mérések azt a célt szolgálják, hogy a tárgylemezen elvégzett specifikus jelölések mennyisége és minősége az illető struktúrára vonatkozóan számokkal is kifejezhető legyen. Több színű jelölésekkel ezek viszonya is tanulmányozható, melyre a fluoreszcens jelölések különösen alkalmasak, ugyanis az egyes hullámhossz csatornákban észlelt jelek egymást alig zavarják. A 1990-es évek második felétől nyílt meg a lehetőség arra, hogy pásztázó mikroszkópok, citométerek segítségével nagy felületen elhelyezkedő sok sejt jelölődési sajátságait 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 szkenner alapú képanalízis.

(1) A *lézer scanning citométer* (LSC) az áramláscitometria elvét követve az adott fluoreszcencia tartományban energiákibocsájtást észlelve a jelölt sejteket, mint objektumokat regisztrálja a tárgylemezen és annak intenzitása alapján a sejteket grafikusan fel is tünteti (dot plot), ami sejtpopulációk azonosítását is lehetővé teszi [123]. Ugyanakkor tényleges képet a mérés során nem rögzít az eseményről. Ezt utólag, a rendszer mikroszkópján keresztül a kiválasztott események automatikus visszakeresésével lehet megtenni, amely a sejtekhez tartozó koordináták segítségével végezhető, fényképezés, morfológiailag osztályozás tehát interaktívan lehetséges. Az LSC technika többek között a diagnosztikus citológiában keltett nagy reményeket, ahol az egyes sejtek morfológiai megítélésén túl bármely további

sejtszintű paraméter nagy segítséget jelenthet. Metszetek vizsgálatára ugyanakkor a vázolt működési elv kevésbé bizonyult alkalmasnak.

(2) Az LSC „real time” elvével ellentétben a *mikroszkópos képanalízis* a mikroszkópos preparátum digitálisan felvett képének utólagos elemzését jelenti [124]. Ebben az esetben az összetevők azonosítása, majd jellemzése képről képre, előre meghatározott, a jelöléseknek megfelelő algoritmus szerint történik. A többszínű immunfluoreszcencia alkalmazása esetén a jelöléseket 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 az egyes képek tárolásra kerülnek, visszakereshetők, illetve beállítástól függően lehetőség van csak a meghatározó, érdekes objektumok tárolásra helytakarékossági szempontból. A képanalízis automatizációja természetesen megfelelő optikai kialakítású és nagyfelbontású kamerával ellátott motorizált mikroszkóppal lehetséges, a precíz autofókuszálás a képfelvétel és az analízis szempontjából is alapfeltétel.

(3) A képanalízis nyújtotta lehetőségeket tovább szélesítette a kb. 10 éve megjelent *digitális szkennerek* térhódítása. A tárgylemez szkenner kifejlesztése és elterjesztése terén magyar kutatók úttörő munkát végeztek [125]. 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 [126]. Így az optikai leképezés kizárólag a digitális rögzítés céljait szolgálja. A gyorsaság a tárgylemezek áteresztőképességében is megnyilvánul. Az önműködő rendszer felügyelet nélkül akár több 100 metszetet is digitalizálni képes, a metszetek előre kigondolt sorrendben, betárazva kerülnek a készülékbe. A digitális metszetek meghatározott pontokra való fókuszálás után felvett apró képek összeillesztéséből alakulnak ki, a file megnyitása után a képernyőn mozgathatók, virtuálisan nagyíthatók-kicsinyíthetők. 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 [127;128;129].

2. Célkitűzések

Kutatási céljaink között elsősorban a daganatos és prékancerózus betegmintákból (citológiai preparátum, perifériás vér, csontvelő, szövettani metszet) származó sejtpopulációk genetikai, kromoszomális összetételének, ezen belül az aneuploidia, kromoszomális kópiaszám eltérések minél precízebb jellemzése, valamint a kromoszómális 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 funkcionális állapotát, 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 „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 megtapasztalni. 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 állapotaiban:* a korai karcinogenezisben jellemző durva kromoszómahibák kialakulását és az aneuploidia klonális eredetének kérdését kívántuk tanulmányozni LSC módszerével és összevetni a HPV fertőzés és a Bethesda-osztályozás szerinti citológiai elváltozásokkal. Azt kérdeztük, megtalálhatók-e és használhatók-e a magasan aneuploid hámsejtek a magas rizikójú cervikális eltérések jellemzésére. Meg kívántuk vizsgálni, hogy az új módszerrel 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 jellemzőket.

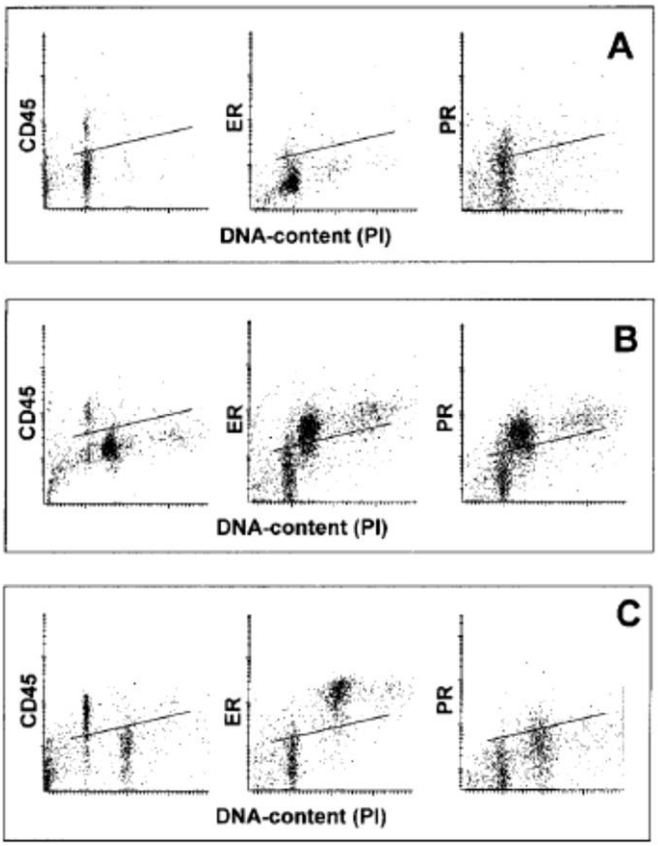
- *Az Aurora B mitotikus kináz relatív expressziójának és deregulációjának meghatározása emlőkarcinoma és limfóma esetekben:* Hipotézisünk szerint az Aurora B expressziójának változása összefügg a daganatok ploiditásával és az agresszív fenotípussal. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a kináz expresszió meghatározható-e objektív módon a sejtkinetikai változók figyelembe vételével. Összefüggéseket kerestünk továbbá az Aurora B expresszió és a kromoszomális instabilitás/ploiditás között. Az instabilitás kérdését egyszerű lehetőségként a 17-es kromoszóma szerkezeti és kópiaszám eltérésein keresztül kívántunk tanulmányozni.

3. Citometriai és molekuláris morfológiai módszerek a genetikai és fehérjeexpressziós sajátosságok in situ vizsgálatára

3.1. Laser scanning citometria a DNS-ploidia és fehérjeexpresszió együttes vizsgálatára: DNS-index és receptor státusz meghatározás emlőkarcinomában

Munkáink során a DNS-tartalom vizsgálatára az LSC módszerét alkalamaztuk citológiai preparátumokban és szöveti lenyomati készítményekben, olyan preparátumokban tehát, ahol a sejtek javarészben egyesével, elkülönülten vannak jelen. A lenyomatok vizsgálatának nagy előnye, hogy különösebb előkészület nélkül, minden típusú natív szövetből a szabvány tárgylemezre helyezhetők a sejtek és hagyományos citológiai kiértékelésre is alkalmasak. Amennyiben kiegészítő mérésekre nincs szükség, a tárgylemez arhíválható, vagy a minta más, pl. molekuláris vizsgálatokhoz felhasználható. Kísérleteinkben a szöveti lenyomatok fluoreszcens LSC méréseinek elve és gyakorlati haszna is igazolható volt [130]. A sejteknek a tumorszövetből a tárgylemezre történő átvitelére újításként egy egyszer használatos szivacsos mintavevő eszközt (CerviSoft, Puritane, MN, USA) is igénybe vettünk, mely elősegíti az egyenletes sejteloszlást és csökkenti a torlódások, átfedések, nagyobb sejtcsoportok kialakulásának valószínűségét. Prototípusként az emlőcarcinoma nukleáris szteroid receptor státuszának mérési protokollja került kidolgozásra, melyet kiegészíthettünk a daganatsejtek ploiditás vizsgálatával. Az emlőrák sejtek magjában expresszált ösztrogén és progeszteron receptor kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával történt (NCL-ER6F11 anti-ER és NCL-PGR anti-PR egér monoklonális antitest, Novocastra; másodlagos FITC jelölt kecske anti-egér antitest, Dako) míg a sejtmagok jelölését a DNS-hez kémiailag sztöhiometrikusan kötődő propidium-jodid (PI) fluoreszcens festék állandó koncentrációja (50µg/ml, 200µg/ml RNase jelenlétében) biztosította. Mivel a PI-fluoreszcencia a DNS mennyiségével arányos, lehetőség nyílt a sejtmagok DNS-tartalmának a direkt meghatározására is. Rendszerünkben egy tárgylemezen három elkülönített területben 3 immunfluoreszcens reakciót is el tudtunk végezni a daganatsejtek jellemzésére. Az ösztrogén és progeszteron receptor kimutatás mellett kontrollként a fehérvérsejteket feltüntető CD45 (LCA) antigén vizsgálatára is sor került (anti-CD45 clone T29/33, Dako). Eredményeink azt mutatták, hogy a DNS-tartalom alapján az aneuploid emlőrák sejtklónok külön populációként ábrázolódnak a mérési adatokat tartalmazó diagramon, ugyanakkor a sejtmag receptor expresszió ettől független paraméterként, a maga változatos mértékében jól ábrázolható (11. ábra). Aneuploid

esetben a tumorsejt populációk kiválóan azonosíthatók voltak és az eltérés a receptor expresszióban a nem daganatos háttértől (kötőszöveti és gyulladásos sejtek) igen jelentős volt.



***11*. ábra.** Receptor expresszió és DNS-tartalom együttes meghatározása emlőkarcinómában laser scanning citometriás mérés eredményeképpen. A szivacsos mintavevő eszközzel tárgylemezre felvitt, egymástól többnyire jól elkülönülő tumorsejtek egyenként kerülnek detektálásra a fluoreszcencia paraméterek szerint a két használt zöld és vörös fluoreszcencia csatornában (FITC – ösztrogén (ER) ill. progeszteron receptor (PR), propidium jodid (PI)– DNS). A CD45 immunfluoreszcencia a preparátumban található jelentős mennyiségű nem neoplasztikus gyulladásos sejteket mutatja, melyek normál (DI=1,0) DNS tartalommal rendelkeznek. Ezt a sejtpopulációt referenciaként használva megállapítható, hogy az A esetben a tumorsejtek normál DNS-ploiditással rendelkeznek és a receptor státusz ER-/PR-. A B diagrammon a tumorsejtek aneuploidak (DI=1,45, triploid tartomány) és receptor pozitívak. A C esetben a daganat tetraploid (DI=2,0), ER+/PR- expresszió jellemző. A ferde vonal a pozitivitás alsó határát jelöli.

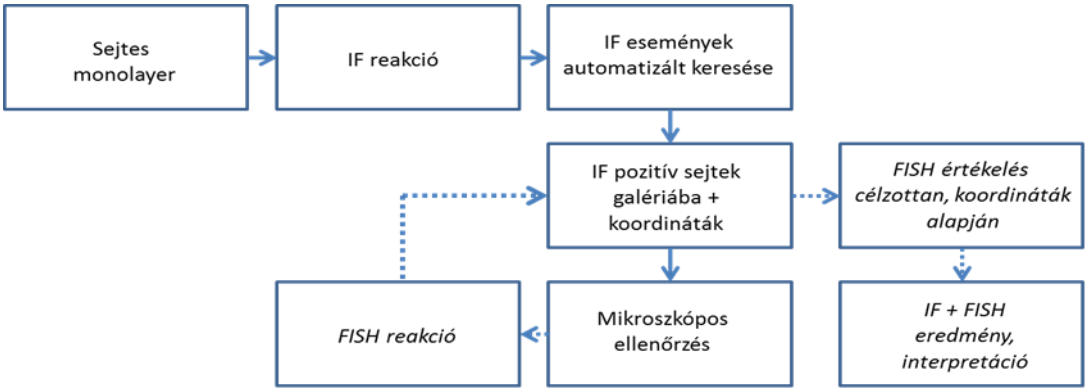
A mérésekből megállapítható, hogy a tumorsejtekben a receptor expresszió jelentősen eltérhet, populáció szintjén azonban egyértelmű válasz adható a receptor státuszt illetően. A standardizált lenyomati minta készítésére és az immunfluoreszcens jelölésre vonatkozó módszerleírást a Current Protocols in Cytometry 2004-es kiadása részletesen tartalmazza [131].

A natív sebészi mintából vett preparátumokhoz hasonlóan az LSC készülékkel sikeres DNS-tartalom mérések voltak végezhetők egyéb, tárgylemezre vitt sejteken is. Az általunk az elsők között alkalmazott standardizált, folyadékalapú citológiai mintákból (liquid-based cytology) kifejezetten eredményesnek bizonyult a ploiditás vizsgálat. A cervix citológiai mintákban ezzel a technikával megfigyelt eredményeinket a 4.1. fejezetben ismertetjük részletesen.

3.2. Az automatizált immunfluoreszcencia plusz FISH (AIPF) technológia ritka sejtek kimutatására

Az automatizált képanalízis segítségével a mikroszkópos digitális képek elemzése akár azonnal a felvétel után megtörténhet a fluoreszcens csatornákból származó információk alapján, és ígx csupán algoritmus kérdése, hogy a mely képek (vagy képrészletek) kerülnek tárolásra. A tárgylemezen kijelölt terület lefuttatását befejezve az egész vizsgálatra nézve rendelkezésre állhatnak statisztikai eredmények, digitális felvételek, valamint az egyes – pozitív - eseményekhez rendelhető koordináták. Ennek a technikának az alkalmazását Thomas Lörch (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Németország) és Peter F. Ambros (CCRI, St. Anna Kinderspital, Bécs) munkacsoportjával közösen határoztuk el immunfluoreszcenciával azonosított ritka sejtek kimutatására és további vizsgálatára. Eljárásunkat úgy alakítottuk ki, hogy a jellegzetes immunprofil alapján automatikusan kiválasztott, a tárgylemezen virtuális azonosítóval ellátott és dokumentált sejtek gombnyomásra visszakereshetők legyenek, ami további vizsgálatokat tesz lehetővé a mikroszkópban (11. ábra). A műszer motorizált mikroszkópból (Zeiss AxioImager, Zeiss, Oberkochen, Németország), motoros tárgyasztalból (Merzhauser, Wetzlar, Németország), érzékeny digitális kamerából és a MetaSystems által kidolgozott szoftverből (Metafer) tevődött össze. Technikánk segítségével szükség esetén az immunfluoreszcenciával azonosított sejtek FISH vizsgálata és célzott kiértékelése is lehetővé vált (automated immunofluorescence plus FISH = AIPF). A preparátumban elhelyezkedő sejtekről ugyanis a kiértékelés után a fluoreszcensen jelölt antitest enzimatikusan (tripszin 200µg/ml) leemészthető, ami eleve fontos lépése a FISH módszerének a próbák bejutása érdekében. A sejtmagok így a DNS-próba számára hozzáférhetők és a többféleképpen jelölt specifikus DNS szekvenciák egymáshoz képest is láthatóvá tehetők. A módszer azért is elegáns, mert a detektáláshoz ugyanazok a fluorokrómok használhatók, a kiértékelés ugyanazokkal fluoreszcencia beállításokkal (gerjesztési hullámhossz, szűrőkombinációk, csatorna erősítés)

történhet. A FISH preparátumot a mikroszkópba helyezve az immunfluoreszcencia alapján kiválasztott sejteket újra fel lehet keresni és a FISH mintázatot már csak ezekre a sejtekre összpontosítva kell azonosítani.



12**. ábra**. Az automatizált képanalízissel azonosított immunpozitív sejtek molekuláris citogenetikai vizsgálatának algoritmusa (AIPF). A szaggatott vonal a ráépített FISH vizsgálat opcionális jellegét mutatja, immunpozitivitás esetén akár egyetlen sejt genetikai tulajdonságai is megállapíthatók

A vázolt immuncitokémiai/molekuláris citogenetikai 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 1-3 daganatsejt megbízhatóan megtalálható volt. A rendszer sejtek azonosítására a az egyes fluoreszcencia csatornákban mérhető felület, homogenitás és kontúr értékeket vette figyelembe. A képanalízis algoritmus által felismert és dokumentált 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 [132].

Az automatizált képanalízis és az AIPF módszer segítségével nagyobb számban végeztünk méréseket a csontvelői és a perifériás vérben kimutatható korai disszemináció kutatására neuroblastomában és emlőkarcinomában. Eredményeinkről részletesebben a 4.2. fejezetben számolunk be.

3.3. Új eljárások a FISH technika hatékonyabb alkalmazásához

3.3.1. Egynapos in situ hibridizáció (IQ-FISH) a klinikai gyakorlatban

A módszer kezdeti bevezetése óta folyamatosan alakult ki a FISH metodika egyszerűsített, rutin menete. Az elérhető próbák száma és a jelölések terén a kínálat egyre bővült, a módszer technikai bonyolítása azonban lényegében nem változott az utóbbi időkig [133]. E szerint a preparációs és feltárási/denaturálási fázist követően a DNS-próba éjszakán át történő hibridizációját a következő napi mosási, differenciálási lépések követik (pl. J. Utikal egyszerűsített leírása, www.methods.info/Methods/Histology/FISH). Hagyományosan tehát a módszer két napot vesz igénybe, ami a laboratóriumi kapacitást lefoglalja és a sürgős esetek gyors kiértékelését is hátráltatja. Munkáink során a először volt lehetőségünk a DAKO cég által kifejlesztett, új összetételű DNS próbaelegy alkalmazásával, összesen 4 óra alatt elvégezhető 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 [134]. A kettős kiértékeléssel feldolgozott 40 emlőkarcinóma esetből származó tapasztalataink alapján a diagnisztikus 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. Időközben a gyártó az IQ-FISH próbákra való áttérésről döntött és a hagyományos HER2 FISH-kit forgalmazását ki is vezette a piacról.

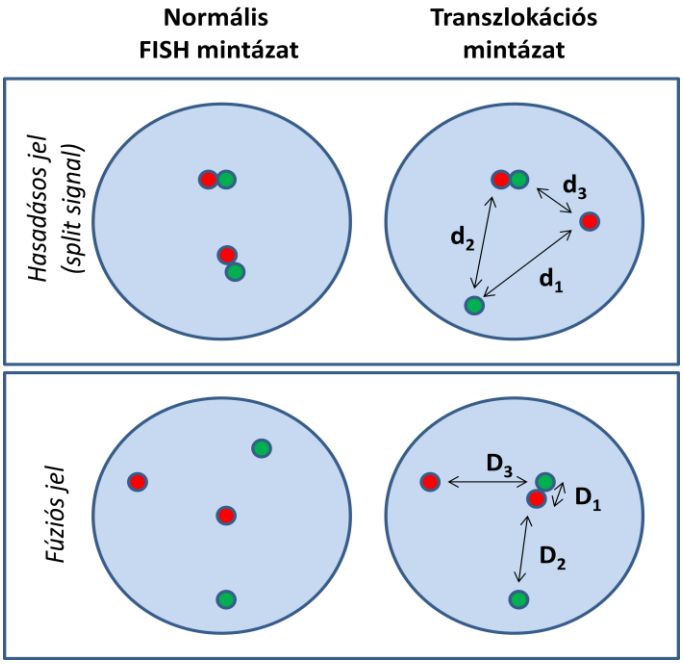
3.3.2. Automatizált képanalízis FISH jelek kiértékelésére

A laboratóriumi protokoll meggyorsítása mellett a FISH technika fő problémája a fluoreszcens mikroszkópban való kiértékelés, melyhez tapasztalt szakember és sok idő szükséges, az eredményt ugyanis az egyes sejtekben észlelt jelölési mintázatok statisztikai eloszlása határozza meg. Egyszerűbb kérdések megválaszolásához (ilyen pl. a Her-2 génamplifikáció megítélése is) elegendő lehet 20 reprezentatív sejtmag értékelése, de különösen a kromoszóma transzlokációk esetén, kis szubklónok keresése kapcsán több száz sejtmag vizsgálata indokolt. A FISH jelek automatizált felismerése és értékelése a

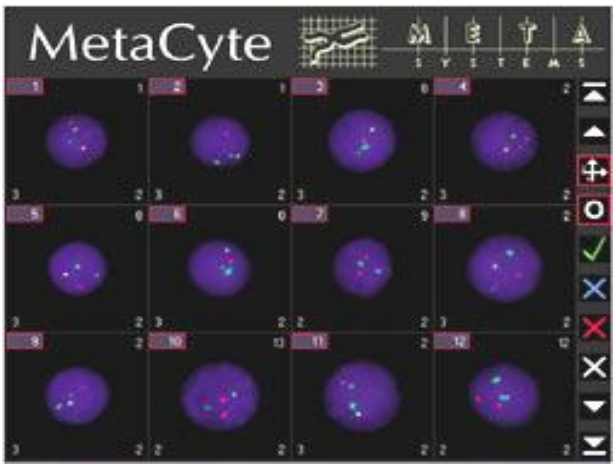
képanalízis algoritmusok és a nagy felbontású (monokróm) digitális kamerák megjelenése óta lehetséges, önmagában a fluoreszcens jelek leképezése nem jelent kihívást. A kérdést azonban bonyolítja, hogy a jelek többnyire eltérő képsíkokban helyezkednek el, így az élesre állás csak több síkban készült felvétel egymásra vetítésével lehetséges, ami a tárgylemez vertikális (Z) tengelyét változtatni képes motorizált mikroszkóp használatával társítható. Nagy sejtszám vizsgálatához ugyanakkor sok látómező elemzése szükséges, ami az X/Y irányú tárgylemez mozgatást is feltételezi. Automatizált FISH kiértékelésre vonatkozó kísérleteinkben tehát a már ismertetett AIPF eljáráshoz hasonlóan teljeskörű motorizációval és nagyfelbontású digitális kamerával, valamint az ezek működését összehangoló képanalízis szoftver összeállításra volt szükség. Német partnerünk (MetaSystems GmbH, Altlussheim) automatizált prototípus rendszerével olyan minőségű képsorozatok készítése vált lehetővé, melyek a FISH jelek értelmezését biztosították a monitoron. Az együttműködés keretében kidolgozott algoritmus a sejtmagok festődését (DAPI interkaláló DNS festék) használta a mérendő objektumok azonosítására, melyhez sok vizuális paraméter, így a legkisebb és legnagyobb sejtmag és fluoreszcens jel méret is beállítható. A digitálisan körülhatárolt és kontrasztosított sejtmagokon belül felismert piros és zöld FISH jelek száma és egymáshoz való távolsága, mint külön paraméterek segítetenek egy adott FISH stratégia kapcsán a pozitivitás eldöntésében. Egy transzlokáció esetén a kromoszóma hibát két, normálisan távol lévő hibridizációs jel egybeesése jelezheti (fúziós stratégia), de a fordított megközelítés is igen hatékony, amikor a kromoszóma törését a töréspont szomszédságában elhelyezkedő jelek szétválása (split szignál) jelzi (13. ábra).

A fluoreszcens jelekből származó információ a feldolgozott valamennyi azonosított sejtmag esetében rendelkezésre áll, így ideális esetben néhány perc alatt akár több ezer sejt kiértékelése is megtörténhet, melyekhez kópiaszám és távolság adatok (szétválás, fúzió, stb.) egyaránt lekérdezhetők.

A számos digitális kép paraméter közül az aktuálisan nem szükségesek egyszerűen kikapcsolhatók, a fontos mérési beállítások viszont protokollok formájában menthetők. Kísérleteink eredményeképpen általánosan használható FISH mérési alkalmazások születtek, melyek a MetaSystems GmbH képanalízis termékcsaládjában (MetaCyte) kaptak helyet (www.metasystems-international.com/metafer) (14. ábra).



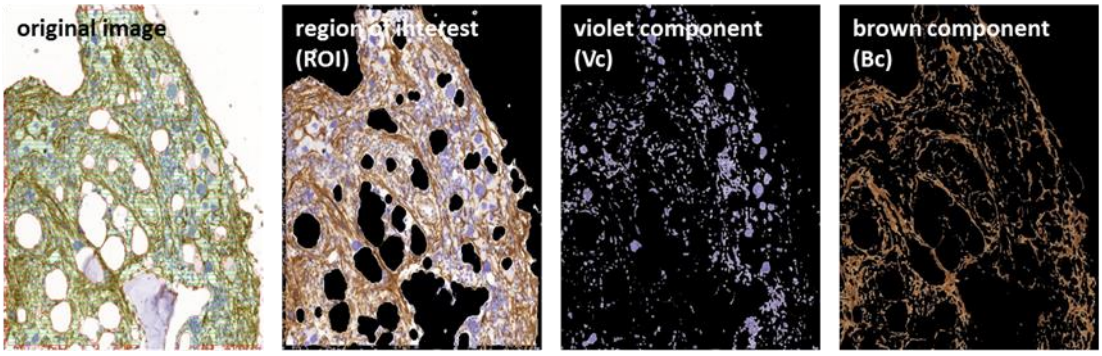
13. ábra. Az automatizált FISH vizsgálat elve két (pitos/zöld) színjelöléses próbakombináció esetén. Az alkalmazott mérési stratégia a DNS-próbák jellegéből adódik (hasadásos vagy fúziós próbamintázat). A normális helyzetben szomszédos régiók közötti törés (transzlokáció) a jelek széthasadásával jár, melyet a legnagyobb piros/zöld távolság (d_1) jellemez (fent). Fordított helyzetben a transzlokáció következtében kialakuló jel fúziót a partnerrégiók egymáshoz kerülése mutatja, ennek jellemző paramétere a legkisebb piros/zöld távolság (D_1).



13. ábra. A FISH jelek azonosítására és a sejtmagokban előforduló FISH mintázatok felismerésére kifejlesztett MetaCyte program képernyőképe. A DAPI DNS-magfestődés alapján egyesével azonosított sejtek területében a piros és zöld fluoreszcens tartományban is megtörténik a jelek elemzése, melynek során a kópiaszám és a jelek egymástól való távolsága is meghatározásra kerül. A vizsgált paraméterek statisztikai feldolgozása a monitoron történő validálás után következik.

3.4. Képanalízis digitálisan scannelt immunhisztokémiai preparátumokban

A digitális képszkennerrel (3DHistech, Budapest) folytatott munkáink során folyamatosan speciális mérési igények merültek fel, melyekhez informatikai megoldás még nem állt rendelkezésre. Különösen érdekesnek bizonyult az egyes tulajdonságra nézve heterogénnek nevezhető szövetekben a sejtalkotók összetételének vizsgálata. Ehhez a preparátumban meglévő teljes sejtmennyiség és a jelöléssel ellátott sejtek tömegének viszonyát kellett meghatározni. A vizsgálni kívánt tumoros szövetminták ugyanakkor jelentős részben nem releváns (erek, csont, zsír, kötőszövet) területeket is tartalmaznak, melyek azonban a mérésből pixel paraméterek szintjén elkülöníthetők. Miután a képformátum felbontásához szükséges támogatást a gyártó részéről megkaptuk, több lépcsős, saját analizáló algoritmus kidolgozásába kezdtünk Dr. Fazekas Attila munkacsoportjával (DE Informatika Kar, Képfeldolgozó Munkacsoport). A minta (szövetmetszet) leképezése után elsőként a hasznos terület meghatározása történik (kék színben), melyet a tényleges pozitív reakció (barna) azonosítása követ.



14**. ábra**. Képanalízis digitális szkennerrel készített metszeteken. A szövettani minta összetételét (ROI), a sejtes komponens (VC) és az immunpozitív (BC) komponens mértékét (pozitivitás) a beszkennelt digitális tárgylemezen mozaikkockánként (original) külön határozzuk meg algoritmus segítségével. A pozitív felület elemzése (szám, méret, összefelület, komplexitás, legjellemzőbb események, stb.) geometriai paraméterek segítségével történik. A végeredmény az egész mintára jellemző változó, amely az egyes minták eredményeinek összevetését lehetővé teszi.

A relatív pozitivitás egyes antigének expresszióját már jól jelezheti, de ennek mintázata, a teljes mintára vonatkozó eloszlása további fontos információt hordoz. Ezért számos képparaméter kombinációjának alkalmazásával egyedileg beállítható rendszert alakítottunk ki, mely saját célkitűzésünk - a patológiás fehérje expresszió, pl. a csontvelői stromalis

reakció és az ahhoz társuló növekedési faktor receptor (PDGFRβ) expresszió kimutatása mellett számos egyéb mérés elvégzésére alkalmas [135].

3.5. Nem-destruktív autofluoreszcencia paraméterek alkalmazása szövet- és egyéb biológiai preparátumok képanalitikai jellemzésére

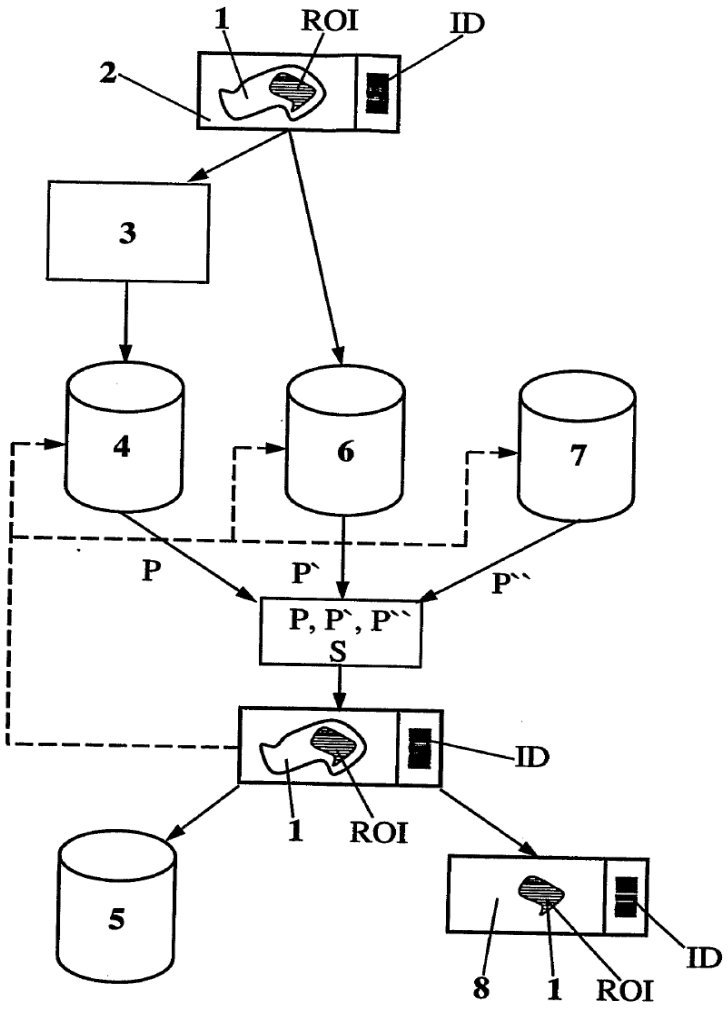
A szövetmetszetekben rejlő morfológiai információt leggyakrabban valamely biokémiai folyamat révén, színreakció vagy jelölés segítségével teszik láthatóvá, vizsgálhatóvá. A legegyszerűbb festési eljárás is a mintában található molekulák reaktivitásán alapul, egy festékmolekula viszonylag specifikusan bizonyos kémiai struktúrákhoz (peptid, szénhidrát láncok, sók, stb.) kötődik és ennek jellegzetes mintázata építi fel a szöveti képet. A szövettani festések eredménye tehát a szövetben fellelhető molekulák kémiai összetételén, reaktivitásán alapul. A speciális festékekre azért van szükség, hogy az általuk reakcióba vont molekulák színessé, láthatóvá váljanak. A szövetekben ugyanakkor gyakoriak az olyan endogén molekulák, melyek önmagukban is rendelkeznek optikai sajátságokkal (fényt nyelnek el vagy bocsájtanak ki), azaz természetes festékanyagként definiálhatók. Ezeket pigmenteknek nevezzük. A klasszikus szövettan az endogén pigmenteket hemoglobin eredetű, ún. hemoglobinogén és nem-hemoglobinogén (pl. melanin, lipofuscin, karotin) csoportba sorolja [136]. Régi felismerés, hogy a pigmentek jelentős része nem csak a látható fény tartományában, hanem fluoreszcencia detektálásával is vizualizálhatók. A hemosziderin és a melanin mellett számos más, ismert biológiai anyag is sajátos módon gerjeszthető fluorszcencia kibocsájtására különböző excitációs fényhullámhosszokon. A hétköznapi gyakorlatban ez a szövet saját fluorszcenciájaként, az autofluoreszcencia jelenségeként ismert. Az autofluoreszcencia a szövetek mindennapi vizsgálata során leginkább nemkívánatos tulajdonság, hiszen a specifikus fluoreszcens jelölésekkel interferál, azok kiértékelését zavarja a mikroszkópban. Ugyanakkor a szövetben található fluoreszkáló molekulák jól alkalmazhatók a szöveti struktúrák jellemzésére, leképezésére. Érdekes módon ennek klinikai hasznát főleg makromorfológiai vizsgálatok során használták ki eleinte. Egyes endoszkópos, oftalmoszkópos, cisztoszkópos technikák UV- vagy kékfény gerjesztésnél vizsgálják az élő szövet autofluoreszcenciáját, mivel az a szövet vérkeringésének (hemoglobin), kötőszöveti alkotóinak (kollagén, lipofuscin) eloszlását, jellegzetességeit mutatja. Így a kóros, esetlegesen korai daganatos elváltozások a normálistól könnyebben megkülönböztethetők. A klinikai gyakorlatban szemészeti alkalmazás (pl. fundus autofluoreszcencia imaging – FAFI) [137;138] és gasztroenterológiai

vizsgálómódszerek (autofluoreszcencia endoszkópia) [139;140] is hatékonynak bizonyultak. A fluoreszcencia megítélése digitális technikát, képerősítést, esetenként spektrális analízist igényel, de végső soron kímélő, hiszen semmilyen reagens, kontrasztanyag, további károsító, vagy mellékhatásokat előidéző behatás nem éri a szöveteket.

Hasonló elveket követve dolgoztuk ki a szövettani preparátumokat megkímélő, nem-destruktív képelemzésen alapuló szövettani vizsgálati módszer elvét. A szöveti autofluoreszcencia a háttér (üres tárgylemez) fluoreszcenciánál mindenképpen nagyobb, segítségével a vizsgált szövetek kiterjedése, összetétele minden további festési eljárás nélkül meghatározható, így a legegyszerűbb kérdések (hol található a tárgylemezen, mekkora kiterjedésű, milyen a belső felépítése) már eleve megválaszolhatók. A szövet összetételére vonatkozóan az egyes, endogén fluoreszcens molekulák mennyisége és eloszlása adhat további felvilágosítást. A sokféle, fényt kibocsájtó molekula szerepe az autofluoreszcencia kialakulásában és az autofluoreszcens szöveti kép felépítésében legalább olyan összetett, mint valamely kémiai festékkombináció alkalmazásakor [141;142]. Megkülönböztetünk igen tömeges szöveti struktúrákat (elsősorban pl. a kollagén), makromolekula komplexeket (pl. lipofuszcin, melanin) és fluoreszkáló kismolekulákat, metabolitokat (pl. bilirubin, biotin) [143;144]. Egy artéria keresztmetszetének képe például alapvetően az üres lumen, az abban esetlegesen elhelyezkedő vörösvérsejtek hemoglobinja, az érfal símaizom rétegeinek myoglobin tartalma és az intersticiális térben elhelyezkedő kollagén autofluorszcenciájából tevődik össze. A hem és lebomlási termékei (bilirubin) pl. a hepatociták citoplazmájában okoznak jelentősebb autofluoreszcenciát, de a porfirin metabolitok eloszlása daganatokban is jellegzetesen megváltozik [145]. A lipofuscin szöveti koncentrációja szintén függ a sejt típusától, de annak funkcionális állapotától is [146]. Mindehhez számos olyan kismolekula által emittált gerjeszthető fény is társul: pl. a biotin minden funkcionálisan aktív sejt fontos eleme, de a metabolizmus egyik fő helye a májban van, így a biotin a májsejtek autofluoreszcenciájához jellegzetes módon fog hozzáadódni. Az ismert és kevéssé ismert alkotók a fluoreszcens mikroszkópban több hullámhosszon gerjesztve viszonylag specifikus fényemissziót mutatnak, ezek egymásra vetítésével pedig a szöveti kép összerakható. Gyakorlatunkban a hagyományosnak nevezhető UV (390 nm), kék (410 nm) és zöld (515 nm) excitáció mellett, a tárgylemez beszkennelése után három autofluoreszcens kép egymásra vetítésével az egyes mikroszkópos preparátumok főbb sajátságai, összetétele jellemezhetők voltak.

A legújabb szöveti technikák (fehérje és nukleinsav alapú vizsgálatok) azt igénylik, hogy a sejtek és szövetek összetétele minél jobban azonosítható legyen, ugyanakkor a minta integritása megmaradjon, azaz a szövet feldolgozása vagy vizsgálata ne rontsa le a

célmolekulák hozzáférhetőségét. Ennek az igénynek a szöveti autofluoreszcencia vizsgálata kiválóan megfelel, mivel semmilyen reakciót, előkezelést nem igényel, a vizsgálathoz lényegében kizárólag endogén molekulákat használ. Az elv a gyakorlatban is hatékonyan alkalmazható, festetlen metszetek sorozatvizsgálatával pl. a molekuláris vizsgálatra leginkább alkalmas minták kiválaszthatók, a megvizsgált minta pedig eredeti, változatlan formában kerülhet további elemzésre (15. ábra). Munkáink lényegét találmányi védelem és továbbhasznosítás céljából az EPO által 2006-ban, majd a WIPO által 2007-ben regisztrált szabadalmi beadványban foglaltuk össze [147].



15. ábra. Az autofluoreszcencián alapuló „nem destruktív" mintaelemzés és kiválasztás a fluoreszcens képanalízis elvét követi. Egy adott sajátosságú (1), tárgylemezen elhelyezett (2) minta több csatornás (paraméteres) letapogatásával (4, 6, 7) nyert autofluoreszcencia adatokat elemezve a keresett releváns részlet (region of interest, ROI) azonosítását és kijelölését (8) teszik lehetővé a nélkül, hogy a minta sérülne, ill. elhasználódna.

Az autofluoreszcencia szövettani vizsgálat gyakorlatban való kiterjesztésére egyidejűleg egy tissue microarray (TMA) elemző módszer is védelem alá került, mely a TMA-ban elhelyezkedő minták minőségi tulajdonságait képes megvizsgálni [148]. A TMA lényegében egy sok szövetmintát meghatározott elrendezésben tartalmazó szöveti multiblokk, melyből számos (akár 50-100 db) azonos tartalmú metszet készíthető. A microarray minták hatékony alkalmazásánál, de különösen automatizált kiértékelésénél fontos az egyes minták összetételének ismerete, mely az egyes preparátumokban, metszetekben a szövet 3 dimenziós kiterjedéséből adódóan változik. Ennek a problémának az ellenőrzésére, elsősorban ipari felhasználásra (fehérje expressziós vizsgálatok a gyógyszerfejlesztésben) kidolgoztuk a microarray preparátumok autofluoreszcencián alapuló minőségvizsgálati módszerét, melyhez lényegében az autofluoreszcencia szövettan technikáját vettük alapul.

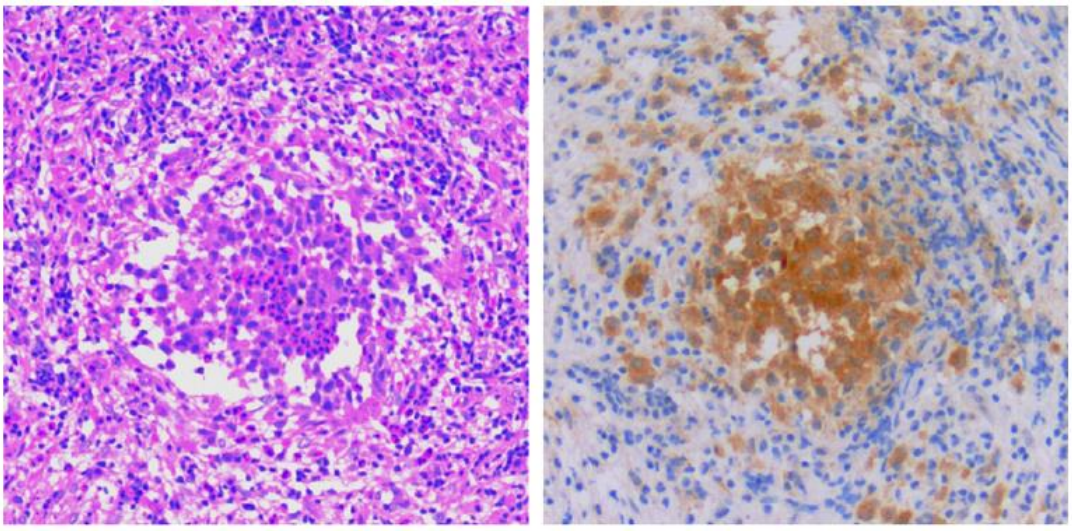
3.6. Mutáns fehérjék kimutatása mutáció specifikus antitestek alkalmazásával: a BRAF-mutáció szövettani kimutatása

A genetikai eltérések, beleértve a kisméretű szekvenciahibák (pontmutációk, rövid in/del) a kódolt fehérje mennyiségének változásán keresztül, indirekt módon is vizsgálhatók a daganatos sejtekben. A mutáció ráadásul az esetek egy részében a kódolt fehérjék konformációjára jelentős hatással van, ami immunogenitás szempontjából új epitópok megjelenésével is jár. Ezt használja ki azon megközelítés, ami a megváltozott szerkezetű mutáns fehérjék elleni specifikus antitestek előállításával a mutáció kimutatására irányul. A módosult fehérje szövettani demonstrálása a mutáns allél expressziójának tényleges bizonyítéka, egyben hasznos lehetőség a molekuláris genetikai háttér morfológiai relációinak elemzésére. A mutáció szenzitív antitestek különböző affinitással és így eltérő gyakorlati alkalmazhatósággal rendelkeznek. Az utóbbi évek egyik leghatékonyabb ilyen fejlesztése az újabban kommerciálisan is hozzáférhető BRAF fehérje ellen termelt antitest, mely a V600E mutáns specifikus kötésével szövettani vizsgálatokra is alkalmas.

A BRAF gén 15-ös exonjában a V600E aminosav cserét eredményező mutációja számos daganattípusban bizonyult gyakorinak és klinikailag is jelentősnek. A BRAF szerin/treonin kináz fehérje az EGFR/RAS/MAPK jelátviteli útvonal fontos képviselője. A mutáció az útvonal aktivációja révén fokozott sejtaktivitást, sejtciklus tevékenységet és géntranszkripciót eredményez, ennek hatására a prognosztikailag kifejezetten előnytelen. A V600E mutáció előfordulása változatos a szolid tumorokban, leggyakrabban pajzsmirigyrákban és melanomában írták le. A hajas sejtes leukémia klasszikus típusában az

esetek gyakorlatilag mindegyike V600E mutációt hordoz, így ebben a betegségben a mutáció kimutatása diagnosztikus értékű. Melanomában, később más daganattípusban a mutáns BRAF elleni kismolekulával (vemurafenib) kimagaslóan jó kezelési eredményeket értek el [149], ezért a BRAF-mutáció prediktív paraméter, ami a BRAF-gátló kezelések indikációjául szolgál. A V600E kimutatása tehát sok szempontból indokolt és rutin eljárás az onkológiai diagnosztikában.

A V600E mutációra specifikus VE1 egér monoklonális antitest klón (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) az irodalmi adatok szerint alkalmazható a BRAF-mutáció szövettani kimutatására [150;151]. A VE1 antitesttel kapott immunhisztokémiai eredményeink kiváló egyezést mutattak a szövetből izolált DNS-ből végzett, PCR reakciót követően kimutatott szekvenálási adatokkal melanoma mintákon. Érdeklődésünk középpontjába a Langerhans-sejtes hisztiocitózis (LCH) azért került, mert a betegség rendkívül sokféle manifesztációt mutat [152;153]. Gyakorlatunkban több lokalizált, kedvező kimenetelű elváltozás mellett az utóbbi 10 évben néhány gyors lefolyású, terápiarezisztens gyermekkori eset is előfordult. Vizsgálatainkban ezért a BRAF mutáció gyakoriságát és jelentőségét elemeztük gyermekkori LCH-ban a kimenetel szempontjából. Célunk ugyanakkor a VE1 mutáció specifikus antitest klinikai validációjának elvégzése is volt a rendelkezésre álló szövettani mintákon.



16. ábra. VE1 immunhisztokémia a mutáns (V600E) BRAF kináz kimutatására LCH csontvelői metasztázisában. A HE festéssel gócba tömörült neoplasztikus hisztiocitás (balra) szelektív és homogén intenzitású mutáns fehérje expressziót mutatnak (jobbra) VE1 reakciót követően. A környező reaktív limociták és a csontvelői stroma negatív. Vad típusú BRAF fehérje expressziója esetén jelölődés nem volt látható (400-szoros eredeti nagyítás).

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-ból 4 végződött a beteg halálával, míg a vad típusú betegség mindegyike meggyógyult.

A V600E mutáció kimutatása egy esetben tért el az alkalmazott két módszer között: a PCR/szekvenálás negativitása mellett immunhisztokémiailag pozitív jelölődést észleltünk az amúgy morfológiailag igazolt tumoros sejtgócokban. Ebben az egy mintában a tumorsejtek aránya meglehetősen alacsony volt (5-10%) és a DNS-vizsgálat céljából készített sorozatmetszetekben nyilvánvalóan tovább csökkent. A molekuláris negativitást elsősorban tehát az alulreprezentált tumorsejt mennyiség okozhatta. A morfológiai és specifikus immunprofil (CD1a+, S100+) alapján ezeket a sejteket szövettanilag könnyen azonosítottuk. Vizsgálataink kitértek a VE1 specifikus jelölődés intenzitására és eloszlására is. Tanulmányunkban az irodalomban is gyakran említett háromfokozatú skálát (0, 1, 2) alkalmaztunk az immunpozitivitás egyszerű mennyiségi megítélésére (150, 151). Az egyes metszetekben a pozitivitás mértéke jellemzően konstans volt, eltéréseket az egyes tumorsejt gócokon belül és a gócok között sem tapasztaltunk egyazon mintában (16. ábra). Az intenzitás mértéke ugyanakkor esetenként eltért, ennek azonban az expresszió biológiai hátterén túl számos technikai oka lehet, ezért további következtetéseket nem tudtunk levonni. Tapasztalatunk szerint a mutáns fehérje citoplazmikus expressziója egyazon LCH-s daganatszövetben meglepően homogén és állandó, a pozitivitás nem különbözik a főbb tumoros gócok és a perifériás szatellit szigetek, vagy az intersticiálisan a csontvelőparenchimában szóródott sejtek között.

3.7. Szöveti és sejtszintű vizsgálatok perspektívái a molekuláris genetika és genomszekvenálás korában

A morfológiai alapú tesztek egyik előnye, hogy a mikroszkópos kép alapján minden új biológiai információ a már ismert szöveti paraméterekhez köthető. Kísérletes körülmények között a sejtekben, modellrendszerekben létrehozott, vizsgált eltérések többnyire egyformák, homogének. A szövetek összetétele a patológiai mintákban ugyanakkor igen változatos, a vizsgálati eredmények a sejtes összetételnek megfelelően értelmezendők, gyakran a ritka események meghatározóak. Ezért a szöveti szintű vizsgálatokra, validációra a legprecízebb molekuláris eredmények birtokában is szükség van. Különösen igaz ez abban az esetben, amikor a vizsgált minta eleve heterogén biológiailag, azaz egyes paraméterekkel nem, vagy csak nehezen jellemezhető. Ilyenkor az elváltozást felépítő sejteket legfeljebb szubpopulációk szintjén lehet jellemezni. A biológiai folyamatok alapegysége a sejt, a

szöveti paramétereket az azt alkotó sejtek molekuláris felépítéséből, működéséből, kóros viselkedéséből lehet összerakni. Munkáink az 1990-es évek közepétől arra irányulnak, hogy a daganatokra jellemző genetikai és biológiai heterogenitást minél pontosabban, a szubklónok, az egyes sejtek szintjén tudjuk megismerni.

4. A kromoszomális eltérések előfordulása és jelentősége a daganat progresszió és heterogenitás létrejöttében

Kutatásaink során különféle szövetekből származó daganattípusokban a kromoszomális hibák, szűkebb értelemben a kópia szám eltérések eloszlását és heterogenitását, illetőleg kialakulásának jellegzetességeit, mechanizmusát és ezek klinikai jelentőségét tanulmányoztuk. A kérdés vizsgálata többnyire betegekből származó, valós daganatos mintákon történt és lehetőség szerint az észlelt eltérések patológiai és klinikai összefüggéseit is elemezni kívántuk. A kiválasztott területek a kromoszomális és génhibák több aspektusát is felölelik.

Elsőként a cervixrák előállapotának tekinthető prekancerózus állapotokban (SIL) humán papillomavírus fertőzéssel kapcsolatban észlelhető DNS-ploiditás eltérések és azok kromoszomális szintű megfelelőinek precíz vizsgálatát ismertetjük (4.1. fejezet). Különösen azért érdekes ez a kérdés, mert itt a genetikai zavar hátterében konkrét etiológiai tényező (HPV) ismert, a mérési eredmények, genetikai eltérések, szövettani összefüggések könnyen összeilleszthetők.

A továbbiakban a primer tumorokban már észlelt kromoszomális hibákat és funkcionális összefüggéseket vizsgáltunk szolid daganatok korai tumorsejt disszeminációja során (4.2. fejezet). A sejtek azonosítása után az azokban található genetikai eltérés kimutathatósága volt a kérdés, ennek érdekében neuroblasztóma mintákon és csontvelőből vagy perifériás vérből kinyert disszeminált neuroblasztóma sejteken végeztünk összehasonlító vizsgálatokat. E mellett emlőrákos betegek véréből is sikerrel mutattunk ki daganatsejteket, melyek funkcionálisan is eltérő jellegzetességeket mutattak.

A harmadik tárgyalt témakör a kópiaszám eltérésekhez és az aneuploidiához potenciálisan elvezető sejtosztódási zavarok egyes aspektusait elemzi (4.3. fejezet). A mitotikus kinázok deregulációja közvetlen összefüggésben áll a daganatos fenotípussal, kromoszómaszám eltérésekkel, mikronukleusz képződéssel vagy a sejt elpusztulásával. Munkáink során elsősorban az Aurora kináz családba tartozó Aurora B expresszióját, ill. annak hatásait vizsgáltuk emlőrákban és agresszív limfómákban.

4.1. DNS-ploiditás és kromoszomális instabilitás onkogén HPV fertőzéssel összefüggésben cervix citológiai preparátumokban

4.1.1. Cervikális léziók és HPV infekció

A humán papillomavírus (HPV) fertőzés és a cervix prekancerózus állapotainak fennállta között összefüggés az utóbbi évtizedek egy legjelentősebb felfedezése a daganatkutatásban [154;155], melyet nemrég az orvosi Nobel-díj odaítélésével is elismertek [156]. Az onkogén HPV típusok felelnek a hámsejtek sejtciklus szabályozásának zavaráért, a replikációs hibákért, melyek durva genetikai instabilitást eredményeznek a fertőzés elhúzódásával [157]. A vírus asszociált biológiai eltérések sejtmorfológiai szinten is észlelhetők. A klasszikus cervix kenetben a citológus a hámsejtek atípiáját vizsgálja, ami nem elég specifikus és nem is mindig kifejezetten jelentős. A cervix citológiai minták egységes megítélését célzó Bethesda-osztályozásnak megfelelően a squamosus intraepithelialis lézió (SIL) egyértelműen HPV asszociált prémalignus állapot, ami cervixrák kialakulásának lehetőségét jelzi [158] (1. táblázat).

Diagnosis
Normal
Inflammation
Atypical squamous cells of unknown significance (ASCUS) ASCUS favor inflammation/reactive ASCUS favor dysplasia
Atypical glandular cells of unknown significance (AGUS) AGUS favor inflammation/reactive AGUS favor dysplasia
Low-grade squamous intraepithelial lesion Cellular changes consistent with HPV Mild squamous dysplasia
High-grade squamous intraepithelial lesion Moderate squamous dysplasia Severe squamous dysplasia Carcinoma in situ
Squamous cell carcinoma
Adenocarcinoma
Inadequate specimen Satisfactory but limited Unsatisfactory Satisfactory but limited/negative Satisfactory but limited/inflammation Satisfactory but limited/ASCUS

1. táblázat. A Bethesda –rendszer a cervikális citológiai eltérések jellemzésére (forrás: Cleveland Clinic Medical Education honlapja)

A SIL spektrumán belül megkülönböztetünk low-grade (LSIL) és high-grade (HSIL) eltéréseket, az alacsony rizikójú esetek sokkal gyakrabban fejlődnek vissza spontán. Ezért különösen a high-grade elváltozások igénylik a folyamatos követést és további

vizsgálatokat. Ismert, hogy a HPV különböző típusai a cervixrák rizikójával szintén összefüggést mutatnak, ezért a vírus pontos tipizálása a cervixrák diagnosztikájának fontos része. Ezzel szemben vannak a tumorigenezis szempontjából bizonytalanul megítélhető kategóriák is (ASCUS és AGUS).

4.1.2. HPV indukálta genomikus eltérések

A cervix hámban észlelhető, HPV indukálta citológiai eltérések jelentős mértékben a sejtek magjában manifesztálódnak, ahol szinte minden megváltozik a normálishoz képest. A sejtmagok megnagyobbodnak, a kromatin fellazul, de rögössé válhat, esetenként kifejezetten sötét festődésű (diszkariózis) [159]. Mindezek a DNS aktivitása mellett a kromatin mennyiségének a növekedésére utalnak. A citometriai lehetőségek elterjedésével ismertté vált, hogy a cervix dysplasia kapcsán egyes sejtekben jelentős aneuploidia alakul ki, mely az atípusos sejtmag megjelenés egyik fontos oka. A DNS citometria a DNS-hez stöchiometrikusan kötődő festék emittált (fluoreszcens DNS-festék, pl. DAPI, PI) vagy elnyelt fényéből (Feulgen festés) a teljes DNS mennyiségét tudja meghatározni. A DNS eltérések ugyanakkor prekancerózus állapotokban random módon és viszonylag ritkán észlelhetők, ami megfelel a HPV indukálta, multiklonális diszplázia talaján végbe menő soklépcsős kancerogenezis elméletének [160]. Fontos azt is megjegyezni, hogy a HPV valamennyi típusában leírták a vírus poliploidizáló hatását, azaz olyan sejtek képződését, amelyek endomitosis révén a normális genom (2c) egészszámú többszörösét tartalmazzák [161;162;163]. Ez a folyamat önmagában poliploid óriássejtek kialakulásához vezet, melyek DNS tartalma 4c, 8c, esetenként ennél lényegesen magasabb. A hipotézis szerint ezzel párhuzamosan a vírus indukálta kromoszomális instabilitás is fellép (nCIN, sCIN). Ennek eredményeképpen az abnormális, aneuploid sejtek képződése tehát viszonylag egyértelműen a magas rizikójú léziókra jellemző. A vegyes, diszplasztikus sejtpopulációkban az aneuploidia jellemzésére a nem egész számú megtöbbszöröződött DNS-tartalmú óriássejtek (>5c, ill. >9c) használhatók. A >5c vagy >9c DNS tartalmú sejtek ugyanis kifejezett atípiát, óriássejt méreteket vesznek fel, jelenlétük könnyen meg is mérhető. Mindezek alapján akár indikátorként, a vírus indukálta aneuploidia surrogate markereként is alkalmazhatóak hagyományos mérések kapcsán, (pl. Feulgen-festés alapú statikus citometriával). Előfordulásuk azonban ritka, a sejtek nem kezelhetők egy szubpopulációként, megtalálásuk és azonosításuk megfelelő érzékenységű automatizált rendszer alkalmazásával válik igazán hatékonnyá. Az abnormális DNS-tartalom, az ebben

szerepet játszó HPV citopátiás hatás, és a különféle cervikális léziók közötti összefüggések vizsgálatára DNS-tartalom méréseket végeztünk laser scanning citométer segítségével és az eredményeinket a vírus tipizálás adataival, valamint a klinikai kimenetellel is egybe vetettük. Kíváncsiak voltunk továbbá a ritka, de igen magasan aneuploid sejtek kromoszomális összetételére is, ennek érdekében a DNS-méréseket célzott FISH vizsgálatokkal kombináltuk.

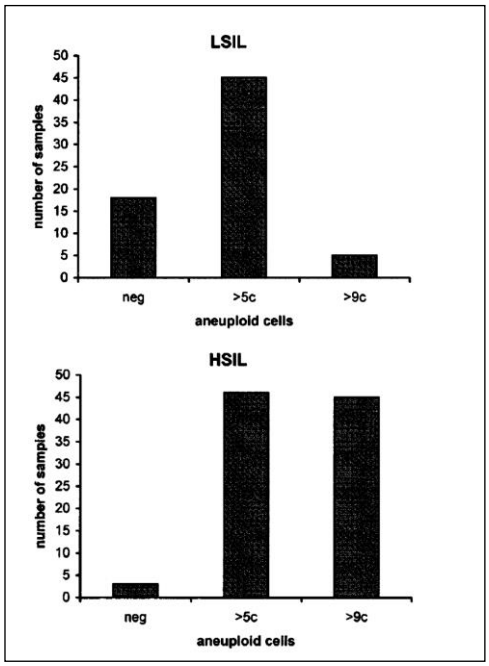
4.1.3. DNS-tartalom eltérések HPV-asszociált cervikális léziókban: a súlyosan aneuploid sejtek (>5c, >9c) kimutatása LSC módszerével

Mivel a fokozódó sejtatípiával az aneuploid sejtek megjelenésének gyakorisága is egyre valószínűbb, első kérdésünk a DNS-tartalom alapján meghatározott aneuploidia foka és a HPV-típusa közötti részletes összefüggésekre irányult a különböző Bethesda kategóriákban. Ennek érdekében a citológiailag definiált léziók folyadékalapú preparátumait (CytoLyt, Cytyc, Boston, USA) DNS-festést követően automatizált rendszerben DNS-tartalom vizsgálatnak vetettük alá LSC módszerrel. A DNS festést propidium jodid (50ug/ml) oldattal végeztük a megfelelő koncentrációjú RNase (200ug/ml) jelenlétében. Legalább 10.000 sejt automatikus scannelése és sejtmag-fluoreszcencia mérése történt preparátumonként. A mérési módszer lehetőséget biztosított a DNS-tartalom és egyés sejtparaméterek (felület, konvexitás, fényelnyelés) diagrammon történő ábrázolására és az egyes értékekhez tartozó sejtek relokalizációjára a készülék mikroszkópjában. A sejt külleme és a diszplázia mértéke így direkt módon meghatározható volt.

Ezzel párhuzamosan a citológiára levett folyadékból DNS izolálást követően (DNA Mini Kit, Quiagen, Hilden, Németország) a HPV genom kimutatására kettős PCR amplifikálást végeztünk a GP5/GP6 ill. a MY09/MY11 konszenzus primer párokkal [164]. A HPV-specifikus és a kontroll béta-globin PCR termékeket 2% agaróz gélen ethidium-bromid festéssel ellenőriztük, majd tisztítási lépés következett (High Pure purification kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország). Az egyirányú szekvenálás a GP5 ill. a MY09 primerekkel, a Big Dye Terminator szekvenáló kit alkalmazásával történt, a szekvencia meghatározást az ABI Prism 310 (Applied Biosystems) készülékkel végeztük. A vírus szekvenciákat a GeneBank adatbank referenciáival összevetve a Blast szoftver (Blast, Pittsboro, USA) segítségével azonosítottuk.

Vizsgálatainkban elsőként a citológiailag a SIL valamelyik kategóriájába egyértelműen besorolható mintákat hasonlítottunk össze, 63 LSIL és 49 HSIL elemzésére került sor. A

preparátumokban az aneuploid sejtek száma viszonylag alacsony volt, >5c sejteket mintánként 1-100, >9c 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 (17. ábra).



17**. ábra**. A >5c és a>9c aneuploid sejtek gyakoriságának megoszlása 63 LSIL és 49 HSIL cervikális lézió esetén.

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 eredményezett egyértelműen magasan aneuploid sejteket. A leggyakoribb onkogén típus, a HPV 16 esetében az >5c illetve a >9c aneuploid sejtek 56,0% ill. 41,7% gyakorisággal jelentkeztek. Az általunk azonosított, ritkábban előforduló, de a szakirodalom által egyértelműen magas rizikójúnak tartott HPV (HPV 18, 31, 33, 45, 66 és 70) fertőzések kapcsán szintén gyakori volt a >5c ill. >9c óriássejtek jelenléte (80,0%, ill. 31,4%). Az ismeretlen onkogén potenciállal rendelkező vírus esetén (6 eset) 50%-ban észleltünk >9c aneuploid sejteket. Az >5c sejtek mennyisége minden esetben meghaladta a >9c sejtek számát, annak akár többszörösével is. Mindezek alapján elmondható, hogy igazán markáns

eltérést a >9c sejtek megjelenése és gyakorisága mutatott a HSIL morfológiával összefüggésben.

Külön tanulmányban foglalkoztunk a Bethesda-osztályozásban elkülönített átmeneti citológiai kategóriával, amit „atypical squamous cells of unknown significance ” néven határoztak meg (rövidítve ASCUS). Ebbe a csoportba a bizonytalan atípusos morfológiai jelekkel rendelkező, de nem negatív citológiai preparátumok kerülnek. Összesen 44 ASCUS mintát megvizsgálva 27%-ban észleltünk onkogén HPV genomot, 7,0%-ban pedig durva aneuploid (>9c) sejteket, valamennyi onkogén HPV pozitív. A vírustipizálás és a DNS-tartalom mérések egyaránt azt mutatták, hogy az ASCUS kategória biológiailag leginkább a békésebb LSIL csoporthoz hasonlít, de a kiegészítő DNS-vizsgálatokkal a progresszív hajlamot mutató esetek jól megközelíthetők.

Egy további elemzéssel a patológiás citológiai eredmény és az aberráns ploiditás hatását részletesen megvizsgáltuk a szöveti progresszió szempontjából. Az előzőekben leírt módon meghatározott HPV-típus és DNS-mérési értékeket a klinikai követés során kapott szövettani adatokkal hasonlítottuk össze. A követés végpontjaként a műtétileg eltávolított cervix konizátumban észlelt eltérések, a cervikális intraepithelialis neoplasia (CIN) szövettani súlyosságának, ill. a manifeszt (microinvazív) cervixrák jelenlétének megállapítását tekintettük (2. táblázat).

	ASCUS			LSIL			HSIL			All Bethesda classes		
Diagnosis	Total	HR-HPV	9c Cells	Total	HR-HPV	9c Cells	Total	HR-HPV	9c Cells	Total	HR-HPV	9c Cells
Returned to normal[b]	41	9	0	34	22	1	1	1	0	76	32	1
No change[b]	0	0	0	4	2	0	3	3	3	7	5	3
CIN I	1	1	1	5	4	1	4	4	4	10	9	6
CIN II	0	0	0	9	9	1	10	9	9	19	18	10
CIN III/CIS	2	2	2	7	7	2	31	30	29	40	39	33
Microinvasive carcinoma	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
Total	44	12	3	59	44	5	51	49	47	154	105	55

ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions; HR-HPV: high-risk human papillomavirus; 9c Cells: cells with nuclear DNA content > 9c; CIN: cervical intraepithelial neoplasia; CIN I–III: Class I–III CIN: CIS: carcinoma in situ.

[a] Individual classes reflect the frequency of high-risk human papillomavirus infection and the occurrence of 9c cells.

[b] Only cytology and human papillomavirus typing without surgery.

2**. táblázat**. A >9c aneuploid sejtek előfordulása cervikális léziókban és összefüggése a szövettanilag igazolt neoplasztikus eltérésekkel

Eredményeinkből - nem meglepő módon - kiderül, hogy a citológiailag véleményezett SIL besorolás és a szövettanilag a későbbiekben kimutatott neoplasztikus hámelváltozás mértéke összefügg. Ezzel párhuzamosan azonban a >9c sejtek előfordulása is 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. Az észleléseket az ellenkező irányból visszaellenőrizve az előbbieket megerősítő tendenciát tapasztaltunk: a progressziót nem mutató (visszafejlődött vagy változatlan) eltérésekben a >9c aneuploidia egyáltalán nem volt jellemző (3/83, 3,61%). Statisztikai elemzéseink azt mutatták, hogy a szövettani CIN grádusok azonosításához a >9c sejtek kimutatása szenzitivitásban alulmarad a morfológiai HSIL ill. az onkogén HPV-típusok igazolásával szemben, a specificitás azonban pontosan megegyezik a citomorfológia által elérhetővel és meghaladja a pusztán a HPV eredményre alapozott értékeket (3. táblázat).

	No. of patients					
	Sensitivity (%)			Specificity (%)		
Parameter	CIN+	CIN II+	CIN III/CIS	CIN+	CIN II+	CIN III/CIS
HSIL	47/71 (69)	43/61 (70.4)	33/42 (78.6)	79/83 (95)	85/93 (91.3)	94/112 (83.9)
LSIL+	68/71 (96)	59/61 (96.7)	40/42 (95.2)	41/83 (49)	42/93 (45.1)	42/112 (37.5)
HR-HPV	68/71 (96)	59/61 (96.7)	41/42 (97.6)	46/83 (55)	47/93 (50.5)	48/112 (42.8)
9c Cells	51/71 (71)	45/61 (73.7)	35/42 (83.3)	79/83 (95)	83/93 (89.2)	92/112 (82.1)

CIN: positive for cervical intraepithelial neoplasia; CIN II, CIN III: Class II and III CIN: CIS: carcinoma in situ; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions; LSIL+: low-grade or greater squamous intraepithelial lesions; HR-HPV: high-risk human papillomavirus; 9c Cells: cells with nuclear DNA content > 9c.
[a] Sensitivity and specificity were calculated for high-grade squamous intraepithelial lesions, low-grade or greater squamous intraepithelial lesions, high-risk human papillomavirus, and 9c cells.

3**. táblázat**. A citomorfológia, a HPV-típus és a >9c aneuploid sejtek gyakorisága a cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN) különböző fokozataiban követéses vizsgálataink során.

A szövettanilag azonosítható neoplázia valamely fokát végpontként tekintve az aneuploid óriássejtek progresszióra vonatkozó pozitív prediktív értéke (PPV) ugyanakkor kifejezetten jobb, mint amit a citológiai vélemény, ill. az onkogén HPV típus külön-külön jelez (4. táblázat).

	PPV (%)		
CIN class	Positive cytology	HR-HPV	9c Cells
CIN I	46.1	64.7	97.4
CIN II	39.6	56.1	81.8
CIN III/CIS	27.2	43.1	63.6

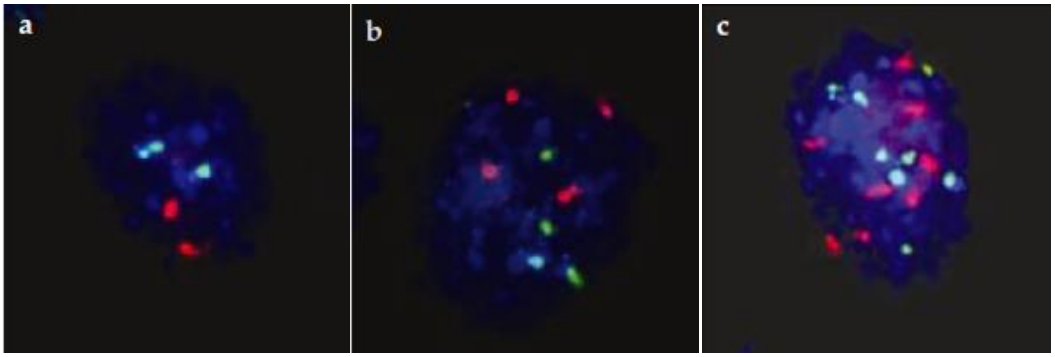
CIN: cervical intraepithelial neoplasia; CIN I–III: Class I–III CIN: CIS: carcinoma in situ.

4. táblázat. Cervikális intraepiteliális neoplázia klinikai fokozatainak predikciója a cervix citológiai preparátum elemzésével (n=154). A >9c aneuploid sejtek statisztikailag számolt pozitív prediktív értéke (positive predictive value, PPV) meghaladja a citológiai SIL diagnózis, ill. a magas rizikójú HPV kimutatás kapcsán jellemzőt.

4.1.4. Kromoszómális instabilitás vizsgálata magas-rizikójú SIL-ben

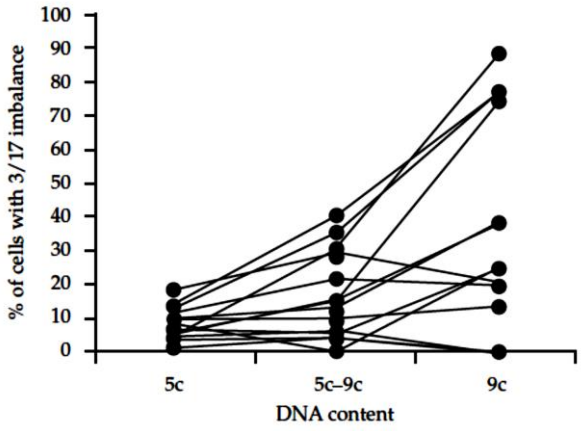
A gyakori aneuploidia és a magasan aneuploid sejtek jelenléte a cervikális léziókban felveti a HPV vírusok okozta kromoszomális, ill. mitotikus instabilitás jelentőségének a kérdését a cervixrák kialakulásában. A korai cervixrákban, ill. előalakokban erre utaló adatok azonban lényegében nem találhatóak az irodalomban. A poliploid ill. aneuploid sejtmagokban a kromoszómák száma és aránya a saját és más mérési eredményeknek megfelelően a normálistól (2 kópia) lényegesen el kell térjen. A korai hámléziókban az eltérések ritkák és random jellegűek, azaz releváns kromoszóma hibát nagy tömegben azonosítani aligha lehetséges. A kromoszómaszintű eltérések sejtenkénti vizsgálata diszplasztikus sejtpopulációkban korábban technikai korlátokba ütközött. A kérdés részletes tanulmányozására a ritka aneuploid sejtek, minor sejtpopulációk azonosítása után az egyes kromoszómák sejtenkénti meghatározásával a FISH módszere kiváló lehetőséget nyújt. Az automatikus DNS-tartalom mérés (LSC készülékkel) ezt a megközelítést különlegesen hatékonyan támogatja, hiszen az egyes kóros hámsejtek – így a jelentős aneuploidiát mutató sejtek is - több ezer nem releváns sejtféle között azonosíthatók és a kiszűrt sejtek visszakereshetők, morfológiailag is megítélhetők. A koordináták tárolásával ugyanazok a sejtek újra értékelhetők. Módszerünk segítségével a DNS-index (DI) alapján kiválasztott aneuploid cervikális hámsejtekben FISH jelöléssel a megcélzott szekvencia kópiákat sejtmagonként meg tudtuk határozni. A teljes genomra, ill. valamennyi kromoszómára vonatkozóan természetesen ilyen vizsgálatok nem történhettek, de két kiválasztott kromoszóma (a 3-as és a 17-es) centromerikus FISH jeleinek száma és egymáshoz való viszonya alapján a kromoszomális instabilitás jelenségét a poliploidizáció során az elsők között sikerült bemutatnunk.

Kísérleteinkben magasan poliploid/aneuploid cervikális sejtekben kerestünk specifikus kromoszóma kópiaszám eltéréseket a HSIL diagnózisú és igazoltan onkogén HPV fertőzött preparátumokban. A hyperdiploid kóros sejteket a 3-as és a 17-es kromoszómára specifikus FISH reakciót követően az LSC mikroszkópjában relokalizálva elemeztük újra. A FISH reakció alfa-satellit DNS próbákkal történt, amelyek a célkromoszómák pericentromerikus régiójához kötődve az illető kromoszóma kópiaszámának meghatározását teszik lehetővé, mégpedig sejtmagonként. Vizsgálatainkban a Vysis cég (Dovers Grove, CA) direkt fluorokrómmal konjugált CEN3 ill. CEN17 DNS-próbáit alakalmaztuk. A specifikus jelek kiértékelése során az egy sejtmagra jutó centroméra kópiaszámok kerültek meghatározásra a kiválasztott abnormis DNS-index-szel (DI) rendelkező sejtek visszakeresése után (18. ábra).



18**. ábra.** Poliploid sejtek azonosítása 3-as és 17-es kromoszóma specifikus alfa-szatellit FISH alkalamzásával. A: diszómia (2 piros és 2 zöld jel) mellett, az aktuális DI=1,03; B: tetraszómia (4/4 jel) (DI=2,64) és C: oktaszómia (8/8 jel)(DI=7,40) gyakran mutatható ki cervikális hámsejtekben.

A piros (3-as kromoszóma) és zöld (17-es kromoszóma) fluoreszcens jelek leolvasása után a poliploid/aneuploid tartományba eső sejtekben a jelek száma alapján különféle kombinációkat kaptunk. Összességében jelentős változásokat, döntően növekedést tapasztaltunk a normális (2n) kópiaszámhoz képest, az eltérések mindkét kromoszóma esetében nagymértékben összefüggtek a mért DNS-tartalommal. A két itt alkalmazott (3-as és a 17-es) centroméra jelölés alapján meghatározott kópiaszám a tapasztalataink szerint általánosságban meglepően jól jellemzi az egyes sejtmagokban fennálló mennyiségi DNS változásokat és a DNS-index-szel a kópiaszám jól korrelált ($p<0,05$). Ugyanakkor a két kromoszóma kópiaszám eltérései sokszor nem párhuzamosan változtak és gyakran kaptunk a normális többszörösétől eltérő, egyértelmű aneuszómiára utaló értékeket.

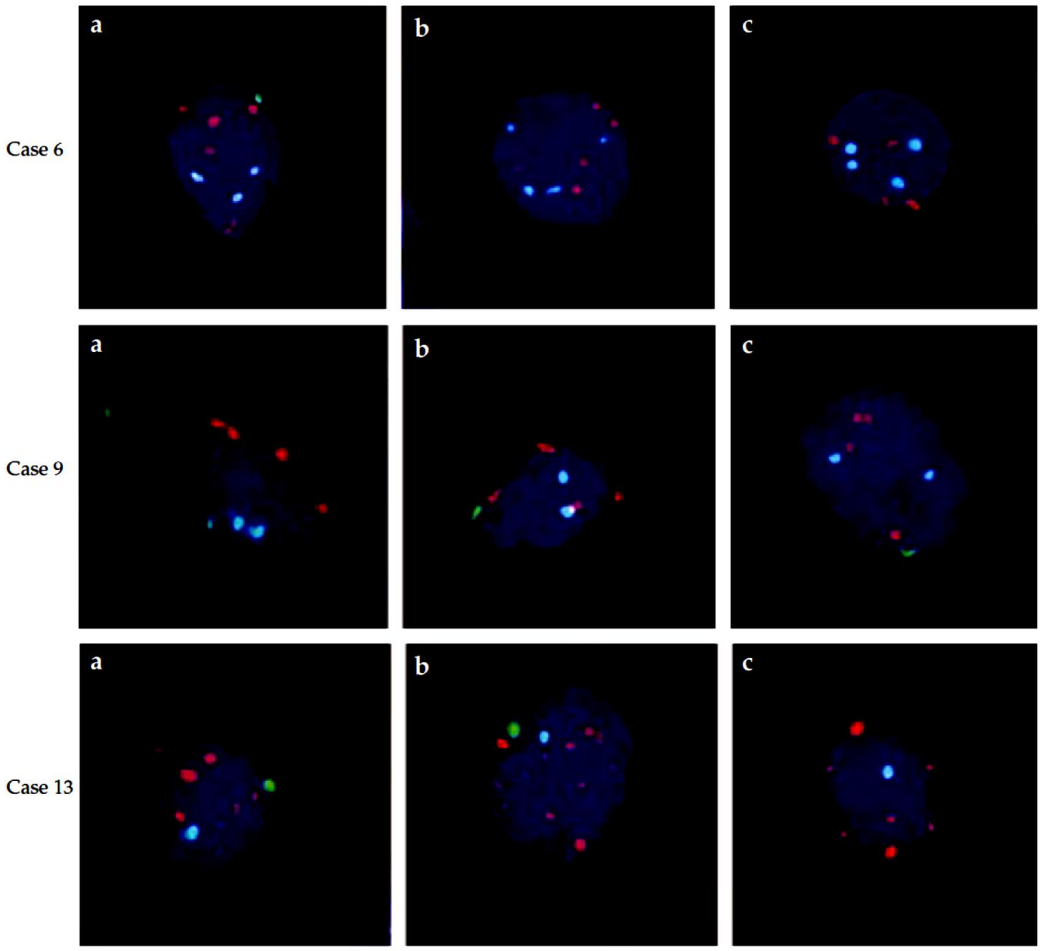


19**. ábra**. A tényleges 3-as vagy a 17-es kromoszóma kópiaszám eltérést mutató sejtek arányának változása a DNS-tartalom függvényében. A CEN3/17 egyensúly felborulása (imbalance) a fokozódó genetikai instabilitás jeleként értelmezhető a poliploid/aneuploid HSIL esetekben. Az egyes preparátumokban észlelt, összetartozó értékek vonallal vannak összekötve.

A DNS-ploidia fokozódásával ráadásul nem csak a kópiaszám emelkedett, hanem a két kromoszóma kiegyensúlyozott aránya is egyre inkább eltolódott, helyette jelentős aránytalanságok jelentkeztek, melyeket a kromoszomális instabilitás (imbalance) mértékeként interpretáltunk (19. ábra).

Ezzel párhuzamosan a kromoszómák számának és arányának az eloszlása a DNS-tartalom fokozódásával egyre szélesebb skálán mozgott, azaz egy mintán belül a 3-as és 17-es jelek sejtenkénti aránya változatos lett, ami megfigyeléseink szerint spontán, egyedi kópiaszám kombinációkhoz vezetett. A magasan aneuploid cervikális hámsejtekben látszólag rendezetlen kromoszóma arányok mellett a részletes FISH vizsgálat ugyanakkor azt mutatta, hogy bizonyos fixált kromoszóma aránypárok (piros/zöld imbalance értékek) a véletlen statisztikai valószínűséget messze meghaladva fordultak elő. A tanulmány keretében FISH-sel részletesen megvizsgált 13 HSIL közül három esetben (23,1%) a DNS-tartalom alapján kiszűrt >9c aneuploid sejtek jelentős részében (>50%) ugyanaz az aberráns 3-as és 17-es kromoszómaszám volt észlelhető (20. ábra).

A lényegében fixált arányú 3-as és 17-es aneuszómiát mutató sejtek ilyen magas aránya random képződési mechanizmusokkal már nem magyarázható. A jelenség sokkal inkább arra utal, hogy a HSIL itt kiszűrt eseteiben a HPV fertőzött patológiás hámsejtek kromoszomális eltérései részben klonálisak, és párhuzamosan vannak jelen a spontán kialakuló aberrációkkal. A kromoszomális szinten tapasztalható klonalitás minden valószínűség szerint fixáltan hibás sejtek proliferációjára, azaz progresszióra utal. A kis esetszámú vizsgálatunkban kiszűrt betegek (3/13) közül kettő perzisztáló onkogén (magas rizikójú) HPV-fertőzés mellett a klinikai követés során később CINI ill. CINIII szövettani eltérést mutatott, ami a transzformációs hajlamot alátámasztja. A harmadik, FISH eredmény alapján klonálisnak interpretált esethez viszont sajnos nem állt rendelkezésre további adat a betegség kimeneteléről.



20**. ábra**. Visszatérő, rögzült kromoszómális kópiaeltérések FISH képe HSIL citológiai preparátumokban azonosított >9c aneuploid sejtekben. A 3-as kromoszóma pericentromerikus régiója piros, a 17-es kromoszóma zöld fluoreszcenciával van jelölve, a sejtmag DNS kék (DAPI) színben látható. Esetenként legalább 3 sejt ugyanazzal a jel-kombinációval volt kimutatható (case 6: 4/5; case 9: 3/4; case 13: 4-14/2). A 13-as esetben (legalsó sor) feltehetően a 3-as kromoszóma pericentromerikus régiójának többszörös törése és amplifikációja (chromoanagenesis) vezethetett a jelek számának igen masszív felszaporodásához.

4.2. Disszeminált daganatsejtek azonosítása és jellemzése genetikai és immunmarkerek alapján

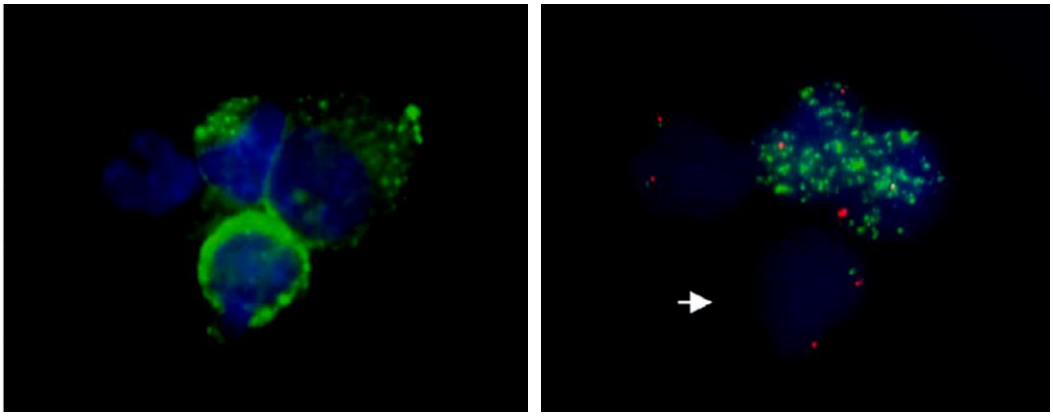
4.2.1. Neuroblastoma sejtek csontvelői disszeminációjának vizsgálata

A neuroblastomában már a 80-as években kimutatásra került a csontvelői disszemináció klinikai prognosztikai jelentősége. A betegség stádiummeghatározásához a nemzetközileg elfogadott rendszer (International Neuroblastoma Staging System, INSS) a csontvelővizsgálatot szükségesnek ítéli, az ajánlás azonban a hagyományos mikroszkópos vizsgálatok (Giemsa-festett csontvelő kenet) szintjét praktikus okokból nem lépi túl [165]. Így a daganatsejtek nem elhanyagolható része elkerüli az azonosítást és nem derül fény korai disszemináció, az izoláltan előforduló sejtek klinikai jelentőségére sem. Ennek áthidalására előtérbe került a sejtek immuncitokémiai kimutatása [166;167;168], mely gyorsan elterjedt, de a specificitás tekintetében jelentős kritikák is megfogalmazódtak. Sajnos a daganatot általánosságban jellemző biológiai vagy genetikai eltérésekről máig sem tudunk, a folyamat heterogén. A gyakoribb specifikus kromoszómahibák ugyanakkor viszonylag egyediek és önmagukban nem alkalmasak a célsejtek molekuláris azonosítására [169;170]. FISH vizsgálattal kimutatható gyakoribb eltérések közé neuroblastomában az NMYC onkogén kópiaszám változása (génamplifikáció), az 1p36 kromoszóma régió deléciója és a 17q kromoszómakar megtöbbszöröződése (gain) tartozik [171;172;173;174]. Mindhárom esetben kromoszomális szegmentális kópiaszám eltérésről van szó, amely hagyományos FISH módszerrel, a célrégióra és egy referencia régióra specifikus DNS-próba alkalmazásával megvizsgálható.

Az immunpozitív sejtek a csontvelő vagy vér preparátumaiban megfelelő apparátussal (automatizált mikroszkóppal) célzottan kikereshetők, sőt, a daganatra leginkább jellemző genetikai jellegzetességek és azok összetétele is követhető. Mindehhez a FISH módszere kiváló lehetőséget biztosít, a primer tumorban észlelt eltérések az immunpozitivitás specificitását is jelentősen növelni tudja. Célkitűzésünk az volt, hogy az AIPF metodikát alkalmazva a vérből vagy a csontvelő sejtszuszpenzióból izolált mononukleáris frakcióból standardizált körülmények között minél nagyobb számú (ideálisan 1 millió) sejtet megvizsgáljunk és a daganatsejtek számát a lehető legmagasabb szenzitivitás és specificitás mellett meghatározzunk. A molekuláris citogenetikai elemzéssel a tumorsejtek genetikai heterogenitását és esetleges szelekciós dinamikáját is meg kívántuk vizsgálni. Ehhez a német MetaSystems vállalkozással közösen egy automatizált képanalízisen alapuló

sejtazonosító eljárást fejlesztettünk ki, melyhez a sejtek immunfluoreszcens megjelenése nyújtotta a támpontot.

A neuroblasztóma sejtek kimutatásának kulcsa vizsgálatainkban is a megfelelő specificitással rendelkező immunmarker. Neuroblastoma sejtek esetében régóta ismert és elismert sejtfelszíni marker a gangliozidok családjába tartozó glikolipid GD2 molekula, ami a tumorsejtek felszínén nagy denzitással helyezkedik el [175;176]. A daganat azonosítása szempontjából ideális antigén és kiválóan detektálható specifikus monoklonális antitestekkel [177;178]. Egyetlen hátránya azonban pont az expresszió viszonylag magas mértékéből adódik: a GD2 a lebomló tumorsejtekből a makrofágokba kerül fagocitózissal, ahol a lebontása igen lassú. Ennek eredményeként a mononukleáris sejtfrakcióban esetenként GD2+ makrofágok jelenhetnek meg (transloading), ami a reakció specificitását rontja. Különösen igaz ez kemoterápia után, amikor a daganattömeg pusztulásával párhuzamosan a lebomlás és a fagocitózis fokozott. A GD2+ makrofágok ugyanakkor morfológiailag jól felismerhetők és természetesen genetikai eltérésekkel sem rendelkeznek (21. ábra).



21**. ábra**. GD2 immunfluoreszcencia (balra) és NMYC FISH vizsgálat (jobbra) izolált neuroblastoma sejtek azonosítására. Az erősen regresszív morfológiát mutató sejtcsoport három tagja (a bal oldali granulocitát leszámítva) egyértelműen, de változatos mértékben gangliozid-GD2 pozitív. A tumorsejtek jellemzésére elvégzett FISH a két felső sejtmagban kifejezett NMYC génamplifikációt jelez (kb. 50x zöld jel/2 piros jel), míg a csoport másik két tagjánál a FISH jelek aránya normális (2 zöld/2 piros jel). A csoport legalsó sejtje (nyíl) NMYC amplifikáció hiányában nem tekinthető tumoros neuroblasztnak, a makrofágok esetén gyakrabban tapasztalt „transloading"jelenségét mutatja.

A csontvelő aspirátumból származó mononuclearis frakciót Ficoll-Hypaque izolálás és megszámlálás után tárgylemezre centrifugáltuk (Hettich 16 citocentrifuga) úgy, hogy preparátumonként 10^6 sejt legyen jelen. A sejteket anti-GD2 antitesttel (mab 14.18 klón, R.A. Reisfeld, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) reagáltattuk, majd indirekt

immunfluoreszcencia (anti-egér-FITC) módszerével a kötődést detektáltuk. Sejtmagfestésként DAPI/antifade (Vectashield, Vector, CA) oldatot használtunk. Az immunfluoreszcencia kiszűrésére automatizált mikroszkópos képanalízis rendszert használtunk (Metafer4/RCDetect, MetaSystems GmbH, Altlussheim, Németország), melynek segítségével az immunpozitív sejtek előre kialakított algoritmus szerint kerültek kiválasztásra és digitális rögzítésre. A sejtek koordinátái alapján az egyes alakok később visszakereshetők voltak, így az alkalmazott FISH reakciót célzottan az immunpozitív sejteken értékeltük. Az NMYC (08-103-1), az 1p36 (D1Z2/D1Z1) és a 17q (411G7/22G12) FISH próbák a bécsi CCRI, St. Anna Kinderspital Tumor Citogenetikai Laboratóriumában készültek és kerültek jelölésre, a BAC klónok eredetileg Dr. Mariano Rocchi (Dipartimento di Biologia, University of Bari, Olaszország) laboratóriumából származtak.

A kidolgozott AIPF kombináció segítségével igazoltuk a korábbi felvetéseket, miszerint lokalizált neuroblastomában is az esetek jelentős részében kimutatható csontvelői daganatsejt disszemináció. A végeredményt kontrollált körülmények között megvizsgált 10^6 csontvelőből izolált sejtre vonatkozóan állapítottuk meg. A GD2 immunpozitivitás morfológiai vizsgálata kapcsán némi korrekcióra volt lehetőség, mert az immunpozitív sejtek nem jelentéktelen része lebomló alakot, fagocita álpozitivitást jelentett. Ennek kizárása után 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 követéses vizsgálatok alkalmával, amikor az automatizált AIPF keresés 50,0%-os találati rátája mellett a hagyományos citológia csupán 12,8%-ban állapított meg maradvány csontvelőérintettséget ($p<0,05$). Az összesen 198 neuroblasztómás beteg csontvelőmintájára kiterjedő vizsgálatunkban 94 esetén (47,5%) kevesebb, mint $100/10^6$ (azaz 0,01%) daganatsejtet azonosítottunk, ami a megközelítés igen érzékeny jellegét jól tükrözi.

Az ismert genetikai eltérések vizsgálata disszeminált neuroblasztóma sejtekben lényegében minden immunpozitív esetben lehetséges volt. Az AIPF metodika során végzett FISH reakció minősége természetesen esetenként változatosságot mutatott és hibaként előfordult, hogy egyes GD2+ sejtek a tárgylemezről hiányoztak (lesodródtak vagy letörlődtek). A rendszerszerűen megvizsgált három leggyakoribb genetikai eltérés (NMYC, 1p36 és 17q) szempontjából a hibalehetőségek kizárása után lényeges heterogenitást a szóródott neuroblaszt sejtek között egyetlen mintán belül nem találtunk. NMYC génamplifikáció

esetén a csontvelői disszeminált tumorsejtek teljes egésze amplifikáltnak, ennek mértéke állandónak bizonyult és a kópiaszám tekintetében megegyezett a primer tumorban észlelttel. Hasonlóképpen stabil eltéréseket észleltünk 17q gain és 1p36 deléció esetén is. Egyedül a megvizsgált kromoszómák száma tekintetében voltak kimutatható különbségek, a tumorban fennálló aneuszómia (elsősorban a gyakran megjelenő triszómia) azonban tendenciaszerűen jelen volt a disszeminált daganatsejtekben. Az egyes kromoszómák kópiaszámának változatossága azonban az alapvető strukturális aberrációk jelenlétét nem befolyásolta. Az AIPF metodikával kapott eredményeink arra utalnak, hogy a disszeminációban részt vevő neuroblasztómás klónok a manifeszt daganatból származnak, a tumor fő tömegével lényegében azonos genetikai háttérrel rendelkeznek. A kérdést megfordítva kijelenthető, hogy a megvizsgált kromoszomális eltérések az invázió és tumorsejt szóródás folyamatát megelőzően, stabil klonális jellegzetességként jönnek létre a daganatban. Így a primer tumorból kimutatott egyedi citogenetikai eltérések tehát megbízható markernek is tekinthetők a tumoros érintettség igazolására a betegség klinikai követése során.

4.2.2. Keringő daganatsejtek funkcionális állapotának vizsgálata AIPF metodikával

A keringésbe jutott daganatsejtek disszeminációja a kísérletes és klinikai tanulmányok alapján nem minden esetben függ össze közvetlenül a folyamat progressziójával és a kedvezőtlen kimenetellel. Minél érzékenyebb módszert alkalmazunk a terjedés kimutatására, annál kevésbé nyilvánvaló a pozitív észlelés konkrét hatása a beteg sorsára. Elméletileg proliferációra nem képes, apoptotikus sejtek is hozzájárulhatnak a vizsgálati mintában immunológiai vagy molekuláris módszerekkel észlelt pozitivitáshoz, különösen, mivel a sejthalál részeként ezek a sejtek a környezetükből kiválnak, megváltozik az adhéziós kapcsolatrendszerük. Ennek fordítottjaként a matrix-szal való kapcsolat lazulása triggerelhet apoptotikus útvonalakat (anoikis), ami az izolált tumorsejtek pusztulását jelenti. A tumorsejtek pusztulására és a makrofágok általi eltakarítására vonatkozó jeleket a korábban ismertetett neuroblasztómás tanulmányainkban ugyanúgy észleltük, mint emlőkarcinómás vizsgálatainkban is. Megelőző vizsgálataink során világossá vált, hogy a daganatsejt disszemináció és a sejthalál általános összefüggéseinek tisztázása tovább segíti a ritka keringő tumorsejtek jelentőségének és potenciáljának megértését.

Ennek érdekében perifériás vérmintákban a keringő emlőrák sejtek automatizált immunfluoreszcens azonosítása után a sejthalálra utaló morfológiai és biokémiai jeleket kerestük. Az emlőrák sejteket 10 ml EDTA alvadásgátolt vér mononukleáris frakciójában

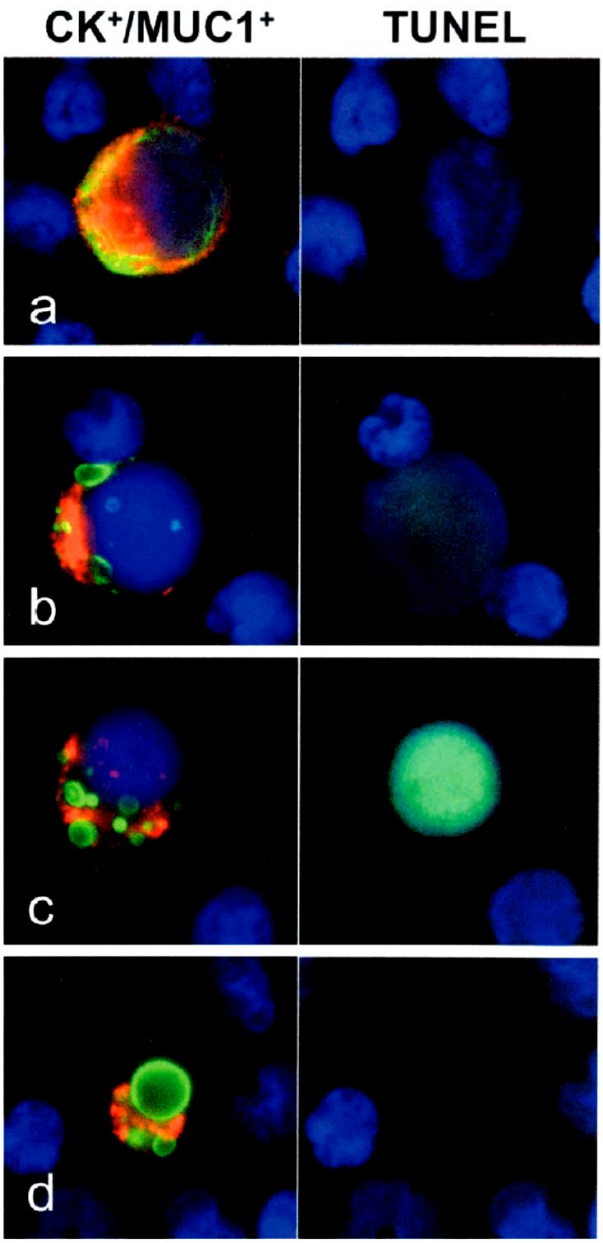
azonosítottunk citocentrifugálás után kettős immunfluoreszcenciával. A jellemző immunprofilnak a cytokeratin és MUC1 epiteliális mucin kettős expressziót tekintettük az MNF116 (DAKO, Glostrup, Dánia) és a BM2 (Medac Diagnostika, Vienna, Ausztria) antitestek és FITC valamint Cy3 konjugált másodlagos antitestek alkalmazása után. A ko-expressziót mutató sejteket 10^6 mononukleáris vérsejtet tartalmazó citospin preparátumokban a korábban már ismertetett automatizált mikroszkópios képanalízis (RCDetect) segítségével azonosítottuk és elemeztük tovább.

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 (5. táblázat).

Patient	Cells analyzed ($\times 10^6$)	Peripheral blood findings	
		Intact $CK^+/MUC1^+$	Apoptotic $CK^+/MUC1^+$
1	1.00	0	0
2	1.50	0	0
3	1.75	0	0
4	0.45	0	0
5	0.70	0	0
6	0.65	0	0
7	0.55	0	0
8	2.40	0	0
9	0.34	0	0
10	2.53	0	0
11	1.60	0	0
12	1.72	0	1
13	0.86	0	2
14	1.91	0	2
15	2.50	1	5
16	0.42	1	8
17	0.46	6	32
18	0.66	21	34
19	0.10	102	24

5**. táblázat**. Keringő daganatsejtek gyakorisága és funkcionális állapota emlőkarcinomás betegek perifériás vérének automatizált mikroszkópos vizsgálata során. A betegenként változó mennyiségű mononukleáris sejtfrakcióból CK/MUC1 kettős immunfluoreszcencia detektálásával átlagosan $1/10^6$ érzékenységgel lehetett a pozitív eseményeket kimutatni. Az apoptotikus fenotípust a citokeratin fragmentáció és a TUNEL-pozitivitás jelezte.

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. Ezek a sejtek progresszív jellegű citoplazmikus és sejtmag eltéréseket mutattak (22. ábra). Leginkább a fluoreszcensen feltüntetett citokeratin (CK) filament hálózat átalakulása volt feltűnő, a citoszkeletális váz fokozatos lefűződései, hólyagos átalakulása a sejt zsugorodásával, a sejtmag piknózisával, fragmentációjával és egyes esetekben eltűnésével párhuzamosan egyre nagyobb mértékben volt jellemző, míg a



22**. ábra**. A perifériás vérben azonosított keringő emlőkarcinoma sejtek megjelenése kettős (CK -zöld/MUC1 – piros színű) immunfluoreszcenciával. A normális citokeratin mintázat (a) jelentős változásával párhuzamosan a sejtmagban kettőssláncú DNS-törések mutathatók ki (TUNEL), mely ugyanazon sejtekben automatizált relokalizációt követően megítélhető (b-d). A b és c képen a citokeratin filamentumrendszer fokozatos fragmentációját, lefűződéseit a sejtmagban észlelhető TUNEL reakció intenzitásának fokozódása követi. A (d) jelölésű felvételeken az apoptosis végállapota látható citoplazma és a sejtmembrán maradványokkal, jobboldalon a sejtmag lebomlása és kilökődése után sem sejtmag anyag, sem TUNEL reakció nincs jelen.

sejtfelszíni MUC1 expresszió viszonylag változatlan maradt. Az észlelt eltérések tökéletesen megfeleltek az apoptosisban várható morfológiai jelenségeknek. A sejtpusztulás folyamatának biokémiai igazolására a DNS-nukleoszóma töréseket *in situ* kimutató TdT-

deoxyuridin nick end labeling (TUNEL) reakciót alkalmaztuk az immunfluoreszcencia detektálása után ugyanazokon a sejteken A TUNEL módszert a BioVision (San Francisco, CA) reagenskitje segítségével végeztük. A reakció az apoptotikus folyamat jellegzetes biokémiai eseményének, a nukleoszomális hasításnak a kimutatására szolgál, lényege az apoptotikus kromatinhasítás következtében felszabaduló DNS-törvégek enzimatikus jelölése fluoreszcens detektálás céljából [179]. A TUNEL a FISH reakciókkal megegyező módon kiválóan működik az immunfluoreszcenciával felismert és kiválasztott sejteken és a sejtmag kromatin jellegzetes FITC-jelölődése az apoptotikus sejteket a korábbi immunfluoreszcenciától függetlenül azonosítja. Mintáinkban a TUNEL reakció a kettős immunpozitív tumorsejtek mikroszkópban való repozicionálása után tökéletesen igazolta, hogy az aberráns, apoptotikus CK mintázattal párhuzamosan DNS-kettőstörések is jelen vannak a sejtmagban (22. ábra). A viszonylag kisszámú megvizsgált vérminta alapján is megállapítható volt, hogy az apoptotikus tumorsejtek többségben lehetnek az intakthoz képest sőt, 3/19 (15,8%) esetben kizárólag apoptotikus sejteket azonosítottunk átlagosan 10^6 vérsejt vizsgálata során (5. táblázat).

4.3. A sejtosztódás szabályozási zavarainak szerepe a kromoszomális instabilitás és a genetikai heterogenitás létrejöttében

4.3.1. A mitotikus szabályozás és az Aurora kinázok vizsgálata szöveti körülmények között

Míg a szegmentális, szerkezeti eltérések a sejt fennmaradása esetén a szokványos mitotikus apparátus igénybevételével továbbadódnak, a számbeli kromoszóma eltérések kialakulásához, fennmaradásához a mitotikus szabályozási folyamat hibás működése nagymértékben hozzájárul. Valójában alig képzelhető el durva numerikus kromoszóma eltérés (aneuploidia) a sejtosztódási program átalakulása nélkül. Ilyen hatásuk van többek között bizonyos vírusoknak, így a munkáinkban korábban már elemzett perzisztáló HPV fertőzésnek is (1.3.7. fejezet). A kromoszómaszegregációs, szeparációs hibák mértéke olyan súlyossá válhat a sejtosztódás során, hogy az a sejt fennmaradásával összeegyeztethetetlen, ilyenkor „mitotikus katasztrófa" bekövetkeztéről beszélünk [180;181]. Egyes jól ismert sejtmérgek kísérletes körülmények között kiváltják ezt a hatást, de pl. a mikrotubulus/kinetochora rendszer bénításán alapul az antitumor kezelések egy része is (pl. vincristin, nocodazol, paclitaxel).

Az aneuploidia kialakulásának egyik jelentős mechanizmusa a mitotikus kinázok működésének deregulációja (1.3.2. fejezet). Míg az Aurora A szerepéről viszonylag egységes kép alakult ki a szakirodalomban, az Aurora B kináz deregulációjának megítélése máig nem egyértelmű. A jelentős genetikai eltérések között nem tesznek említést az AURKB gén mutációiról, vagy egyéb érintettségéről, a kináz expresszió hátterében amplifikációt - az AURKA génnel (20q13 kromoszóma lókusz) ellentétben - nem mutattak ki. Ugyanakkor az Aurora A expresszió sem tökéletesen korrelált az aneuploid állapottal és a kedvezőtlen prognózissal. Mindez az Aurora B fehérje expressziójának és az AURKB génlókusz, valamint környezetének részletesebb vizsgálatát, szövettani relációinak megismerését indokolta. Munkáink során ezért több tumor típusban az Aurora B kináz expresszió és az AURKB lókusz eltéréseire, valamint a ploidia változására összpontosítottunk, továbbra is immunhisztokémiai és FISH metodikákkal. Az AURKB lókusz ugyanakkor érdekes módon a TP53 génhez igen közel helyezkedik el, így vizsgálataink során a két kromoszóma lókusz genetikai eltéréseit együttesen is elemeztük emlőkarcinoma és agresszív limfóma esetekben.

4.3.2. A sejtciklus és a relatív Aurora B kináz expresszió

Az Aurora B a mitotikus kinázokhoz hasonlóan a G2 fázisban expresszálódik, a fehérje immunhisztokémiai vizsgálata során tehát nyilvánvalóan a proliferáló tumorsejtek csupán a sejtciklus vége felé adnak pozitív reakciót. Abból indultunk ki, hogy 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 expresszálódó fehérjék mennyisége nem lehet független a teljes proliferációs frakció mértékétől. A sejtciklusban lévő sejtek kimutatására széles körben elterjedt módszer a Ki67 fehérje vizsgálata immunhisztokémia módszerével [182;183]. Erre leggyakrabban a specifikusan kötődő Mib1 antitest klónt használják (Dako, Glostrup, Dánia), a klón elnevezése ezért a gyakrolatban a Ki67 fehérjeexpresszió szinonim elnevezésévé vált (Mib1 pozitivitás). A Ki67 sejtmagban való expresszió a korai G1 fázis kivételével a teljes sejtciklusra jellemző és mértéke lényegében független a sejtciklus fázisaitól [184]. A fehérje a sejtosztódás során kialakuló kompakt kromatinállományhoz kötődve kifejezett denzitás fokozódást mutat, így a mitotikus alakok morfológiailag is felismerhetők. A Ki67 expresszió mértékét a teljes sejtpopulációhoz viszonyítva, százalékban szokás megadni (Ki67 index, Mib1 index), ami a gyakorlatban egyszerűen alkalmazható és széles körben elterjedt, kiemelkedően fontos szövettani paraméter.

Az Aurora B kináz fehérje jelenlétének vizsgálata szöveti körülmények között a Ki67-hez hasonlóan specifikus antitest segítségével történik, ami szövetekben tehát a G2 és M-fázisban lévő sejteket jelöli, mértéke százalékban meghatározva logikus módon töredéke a Ki67 expresszióval jellemzett teljes sejtciklusnak. Vizsgálatainkban az Aurora B meghatározásához többféle kísérlet után legmegfelelőbbnek az Abcam (Cambridge, UK) által forgalmazott poliklonális nyúl anti-humán primer antitest bizonyult.

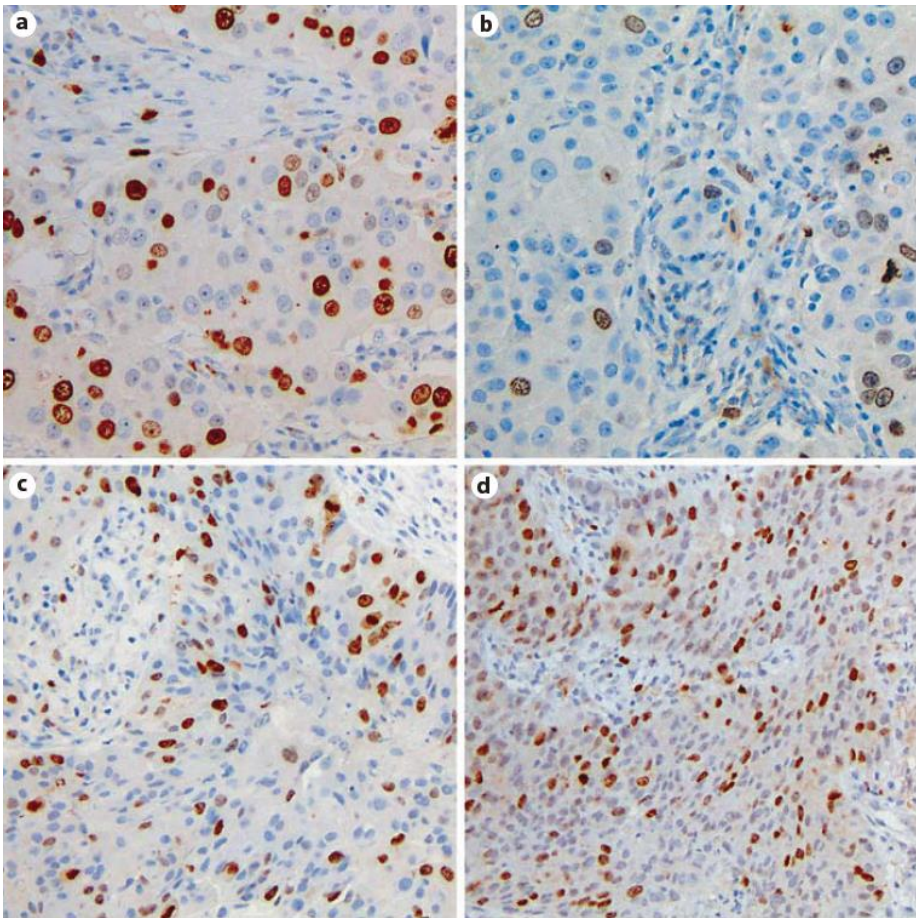
Immunhisztokémiai tanulmányainkban a fentiekben vázolt összehasonlításban kísérletük megvizsgálni az Aurora B és a Ki67 fehérjék expresszióját és egymáshoz való viszonyát. Olyan relatív expresszió meghatározást alkalmaztunk, amely a tényleges AuB expressziót (sejtek %-a) a Ki67 (Mib1) markerrel meghatározott proliferációs frakció mértékéhez (sejtek %-a) viszonyítja a daganatos szövet metszeteiben. Az AuB/Mib1 (AMI) index tehát egy relatív mérőszám, ami a sejtciklusban lévő sejtekhez viszonyítva adja meg az AuB expresszió mértékét egy adott mintában. Szokványos sejtproliferáció esetén a G2/M-fázis a teljes sejtciklus viszonylag kis részét teszi ki. Normálisan proliferáló sejtvonalak immunfluoreszcens és szövettani tanulmányozása, valamint áramláscitometriás mérések alapján meghatározztható volt, hogy kiegyensúlyozott körülmények között, intenzíven

proliferáló sejtpopulációkban a G2+M frakció mértéke nem haladja meg a 25%-ot. Nagyobb értékekkel csak a G2/M fázis blokkolása, ill. a szabályozás súlyos deregulációja kapcsán lehet számolni. Ennek megfelelően az AMI normális küszöbértéket a szövettani kiértékeléshez 0,3 értéknél határoztuk meg. E fölötti relatív AuB expressziót mindenképpen emelkedettnek tekinthetjük, azaz overexpresszióról beszélhetünk.

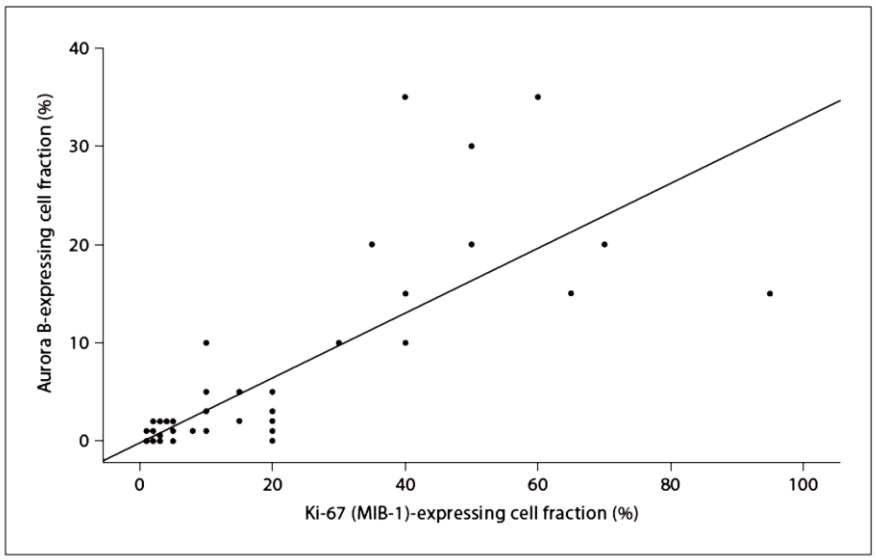
Tanulmányunkban összesen 50 invazív emlőrák vizsgálatát végeztük el (45 duktális invazív, 5 lobuláris invazív karcinóma), a mintákhoz a releváns szövettani és klinikai adatokat is rendeltünk. A biológiai prognosztikai adatok közül kiemelten kezeltük a daganat szteroid receptor és Her-2 státuszát, az utóbbi immunhisztokémiával, ill. FISH módszerrel is meghatározásra került laboratóriumunkban (PathVision Her-2 FISH probe kit, Vysis/Abbott Laboratories, Dovners Grove, USA). A Her-2 státusz 13/50 esetben (26,0%) bizonyult pozitívnak (immunpozitivitás és génlókusz amplifikáció).

Az emlőtumoros szövetminták metszeteit a sejtproliferáció kimutatására a Ki67 fehérje elleni antitesttel (clone MIB-1, Dako, Glostrup, Dánia), illetve anti-humán Aurora B elleni antitesttel (AbCam, Cambridge, UK) jelöltük és ezt a rutinszerűen használt peroxidáz/DAB alapú előhívó rendszerrel (Envision ChemMate, Dako) tettük láthatóvá (23. ábra). Az immunpozitív sejteket a teljes tumorsejt tömeg viszonylatában szemikvantitatív módon, digitális metszetszkennelést követően (Pannoramic, 3DHistech, Budapest) a képernyőn határoztuk meg.

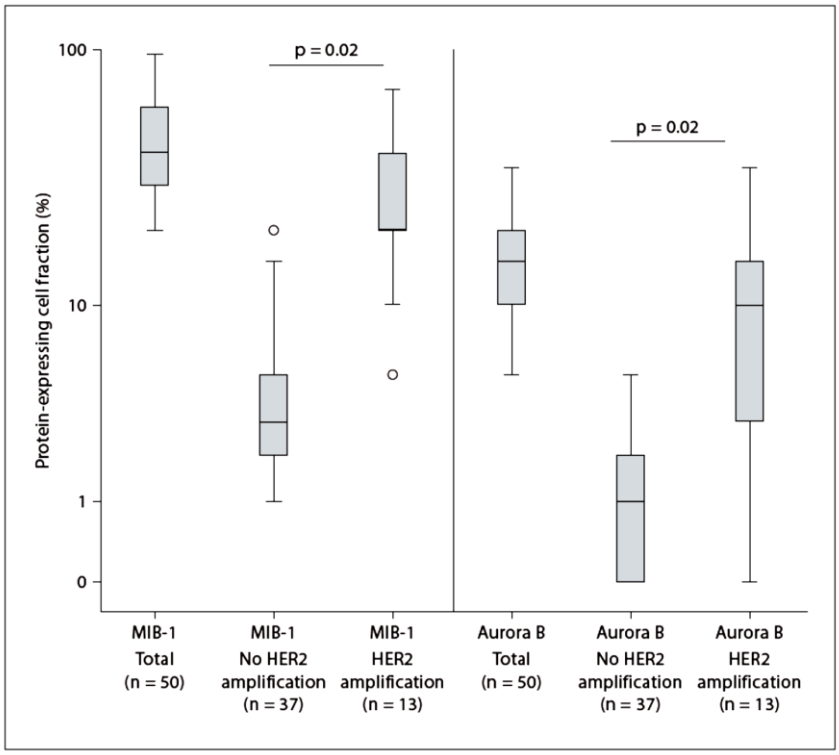
A kiértékelés után a sejtproliferáció mértéke és az AuB expressziója között viszonylag szoros lineáris korrelációt találtunk ($r=0,77$), az egyes szövetmintákban azonban nagyon eltérő értékeket kaptunk (1-95% vs 1-35%) (24. ábra). A Her-2 státusz függvényében tovább elemezve, mind a Mib-1, mind az AuB 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 (25. ábra).



***23*. ábra.** Mib1 (a; c) és AuB (b; d) immunhisztokémiai kimutatása két eltérő biológiájú emlőkarcinoma szövettani metszetein (40x eredeti nagyítás). Az egyik esetben (felső sor, a és b panel) az AuB és Mib1 hányadosa (AMI) az immunpozitív sejtmagok megszámolása után 0,25 (nem emelkedett), a másik esetben (alsó sor, c és d panel) a két jelölődés mértéke közel azonos (AMI=0,88).



***24*. ábra**. Az Aurora B és a Mib-1 fehérje expresszió összefüggése emlőkarcinomában (n=50). A lineáris kapcsolat a sejtfrakciók szemikvantitatív meghatározása ellenére statisztikailag erősnek bizonyult (r=0.77)



***25*. ábra**. Mib-1 és AuB expresszió emlőkarcinomában a Her-2 státusz függvényében. A Her-2 amplifikált esetekben a Mib-1 és az AuB expresszió is szignifikánsan magasabbnak bizonyult.

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±0,28SD). Sejtciklus analízis adatokra támaszkodva a normális AMI küszöbértékét 0,3-nál meghatározva az általunk megvizsgált emlőkarcinomák közül 20/50 esetben (40,0%) lehetett ilyen módon 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).

A továbbiakban az Aurora B fehérjeexpresszió adatait a 17-es kromoszómán megvizsgált releváns régiók (AURKB, TP53, CEN17) kópiaszámával vetettük össze. A szakirodalomban a 17-es kromoszóma az egyik leggyakrabban érintett (aneusom) kromoszómaként szerepel. A rendelkezésre álló FISH eredményeket ezért abból a szempontból is elemeztük, hogy az AuB expresszió és a 17-es aneuszómia mutat-e statisztikai összefüggéseket.

További izgalmas szempont, hogy az Aurora B fehérje génje (AURKB) a 17-es kromoszóma rövidkarján a 17p13 lókuszban található, ami egyben a mintegy 4 MB közelségre lévő TP53 gén lokalizációja is. Ez a lókusz közismert a gyakori érintettségről (törések, vesztések). A 17p13-ban elhelyezkedő két, FISH próbával megkülönböztethető génlókusz (TP53, AURKB)

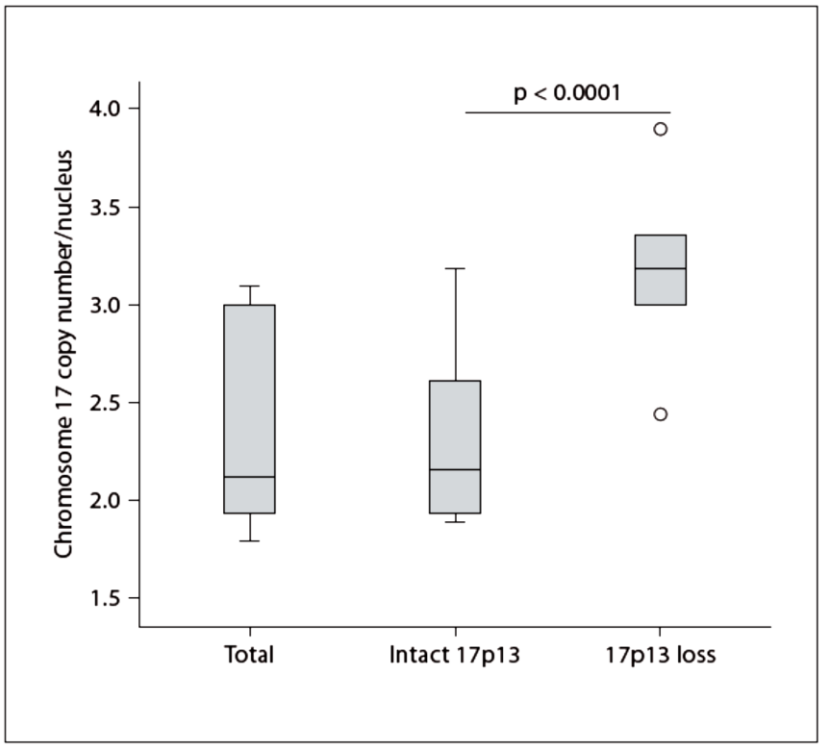
in situ vizsgálatával a daganatos genotípus jelentős tényezői együtt vizsgálhatók és az esetleges kópiaszám összefüggések is feltárhatók.

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 lókusz vesztésként jelentkezett. 10 esetben észleltük a TP53 lókusz (20,0%) és 6 esetben az AURKB lókusz (12,0%) vesztését, az utóbbi hatnál mindkét lókusz érintett volt (kodeléció). Kópiaszám emelkedést, amplifikációt nem tapasztaltunk. Érdekes módon a 17-es kromoszómaszám és a TP53, ill. AURKB vesztés között szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető, diszómia esetén a 17p13 lókusz érintettség sokkal ritkább volt, a lókusz vesztése a poliszómiás/aneuszómiás csoportban volt jellemző (6. táblázat).

	Chromosome 17 polysomy (n = 19)		Chromosome 17 disomy (n = 31)		p value
	range	mean ± SD	range	mean ± SD	
TP53/chromosome 17	0.49–1.11	0.81 ± 0.2	0.74–1.44	0.99 ± 0.13	0.0006
AURKB/chromosome 17	0.48–1.13	0.91 ± 0.2	0.82–1.59	1.08 ± 0.18	0.0036

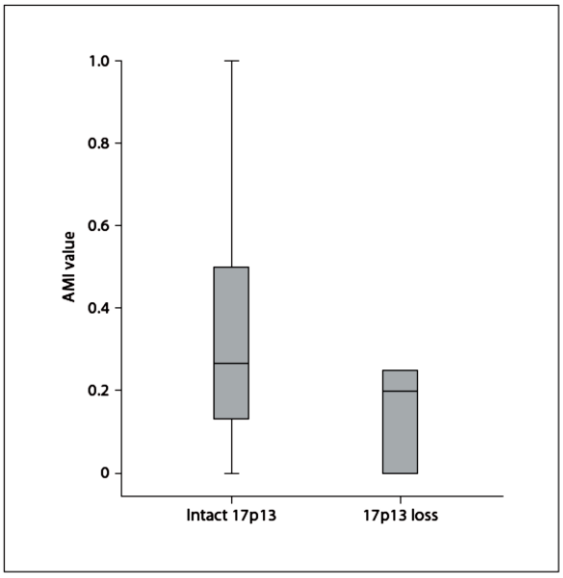
***6*. táblázat**. Relatív TP53 és AURKB kópiaszámok a 17-es kromoszóma számbeli eltéréseinek függvényében. Tényleges relatív vesztés 17-es poliszómiával összefüggésben volt kimutatható

A 17-es kromoszóma számának emelkedése és 17p13 lókusz 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 ($p < 0{,}001$)(26. ábra).



***26*. ábra.** 17p13 vesztés és 17-es kromoszóma aneusomia összefüggése emlőkarcinomában

Vizsgálataink a kromoszomális eltérések és a háttérben húzódó esetleges regulációs zavarok összefüggéseire is irányultak, aminek egyik jele a nem megfelelő, deregulált Aurora B kináz fehérje expressziója lehetne. Míg a szakirodalom elsősorban az overexpresszió jelentőségével foglalkozik, az általunk alkalmazott relatív AuB expresszió (AMI) meghatározásával esetenként az expresszió csökkenését is tapasztaltunk. Az AURKB lókusz vesztése és 17-es aneuszómia esetén az AMI mértéke alacsonyabbnak bizonyult, a csoportba tartozó eseteknél az expresszió tartománya beszűkült (27 . ábra). Statisztikailag azonban egyértelmű összefüggés a 17p13 lókusz vesztése és a kináz jelenléte között nem volt jelentős (*p=0.1*). Közvetlen kapcsolat tehát a génkópiaszám és a gén expressziója között - az alkalmazott módszerünkkel - nem nyert igazolást.



27. **ábra**. Az AMI értékek alakulása a 17p13 lókusz érintettség függvényében 50 emlőkarcinoma minta vizsgálata alapján. Relatív 17p13 vesztés esetén az AMI csökkenése gyakran volt tapasztalható, statisztikailag azonban a különbség nem szignifikáns (p=0,1).

4.3.3. Az Aurora B kináz és a vele interakcióban lévő regulátorok expressziója agresszív nagy B-sejtes limfómákban

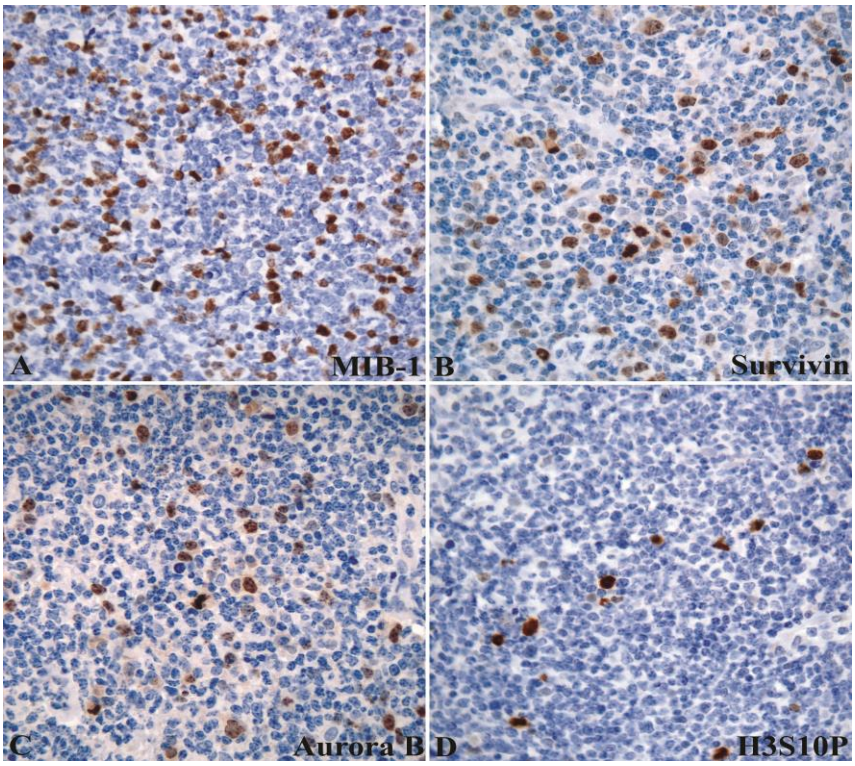
Az Aurora B expresszióját és annak hatását a sejtciklusra, ill. a sejtosztódásra agresszív limfómákban az emlőrákban is alkalmazott módon tanulmányoztuk. Elképzelésünk alapján a diffúz nagy B-sejtes limfóma (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) és egyes további agresszív B-sejtes folyamatok neoplasztikus proliferációja direkt módon összehasonlítható az immunaktiváció kapcsán a nyiroktüszőkben tömegesen zajló normális B-sejtes proliferációval. Limfómás eseteinket így közvetlen módon a nyirokcsomó follikulusokban tapasztalható sejtkinetikai folyamatokkal kívántuk összehasonlítani. A hiperplasztikus centrum germinatívum Ki67, AuB és mitotikus aktivitási értékeit vettük alapul a fehérje expresszió dinamikájának érzékeltetésére.

Az Aurora B kináz expressziójának és működésének megértéséhez hozzá tartozik a fehérje hatását szabályozó, triggerelő stimulusok tanulmányozása is. Az Aurora kináz aktivitás beindítását a CPC komplex részeként leírt survivin fehérje egyik prominens hatásának tulajdonítják (l. 1.3.2. fejezet), ezért a mitotikus folyamat korai szakaszára a survivin fehérje expressziójának mértéke is komoly hatással lehet. Ugyanakkor az AuB kináz tényleges hatását leginkább a H3 foszforilációs státuszának vizsgálata árulhatja el. A survivin fehérje szövettanilag az eddig ismertetett módon szintén jól tanulmányozható, a kromoszóma kondenzációhoz szükséges kromatin foszforilációt a hiszton H3 foszforilált (ser10) változata

elleni antitest tünteti fel specifikusan. Így a teljes sejtproliferációs frakció (Ki67) mellett az aktivációs folyamat elemei (survivin, Aurora B, foszfo-H3 hiszton) egyenként is láthatóvá tehetők és összefüggéseik immunhisztokémiai módszerrel meghatározhatók.

Limfómákon végzett tanulmányunkban arra kerestük a választ, hogy az Aurora B relatív túlexpressziója milyen mértékben függ össze a limfóma sejtkinetikai aktivitásával és agresszivitásával, mennyire függ a survivin expressziótól, ill. befolyásolja-e a hiszton H3 foszforilációt, és azon keresztül a sejtosztódási rátát. Ezzel párhuzamosan az agresszív limfómákban is elvégeztünk az AURKB lókusz (17p13) eltéréseinek megismerésére, kizárására irányuló, az emlőkarcinoma tanulmányban leírt molekuláris citogenetikai vizsgálatokat.

Összesen 50, különféle morfológiai és fenotipikus kategóriákba eső agresszív limfóma vizsgálatát végeztük el, a kollekcióban 43 diffúz nagy B-sejtes limfóma, 3 B-sejtes ALCL, 3 plazmoblasztos limfóma és egy nem besorolható kapott helyet. Egyidejűleg nem neoplasztikus aktivált B-sejtpopulációkat is vizsgáltunk nyirokcsomók reaktív centrum germinatívumában (n=10). Immunhisztokémiai elemzéseinket a már ismertetett módon, fénymikroszkóposan, kromogén (DAB) detektálás (EnVision Flex detektáló rendszer, Dako, Glostrup, Dánia) után végeztük. A survivin fehérje kimutatása poliklonális egér anti-humán antitesttel (Dako), a pH3(ser10) megjelenése a foszforiláció-specifikus antitesttel (phospho S10, AbCam plc, Cambridge, Egyesült Királyság) történt. A FISH vizsgálatokat a korábban már ismertetett módon az AURKB, TP53 lókusz és CEN 17 specifikus próbákkal végeztük. Vizsgálataink során elsőként a limfómák kinetikai sajátosságait határoztuk meg 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%; 7. táblázat). 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 csak minimálisan magasabb a reaktív csíracentrumhoz viszonyítva (AMI 0,39 vs 0,44), a különbség statisztikailag nem szignifikáns (p=0,65).



***28*. ábra.** Sejtkinetikai paraméterek immunhisztokémiai ábrázolása agresszív limfómákban. A sejtcikluban meghatározott rendben megjelenő fehérjék arányosan eltérő gyakorisággal mutathatók ki. A: Mib1 (25%), B: survivin (15%), C:Aurora B (5%), D: foszfo-H3 hiszton (9/látótér).

		MIB-1 (%)	*Aurora B (%)*	*AMI*
reactive control (n=10)	**mean**	**77.8**	**30.45**	**0.39**
	SD	*4.99*	*5.06*	*0.03*
aggressive B-cell lymphoma (n=50)	**mean**	**63.6**	**28.2**	**0.44**
	SD	*15.94*	*15.32*	*0.04*
p value		*0.008*	*0.65*	*0.65*

***7*. táblázat.** A sejtproliferáció (MIB-1), az Aurora B és a pH3-hiszton expresszió mértéke reaktív B-sejtes proliferáció (follikuláris hiperplázia) és agresszív B-sejtes limfóma esetén.

A nem neoplasztikus kontroll B-sejtes proliferációt (centrum germinativum) alapul véve megállapítottuk, hogy a kifejezett proliferációval párhuzamosan az AuB expresszió mértéke az aktív nyiroktüszőkben lényegesen magasabb lehet, mint az irodalomban bárhol szereplő értékek. Az AuB expresszió limfómákban ugyanakkor rendkívül változatos volt. Fokozódását a normál tüszőkben tapasztaltak alapján azonban abban az esetben tekintettük biztosan kórosnak, ha annak mértéke 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%). A kifejezett dereguláció miatt a sejtkinetikai paramétereket erre a csoportra nézve külön is megvizsgáltuk. A *8. táblázatból* is leolvasható, hogy az AMI értékének emelkedése ténylegesen az AuB expressziójától függ, amennyiben a Mib1 % értéke lényegében változatlan az egyes csoportokban.

	CEP17 /nucleus	*MIB-1 %*	*Survivin %*	*H3S10P MI /10 HPF*	*MI 10 HPF*
AMI< 0.5	**2.62**	**62.97**	**34.11**	**100.16**	**44.51**
(n=37)	0.58	15.49	18.56	62.54	22.31
AMI> 0.5	**2.73**	**63.75**	**50.94****	**137.00**	**61.44***
(n=13)	0.50	17.37	19.46	101.56	33.95
AMI> 0.75	**2.74**	**61.88**	**56.25***	**174.12***	**76.00***
(n=8)	0.55	14.56	19.16	126.99	36.16

***8*. táblázat.** Az AuroraB/Mib1 index (AMI) mértéke és a megvizsgált sejtciklus paraméterek közötti összefüggések. Az AMI emelkedés kiegyensúlyozott Mib1 expresszió mellett pozitív összefüggést mutat az aktivációt serkentő upstream survivin jelenlétével. Az AuB kináz expressziójának relatív fokozódása hatással van a pH3-hiszton expresszióra és a mitózisok számának mértékére is (* p<0,05; ** p<0,005). MI=mitózis index HE-festés alapján, H310P MI=mitózis index foszfo-H3 immunfestés alapján.

A survivin szerteágazó funkciói között az AuB legfontosabb upstream szabályozási stimulusaként ismert. Vizsgálatainkban ezért a survivin immunhisztokémiai meghatározására is sor került. 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, de 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, az összefüggés statisztikailag szignifikáns (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 alakulnak ki a limfómák egyes csoportjaiban (8. táblázat).

Megfigyeléseink szerint az AMI emelkedésének hátterében elsősorban az AuB kináz expresszió jelentősebb indukciója/aktivációja áll. Ugyanakkor genetikailag fixált mechanizmus direkt stimuláló hatását nem tudtuk kimutatni, az AuB expresszió a 17p13 lókusz és a 17-es kromoszóma FISH módszerrel meghatározott kópiaszáma függvényében nem különbözött. A megvizsgált limfómák jelentős részben aneuszómiát mutattak 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 hozható direkt összefüggésbe.

Az agresszív limfóma gyűjteményünk szövettani osztályozása során megvizsgáltuk a 17p13 régióban elhelyezkedő AURKB és a TP53 lókuszok eltéréseit, a fő kategóriákat külön is elemeztük. Összesen 11/50 (22,0%) esetben tapasztaltuk a lókusz 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 (8,0%) olyan esetet azonosítottunk, ahol a két szomszédos lókusz együttes vesztése igazolódott. 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 (9. táblázat).

Vizsgálatainkban az Aurora B kináz expresszió jellegzetességeit, okait és az esetleges mitotikus szabályozási zavar következményeit kívántuk feltérképezni agresszív limfómákban. Észleléseink alapján a nem neoplasztikus B-sejtes proliferációkban eleve igen magas az AuB expresszió, ami a sejtek funkcionális (fiziológiás) sejtciklus eloszlásával (G2 fázis blokádjával) magyarázható. Ehhez képest a limfómás szövetekben változatos az AuB expressziója, egyes esetekben kifejezetten magas, ami fokozott mitotikus aktivitással is jár.

	DLBCL, non-GCB	*DLBCL, GCB*	*B-ALCL*	*PMBL*	*Intermediate*	Σ
TP53 loss	3	1	3	0	0	**7**
AURKB and TP53 loss	2	2	0	0	0	**4**
Intact 17p13.1	24	11	0	3	1	**39**
Σ	29	14	3	3	1	**50**

***9*. táblázat.** A 17p13 kromoszóma lókusz érintettsége a megvizsgált 50 agresszív B-sejtes limfóma eseteiben szövettani kategóriák szerint. FISH jelek vesztése 11/50 (22,0%) gyakorisággal volt kimutatható, az AURKB génlókusz 4/50 esetben (8,0%) volt érintett, mely minden esetben együtt járt a TP53 vesztésével is.

Az AuB expresszió fokozódása - várható módon - a survivin expresszió növekedésével párhuzamosan jelentkezett, ami a két fehérje interakciója, a szabályozás egymásra épülése mellett szól. Az általunk kimutatott összefüggés támogatja a mitózis kezdetekor a CPC komplexbe vont survivin közvetlen stimuláló hatásának lehetőségét is az AuB effektor funkcióra. Nem tapasztaltunk ugyanakkor kapcsolatot az AURKB génlókusz eltérése és az AuB expresszió között és a megvizsgált mintákban az AuB expresszió mértéke a kromoszóma szám eltéréssel, jelentős heterogenitással sem volt összekapcsolható.

5. Megbeszélés

5.1. A genom kópiaszám eltérései és az aneuploidia jelentőségének újraértékelése

Az utóbbi 30 évben általánosan elérhetővé vált, folyamatosan újuló eljárások segítségével a daganatos DNS eltérések vizsgálata szinte korlátlanul lehetséges, klinikai és kutatási célból egyaránt. A sort a citogenetikai módszertan és a tumorsejtek DNS-tartalmának mérésére irányuló technikák kezdték. A meglehetősen durva mennyiségi megközelítésekben az a közös, hogy az össz nukleáris DNS, ill. a komplett kariotípus meghatározása sejtenként a teljes genomra vonatkozik, ami az egyes sejtek közötti eltérésekre, azaz a tumoros sejtpopulációk összetételére, azok heterogenitására nézve is informatív. A specifikus kromoszóma eltérések, mutációk jelentőségének felismerése ugyanakkor a genetikai vizsgálatokat döntően azok molekuláris aspektusai irányába terelte. A FISH módszertanát leszámítva a molekuláris szintű eltérések immár a teljes daganat állományára vonatkoztatva, a szövetből izolált DNS-ből határozhatók meg nagy hatékonysággal. A diagnosztikai, prognosztikai vagy prediktív célból végzett vizsgálatok kapcsán a szöveti heterogenitás kérdése így másodlagos jelentőségűvé vált. A specifikus eltérések ismeretében az aneuploidia esetleges fennállta és az igazolt molekuláris genetikai eltérésekhez való viszonya háttérbe szorult, az aneuploid jelleg, annak mértéke önmagában jelen pillanatban nem nyújt objektív információt az egyes daganatok jellemzésére.

A humán genom megismerésével és az egyes daganatokra jellemző genomikus eltérések rendszerszintű elemzésével azonban a ploidia és a kromoszómák komplex számbeli és szerkezeti aberrációi (GCR, CIN) új jelentőségre tettek szert, mert ismeretükben az átrendeződések és az egyes gének, génlókuszok eltérései, azok kialakulása érthetőbbé váltak. Míg korábban a tumorigenezist egymástól független génmutációk, átrendeződések többlépéses sorozatának tekintették, egyre világosabb, hogy a kromoszómákban, vagy alrégiókban lokálisan összehangoltan léphetnek fel szerkezeti hibák, amik akár tumor iniciátorként is működhetnek. A néhány éve leírásra került chromoanagenesis mechanizmusa (1.2.5. fejezet) szorosan köthető az aneuploidia korábbról ismert jelenségéhez. A chromoanagenesis különféle formáiban a tömegesen jelentkező génátrendeződéseket lényegében a kromatin szegregációs zavarával, mitotikus aszinkroniával, mikronukleusz képződéssel magyarázzák. A kromoszóma malszegregáció tehát lényegében kijelöli a genom legérzékenyebb régióit, klasszikus patológiai kifejezéssel élve a „locus minoris resistentiae-t”. Az aneuploidia ebből következően az instabilitás és a

transzformációs, progressziós hajlam fontos és mérhető jele. A jelenség ugyanakkor manifeszt daganatokban értelmezhető elsősorban, kimutatása korai vagy az alulreprezentált szub-klonális eltérések esetén korlátozott. Különösen összetett ezért a ploiditás jelensége és szerepe a progresszió során klinikai mintákban. Elképzelésünk szerint az aneuploidia ill. kópiaszám eltérések sejtenkénti kimutatásával és a fogalmak mögött meghúzódó biológiai folyamatok feltárásával a kancerogenezis egy keveset vizsgált, fontos eleme kerül feltárásra, a daganatok klinikai viselkedése és gyógyhajlama is jobban megismerhető.

5.2. In situ molekuláris vizsgálatok

Vizsgálataink során a malignus transzformáció során bekövetkező durva genomikus eltérések, ezen belül pedig a ploiditás, a kromoszómaszám, ill. egyes régiók kópiaszámának stabilitásával, a kialakulás mechanizmusaival és klinikai jelentőségével foglalkoztunk, többnyire újszerű megközelítésből, műszeres szövettani vizsgálatok keretében. A DNS-tartalom mérése, az egyes kromoszómák vizsgálata a fehérjeexpresszió és a funkcionális állapot meghatározásával kombinálva különleges új ismereteket eredményez. Metodikai újításainkat a digitális mikroszkópos technikák és az in situ alkalmazható molekuláris biológiai módszerek gyors fejlődése tette lehetővé. Lényegében valamennyi fő technikai irányvonalat kipróbáltunk és eredményeinket nagyban köszönhetjük a laser scanning citometria (LSC), az automatizált mikroszkópos képanalízis, ill. a digitális szkenner technikák alkalmazásának. Módszereink lényeges eleme az analitikai megközelítés (mérhetőség) mellett a megtartott morfológiai információ, mely önmagában is fontos jellemző, de az egymásra épített molekuláris metodikák közötti összeköttetést is biztosítja. A sejtmorfológia és a szöveti környezet alapján a célsejtek, célrégiók kiválaszthatók, azonosíthatók, visszakereshetők, így a sorozatvizsgálatok ugyanarra a sejtre, szövetrégióra vonatkozhattak. Ennek a relokalizációs feltételnek valamennyi alkalmazott digitális rendszer eleget tett. Sorozat vizsgálatainkban műszeres segítséggel a primeren meghatározott paraméterek (DNS-index, immunfenotípus) alapján kiszűrt kóros sejtekben osztályozás után in situ specifikus DNS/kromoszóma eltéréseket tudtunk igazolni. Tanulmányainkban a sejtszintű vizsgálatok alapján a kromoszomális instabilitás és az aneuploidia alakulásának több, általános érvényű jellegzetességét is meg tudtuk határozni.

5.3. HPV asszociált aneuploidia és óriássejt képződés

A cervikális diszpláziák kialakulásában mára bizonyított a HPV szerepe, a vírus genotípusának meghatározása az etiológiai hátteret lényegében tisztázza. A HPV fertőzés következtében kialakuló genomikai eltérések és hatásuk a cervix hámsejtjeiben azonban kevésbé ismertek. Az elhúzódó vírusfertőzés kapcsán többféle mechanizmus érvényesülhet. Ezek közül a legjelentősebb a magas rizikójú típusok esetén a vírusgenom integrációja valamint a poliploidizáció. Az integráció során aktiválódó virális E5, E6 és E7 onkogének a sejtciklus genomikus és epigenetikai átprogramozásával fejtik ki hatásukat. Mindez nem csupán az apoptosis elmaradásával (p53 és Rb szuppresszor fehérjék fokozott degradációja) és a sejtciklus fokozásával (p16/INK4 expresszió) jár, hanem masszív hatás jelentkezik kromoszomális szinten is. A poliploidizáció és a vele járó kromoszóma sérülékenység jellegzetes kromoszóma eltéréseket eredményezhet már a prekancerózus szakban. A teljes kromoszóma eltérések (aneusomia) mellett újabban egyes szubkromoszomális régiók gyakori nyerését is kimutatták (3q26, 5p15, 20q13 régiók) és a kópiaszám eltérések a SIL illetőleg az intraepiteliális neoplázia súlyosságával párhuzamosan egyre gyakoribbnak bizonyultak [185;186]. A H-SIL kromoszomális szignatúrája matrix-CGH módszerével is inkább az invazív cervixkarcinómáéval egyezett [187]. Ezek a kromoszóma eltérések azonban a léziók korai szakaszában többnyire rejtve maradnak, mivel gyakoriságuk alacsony és a klonális jelleg a számos random eltérés közepette nem érvényesül.

A citológiai preparátumok kiváló lehetőséget biztosítanak a tumorképződés és progresszió genetikai aspektusainak további vizsgálatára. Citometriai módszerekkel, különösen a standardizált módon elkészített (liquid based) mintákból igen hasznos információk nyerhetők. Vizsgálataink a 2000-es évek elejétől elterjedő folyadékalapú citológiai feldolgozás előnyeit kihasználva, a HPV fertőzések biológiai jelentőségét is integrálva közelítették meg a sejtmagban észlelhető morfológiai eltérések és az ennek hátterében meghúzódó korai karcinogenezis genetikai aspektusát. Eredményeink alátámasztják, hogy a citológiailag észlelt atípia (SIL) kialakulásában a sejtmag DNS-tartalmának és a kromoszómák összetételének nagymértékű, de egyben nagyon változatos eltérései is szerepet játszanak. A ploiditás megítélését zavarja a sokféle, gyakran nem is a neoplasztikus folyamathoz tartozó jelenség (leváló hámsejt, gyulladásos sejtek), ezért a legsúlyosabb patológiás jelek azonosítására a lényegében a teljes preparátumot végigszkennelő automatizált mikroszkópos rendszer kifejezetten előnyösnek bizonyult.

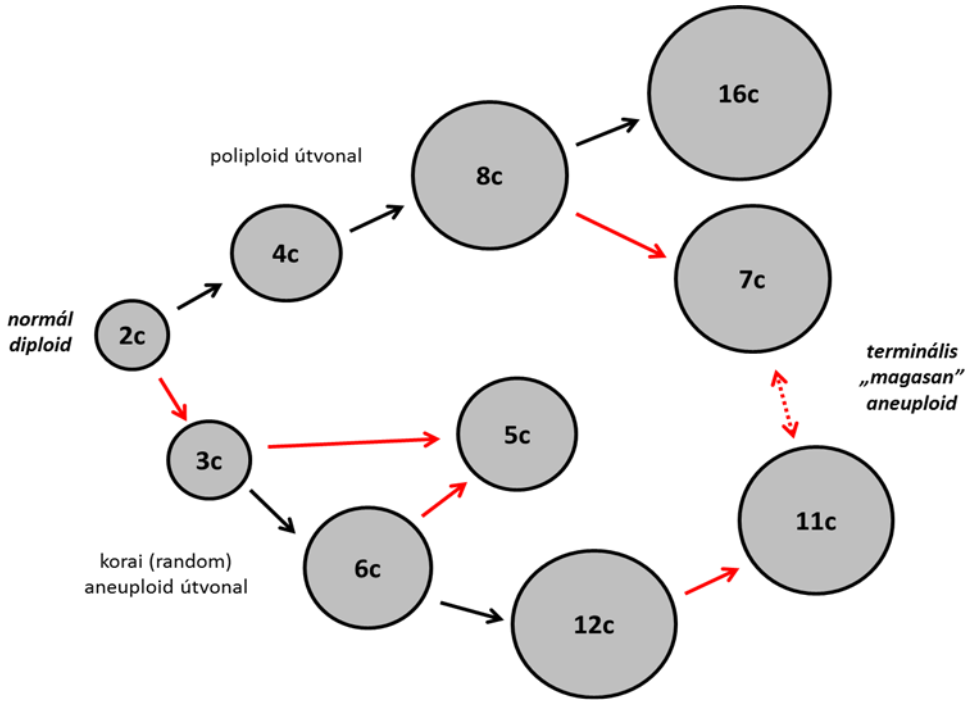
A 4.1. fejezetben bemutatott munkáinkban számos cervikális diszplázia esetet vizsgáltunk meg LSC asszisztált DNS citometriával a HPV fertőzéssel összefüggésben jelentkező

genomikus eltérések kimutatására. Tanulmányaink idején a vírusfertőzés részletes biológiája és a sejtciklusra gyakorolt hatása csak részben volt ismeretes, ezért az új citometriai és citogenetikai lehetőségeket kiaknázva a genom kópiaszám eltéréseire koncentráltunk. Megfigyelésünk szerint a DNS-tartalom alapján patológiás cervix citológiai preparátumokban jelentős ploiditás eltérések mutathatók ki, melyek HPV asszociált óriássejt képződés formájában extrém méreteket is ölthetnek (>5c, >9c DNS tartalom). Mindez a citomorfológiai eltérések ismeretében nem váratlan észlelés. A DI legdurvább eltérései logikus módon a magas grádusú SIL eseteiben voltak jellemzők. Markerként a legextrémebb DNS-tartományt definiáltunk (>9c), mely határozott jellegénél fogva műszeresen könnyen azonosítható és igény szerint tovább vizsgálható volt.

LSC asszisztált vizsgálatainkban az egyes sejtek DI-je alapján az aneuploidia kialakulásának progresszív folyamata jól kirajzolódott, melyben - a minden valószínűség szerint végállapotot képviselő - >9c sejtek fordultak elő a legritkábban. A poliditás spektruma alapján a mintákban normális diploid, poliploid és aneuploid sejtek egyaránt jelen voltak, az eltérések jellege – azaz a DI mértéke - meglehetősen randomnak bizonyult. A poliploidizáció és az ehhez társuló kópiaszám hibák együttesen a durva aneuploidia jelenségéhez vezetnek, a mérési eredményeink a mechanizmus folyamatos jellegét igazolták. Bár sejtek kialakulása feltehetően nem egységesen következik be és szerepet játszhatnak eddig nem ismert, vagy véletlenszerű tényezők, a jelenség a poliploidizáció és a korai kromoszómahibák oldaláról is logikusan levezethető (29. ábra).

A random módon kialakuló eltérések között progresszív esetekben ugyanakkor már viszonylag korán várható azon szubpopulációk megjelenése is, melyek szelekciós előnnyel rendelkeznek és genetikailag is klonális egyezést mutatnak. Specifikus kromoszóma eltérések a cervixrák karcinogenezisében, a korai formákban ugyanakkor nem ismeretesek.

A fentiekben említett régiók (3q, 5p, 20q) gyakoribb kópiaszám eltéréseit nemrég ugyan megkísérelték a klonális növekedés vizsgálatára molekuláris citogenetikai módszerrel azonosítani [188], az eljárás ezidáig nem került széleskörű diagnosztikai alkalmazásra. Ennél jóval korábbi FISH vizsgálataink során a DNS-index alapján biztosan aneuploid sejtekben elemeztük a kromoszóma kópiaeltérések előfordulását centromérikus FISH próbák segítségével. A 3-as és 17-es kromoszómák számos eltérése mellett egyes magas grádusú SIL esetekben olyan kromoszómaszám kombinációkat is kimutattunk nagyobb arányban, melyek a kiszűrt sejtek közös, klonális eredetére utalnak.



29**. ábra**. A vírusfertőzés kapcsán kialakuló poliploid, ill. random aneuploid hámsejtek genomjának feltételezett alakulása elhúzódó HPV fertőzésben. A magasan aneuploid (>9c) sejtek létrejötte alternatív útvonalakon, akár hibás és fiziológiás osztódások váltakozásával is lehetséges.

A HPV okozta celluláris szabályozási eltérések egyik jelentős hatása a mitotikus zavar, következménye a poliploidizációt kísérő kromoszomális instabilitás (n+sCIN), ill. ennek extrém megnyilvánulása a neoplasztikus óriássejtképződés (jelen esetben >9c sejtek). A tumorigenezis ugyanakkor transzformált, de stabil klónok progresszióját feltételezi, amely egy adott fázisban fixált kromoszómaaberrációkat, kópiaszámokat jelent. Mint bemutattunk, a jelenség a nagy rizikójú korai léziókban már tettenérhető. Az aneuszómia mértéke a tumor szempontjából feltehetően esetleges és teljesen egyedi, de egy lézión belül jól jellemezheti a neoplasztikus sejteket, és igazolhatja azok klonális eredetét. Bár követéses vizsgálataink száma korlátozott, korai eredményeink arra utalnak, hogy a tömegesen előforduló random eltérésekből kiemelkedő, fixált arányú aneuszómiák a progresszív cervikális léziókra jellemzőek.

A magasan aneuploid (>9c) sejtekkel kapcsolatos észleléseink tökéletesen illeszthetők a jelenleg elfogadott, ismert vírus indukálta karcinogenezis modellekhez. Az ilyen módon biológiailag is értelmezett atípusos óriássejtek ugyanakkor mindennapos markerek lehetnek a citológiai gyakorlatban. A gyakorlat számára összefoglalva a magasan aneuploid sejtek a cervixhámból származó azon patológiás sejtek, amelyek *1)* hyperdiploid óriássejt morfológiával rendelkeznek, *2)* virális indukció hatására, poliploidizáció során jönnek létre, *3)* instabil, heterogén formában vannak jelen a HPV asszociált folyamatban, *4)* feltehetően a

citopátiás hatás végállapotának felelnek meg, *5)* a klonális hámproliferáció részét képezhetik, *6)* objektív indikátorai a korai cervikális karcinogenezisnek.

A DNS citometria módszerét ritkábban ugyan, de egyes intézményekben a mai napig is hatékonyan alkalmazzák, leginkább a legegyszerűbb, statikus formában, denzitometriás alapon (Feulgen-festés). Hosszabb távon a fluoreszcenciával kombinált, műszerigényes mérések túlságosan összetettnek bizonyultak a klinikai gyakorlat számára. Az LSC asszisztált DNS-ploidia mérések így a továbbiakban elsősorban kutatási célokat szolgálhatnak. A HPV tipizálás viszont időközben széles körben elterjedt és lassan a mikroszkópos citodiagnosztikai vizsgálatokkal egyenértékűvé válik a cervix prekancerózus állapotainak prediktív klinikai kimutatására.

5.4. A daganatsejt disszemináció genetikai és funkcionális jellegzetességei

5.4.1. A hematogén disszemináció klinikai jelentősége

A rosszindulatú daganatok egyik legfontosabb tulajdonsága az invazív terjedés, melynek kapcsán a tumorsejtek az erek falán is keresztülhatolnak. A véráramlásba kerülve adódik a hematogén szóródás lehetősége, a sejtek a vérkeringéssel elérhető legközelebbi, kapilláris hálózattal rendelkező szövetig jutva az áramlás lelassulása és az érlumenek átmérőjének csökkenése miatt kiszűrődhetnek, kitapadhatnak [189]. A progresszió során a daganatsejtek – lényegében függetlenül a daganat stádiumától - folyamatosan szóródnak a keringésbe, sőt, a szóródás anatómiailag nehezen magyarázható helyeken is detektálható [190]. Nem teljesen világos azonban a szóródó sejtek genetikai háttere, biológiai potenciálja. A klonogén sejtek megfelelő környezetben metasztatikus növekedésnek indulnak, míg feltehetőleg további nagy populációk – már a keringésben vagy nem sokkal a kitapadás után – elpusztulnak [191]. Ismert, hogy a daganat, ill. annak közvetlen környezete támogató, támasztó szöveti struktúráinak hiánya a tumorsejtekben apoptózist indukálhat [192]. Az anoikis lényegében az apoptosis egy speciális formája, melyet a hámsejtek közötti intercelluláris kapcsolat megszűnése vált ki [193]. Harmadik lehetőségként a traszformált sejtek az idegen környezetben elbújva, nyugvó állapotba kerülnek és hosszú ideig perzisztálhatnak. Ez lehet a magyarázata a némely daganat (pl. emlőkarcinoma, lymphoma) kapcsán jellegzetesen kialakuló késői recidíváknak, metasztázisoknak (tüdő, agyhártya, here áttétek).

A szolid tumorok disszeminációjának vizsgálata ideális esetben a perifériás vérből, egyszerű analitikai módszerrel végzett biomarkerek kimutatásával történhet [194;195], azonban az egyes markerek megjelenése, mérhetősége a vérben egyelőre számos problémát vet fel [196]. Túl a daganatra jellemző megfelelő szenzitivitáson és specificitáson az egyik ilyen alapvető kérdés az, hogy az illető marker kimutatása milyen mértékben kapcsolható élő, sőt, túlélő daganatsejtekhez, azaz, hogy a teszt eredménye mennyire függ össze a folyamat progressziójával. A biokémiai (fehérje, nukleinsav izolátum) jellegű metodikák alkalmazásának egyik jellegzetessége, hogy nem tesz különbséget az élő, disszeminálódó és a tönkrement sejtek, esetleg a daganatból magából kibocsájtott molekulák között. A tumorsejt disszemináció másik aspektusa azok biológiai potenciálja, azaz a kimenetel szempontjából érdekes aberrációk, mutációk jelenlétének, alakulásának a meghatározása.
A kérdés alapos vizsgálatához, az alapelvek lefektetéséhez mindenképpen szükségesnek látszik a daganatsejtek azonosítása és további jellemzése a perifériás vérben és a csontvelő aspirátumban. Automatizált mikroszkópos módszerünkkel a disszeminált daganatsejtek morfológiai megközelítését, az azonosításon túl azok genetikai és funkcionális heterogenitásának elemzését tűztük ki célul. A munkacsoportunk által kifejlesztett AIPF metodika kontrollált formában, 10^{-6} érzékenységű tumorsejt kimutatást tett lehetővé úgy, hogy a sejteket további genetikai vizsgálatoknak lehetett alávetni. Az egyik fő kérdésünk az volt, hogy a primer tumorokban kimutatott molekuláris citogenetikai eltérések milyen hatékonysággal mutathatók ki disszeminált tumorsejtekben, milyen mértékben tapasztalható az egyes eltérések esetében heterogenitás és így alkalmasak-e a szolid tumorban észlelhető kromoszómahibák a vérből azonosított disszeminált tumorsejtek markereként.

5.4.2. A kromoszóma aberrációk stabilitása progresszió során neuroblasztómában

A korai disszemináció biológiai és klinikai kérdését sokat vizsgálták a leggyakoribb gyermekkori szolid daganat, a meglehetősen változatos megjelenésű és kimenetelű neuroblasztóma esetében. Bár a betegségben általánosan előforduló specifikus genetikai aberráció nem ismert, a tumorok jelentős része a kimenetelre is hatással lévő kromoszóma eltérést mutat. A korai, kariotipizálással nyert adatok és a későbbi molekuláris vizsgálatok a ploiditás gyakori, de nem specifikus eltéréseit (triploidia) mutatták. Ezen túl három kromoszómarégió került az érdeklődés középpontjába. A citogenetikai eltéréseknek csak kis részéről ismert a sejtaktivitásra gyakorolt konkrét hatás, de ilyennek tekinthető az NMYC

gén amplifikációja, mely a neuroblasztómák 19-25%-ában mutatható ki [197;198]. Az NMYC ennek kapcsán a betegség prognózisával is igen jól korrelál [199;200]. Kevésbé világos a szerepe ugyanakkor a neuroblasztómában szintén gyakori 1p36 vesztésnek (29%) és a 17q nyerésnek (35%), melyek hatását intenzíven kutatják [201]. Érdekes, hogy az említett három citogenetikai eltérés a tumor állományában igen konstans, valamennyi daganatsejtre jellemző, így markerként is szóba jönnek. A három eltérés legalább egyike az összes eset legalább 52%-ában, a IV-es stádiumú (disszeminált) betegség 83%-ában előfordul. A triploid neuroblasztómák ugyanakkor jó prognózisúak, akár spontán remissziót is mutathatnak (IVs stádium), az esetek kb. 30%-át teszik ki [202].

Neuroblasztómában a szisztémás terjedés vizsgálata különös jelentőséggel bír, hiszen a diagnózis idején az esetek mintegy 50%-a már metasztatikus. A szakirodalom leggyakrabban a csontvelő érintettségéről számol be, feltehetően ennek egyszerű vizsgálhatósága miatt [203]. A disszeminált neuroblasztóma sejtek kimutatása és genetikai/biológiai jellemzése ezért régóta az érdeklődés középpontjában áll [204;205]. A tumorsejtek azonosítására a GD2 immuncitológiai kimutatása a 90-es évektől kezdődően fokozatosan terjedt el [206;207].

Munkáinkban a csontvelőbe disszeminálódott neuroblasztóma sejtek precíz mennyiségi kimutatásán túl azok genetikai jellegzetességeinek vizsgálatát is célul tűztük ki. Az alkalmazott automatizált képanalízis módszere ehhez a 2000-es évek elején egyedülálló segítséget nyújtott, hiszen a GD2 immunfluoreszcenciával jelölt sejtek a műszer segítségével nagy érzékenységgel azonosíthatók voltak. Utólagos morfológiai osztályozásra és kiválasztásra is lehetőség nyílt és a sejteket mindezek után FISH módszerrel genetikailag is jellemezni tudtuk. Kellő óvatossággal kezelve a tárgylemezt akár a neuroblasztómában jellegzetes mindhárom kromoszómaaberrációt is meg lehetett vizsgálni ugyan azokban a sejtekben egymás után elvégzett 3 FISH reakció keretében. Az NMYC, a 1p36 és a 17q23 próba mellett alkalmazott pericentromérikus referencia próba a kromoszóma- ill. centroméraszám meghatározását is biztosította. A várakozásnak megfelelően leggyakrabban a triszómia jelenségével találkoztunk. Az NMYC amplifikált tumorokban a 2-es kromoszóma több kópiája is észlelhető volt, így a centromerikus szignálok mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya is a tumorsejtek markerként volt használható. Segítségükkel a GD2+ immunpozitív daganatsejtek genetikailag azonosíthatók, validálhatók voltak.

A csontvelői preparátumokban talált GD2+ disszeminált tumorsejtekben a primer tumorban azonosított genetikai eltérések valamennyi esetben jelen voltak. Heterogenitást kizárólag a kromoszómák száma tekintetében figyeltünk meg, a specifikus lókusz eltérések lényegében változatlan formában álltak fenn, beleértve az NMYC amplifikáció mértékét is.

Következtetésünk alapján a megvizsgált szerkezeti eltérések a daganatban korán, már az esetleges szisztémás disszeminációt megelőzően klonális jelleggel létrejönnek, és a progresszióhoz a szóródást követően is hozzájárulnak. A neuroblasztóma korai genetikai markereinek állandósága ugyanakkor nem mond ellent azoknak a megfigyeléseknek, melyek szerint a disszeminált daganatsejtek a primer tumortól genetikailag jelentősen különbözhetnek. A progresszióhoz esetlegesen szükséges másodlagos eltérések természete neuroblasztómában alig ismert, ezért ilyen jellegű további vizsgálatokat nem tudtunk végezni. Az elméletileg szóba jöhet ugyanakkor a jellemző genetikai eltérést még nem mutató korai sejtdisszemináció, ennek fennálltáról azonban megoszlanak a vélemények. Az utóbbira szolid tumorok esetén kevés konkrét példát találunk a szakirodalomban. Ilyen megfigyelést tettek évekkel ezelőtt pl. emlőkarcinoma esetén, aholis a primer tumorban kimutatott p53 mutáció a disszeminált ritka tumorsejtekben nem volt észlelhető [208]. Magyarázatául a korai szóródást követően kialakuló p53 deficiencia lehetőségét említik a progresszívan transzformált tumorban, de a mutáns allél későbbi elvesztésének lehetőségével is számolnunk kell. Nyilvánvalóan léteznek korai, a tumorigenezissel és késői, az agresszív viselkedéssel kapcsolatos genomikus eltérések és ezek időben is meghatározzák a daganat növekedését. A primer neuroblasztómák általunk megvizsgált, klasszikus genetikai eltérései ezen modell szerint a korai keletkezésű és a stabilan fennálló aberrációkhoz sorolhatók.

Vizsgálataink során ráadásul azt a megfigyelést is tettük, hogy a centromérikus kópiaszám változatossága (ploidia) nem befolyásolta a specifikusabb aberrációk jelenlétét a megvizsgált sejtekben. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy a sejtek túléléséhez az aberráció következtében megváltozott génfunkció feltétlenül szükséges, amennyiben tehát pl. a kópiavesztéssel a szerzett funkció is elvész, a sejt már nem marad életképes. Egy további elmélet szerint a kromoszómák szerkezeti átrendeződése következtében a driver gént tartalmazó régió elválhat (törés, transzlokáció, stb.) a centromérától. Különösen jellemző ez pl. az NMYC gén esetében, amikor az amplifikáció független kromatinfragmentumokban, minikromoszómák (double minutes) formájában van jelen [209]. Így a tumorigenitást lényegesen befolyásoló új genetikai egyensúly még egy esetleges allélvesztés kapcsán sem jelentkezik.

5.4.3. Funkcionális vizsgálatok disszeminált (keringő) daganatsejtekben

Érdekes módon a kedvező kimenetelű neuroblasztómákban, de egyéb malignitásban is sokkal gyakrabban észleltek csontvelő vagy perifériás vér pozitivitást különösebb további

klinikai jelentőség, összefüggés nélkül. Mindebből arra következtethetünk, hogy a keringő, esetenként a csontvelőben vagy máshol megjelenő tumorsejtek változatos tulajdonságokkal rendelkeznek, és csupán egy részük tehető felelőssé a szisztémás manifesztációért. Ennek magyarázata lehet, hogy ezeknek a sejteknek a többsége a daganat környezetéből kikerülve nem képes a túlélésre, elpusztul. Az aktív sejthalál (apoptosis) morfológiai jeleit egyes neuroblasztóma sejteken is tapasztaltuk AIPF asszisztált méréseink során. A folyamat mértékét biológiailag egyértelműen igazolni ugyanakkor emlőrákos betegek véréből származó mintákban sikerült a technika alkalmazásával. A kettős jelöléssel kiválasztott keringő emlőrák sejtek jelentős része mutatott korai apoptotikus jelleget (keratin fragmentáció, inklúziók), és az ezen sejtekben célzottan tovább vizsgált TUNEL reakció a kettőssláncú DNS töréseknek a sejtmagban való in situ kimutatásával igazolta a kromatin aktív hasításának eredményét. Meglepően nagy gyakorisággal tapasztaltuk az apoptózis jeleit, sőt, néhány esetben csak ilyen sejtek voltak azonosíthatók.

Automatizált mikroszkópunk és az AIPF módszer segítségével igen nagy szenzitivitás mellett a keringő emlőrák sejtekben olyan alapvető funkcionális különbségek voltak kimutathatók, melyek egyéb módon nem megítélhetők. Az azonosított tumorsejtek jelentős részére metasztatikus hajlamot biztosan nem mutató, sejtpusztulást jelentő feno- ill. genotípus volt jellemző emlőkarcinómás betegekben. Megfigyeléseink alapján természetesen feltételezhető, hogy a keringő tumorsejtek ilyen arányú pusztulása egyéb daganatfélékben is hasonlóan jelentkezik. A vizsgálataink óta eltelt időben sem vált azonban teljesen világossá, hogy a keringésben jelen lévő apoptotikus tumorsejtek valóban a disszemináció folyamatából adódóan pusztulnak, vagy esetleg apoptotikus jellegüknél fogva kerülnek oda. Az apoptosis teljes spektrumának jelenléte (fokozatos citoszkeletális degradáció, sejtmag piknózis és kilökődés) és egyidejűleg az intakt tumorsejtek észlelése ugyanakkor amellett szól, hogy a program a perifériás vérbe kerülve indulhat be és zajlik le. A keringő tumorsejtek klinikai jelentőségét többek között azért is nehéz megítélni, mert a különböző módszerek a szóródás más és más aspektusait mutatják. A legérzékenyebb metodikák valamely jellegzetes sejtmarker molekuláris vizsgálatát célozzák meg, így sok egyéb tényező mellett az nem ismeretes, hogy az apoptotikus sejtek milyen mértékben járulnak hozzá a perifériás vérből végzett PCR-vizsgálatok eredményéhez. A fokozott szenzitivitáson túl vizsgálatainkkal először sikerült a tumorsejt pusztulás jelenségét és mértékét a disszemináció során érzékletesen bemutatni. Tapasztalataink alapján az apoptotikus hajlam a folyamat egy jellemző biológiai tulajdonsága és ennek bekövetkeztét a betegség és a kezelések során érdekes lenne az intakt tumorsejtektől elkülönítve vizsgálni, amire az ismertetett AIPF módszer egyedi lehetőséget biztosít.

5.5. Az Aurora B kináz és sejtciklus dereguláció lehetséges szerepe az aneuploidia kialakulásában

5.5.1. Sejtkinetika és relatív kinázexpresszió

A jelenlegi felfogás szerint az aneuploidia oka és következménye egyaránt lehet a genom instabilitásának. A hirtelen, egyidejűleg kialakuló komplex kromoszomális eltérések magyarázatára a kóros kromoszóma szekvesztráció mechanizmusa különösen alkalmas. Ennek hátterében általánosságban a celluláris stressz valamely formája állhat (szabadgyökök, ionizáló sugárzás, hipoxia, súlyos sejtszintű sorvadás, stb.), lényegében azonban a kromoszómák kondenzációjának, mozgatásának mitotikus zavaráról van szó. Ilyen értelemben a tumorigenezis és progresszió során bármikor, akár külső tényezők hiányában és csak részlegesen is jelenkezhet jelentős szabályozási defektus. A mitózist szabályozó kinázok közül az Aurora A aktivitása ismert a legjobban, hiszen a 20q régióban az AURKA gén amplifikációja révén emlőrákok egy jelentősebb részében (21%, dominánsan a basalis típusban) expressziója fokozott [210]. Ennek hatásaként az AuA overexpresszáló tumorok, beleértve a receptor pozitív emlőrákokat is, prognózisa kedvezőtlen, a metasztatikus hajlam fokozott [211], a kezelésre adott válasz elégtelen [212;213].

Az AuA-val ellentétben a korai vizsgálatok az AuB prognosztikai, biológiai szerepét emlő és más tumorokban nem tudták elég határozottan igazolni [214]. Bár a kináz expressziója és a tumor kimenetele között kapcsolatot találtak, pl. tüdőrákban [215], ennek hátterében az AURKB régióban genetikai eltérést nagyobb számban nem sikerült kimutatni. Az expresszió mértékét számos mechanizmus befolyásolhatja, így pl. leírtak összefüggést az ösztrogén receptor aktiváció és az AuB mediálta H3 hiszton foszforiláció között [216].

A kináz fehérje mennyiségi meghatározása ugyanakkor jelentős problémákba ütközhet, ha az elemzés pusztán az expresszáló sejtek számára korlátozódik. Az AuB a G2/M fázis egyéb fehérjéihez hasonlóan a sejtciklusnak csupán kis hányadában van jelen kimutatható mennyiségben, azaz a sejtciklus kinetikájától a fehérje expresszió jelentősen függ. Világos, hogy ha az egyes szövetekben a proliferáló sejtek száma eltér, akkor az AuB expressziójának mértéke is követi az adott sejtpopuláció kinetikáját. Következtetésünk szerint az AuB pontos szöveti meghatározásához az aktuális sejtproliferációs kapacitás (teljes sejtciklus) ismerete szükséges. Szövettani mintákban a sejtproliferáció meghatározása viszonylag egyszerű és mindennapos a proliferációs index megadásával. Egy funkciójában kevéssé ismert, de az antigén sajátságai miatt igen elfogadott sejtciklus függő fehérje a Ki67

[217;218], melynek expressziója a sejtmagokban aktív sejtekben csak a G1 fázis legelején csökken rövid időre [219]. Az immunhisztokémiai vizsgálatra diagnosztikus célból általában a Ki67 fehérjére specifikus MiB1 antitest klónt alkalmazzák.

Eredményeink a várakozásnak megfelelően az AuB és a sejtciklust jelző Mib-1 jelölődés lineáris összefüggését igazolták. Az AuB expresszió sejtciklushoz viszonyított meghatározására általunk kidolgozott relatív érték, az AuB/Mib1 index (AMI) azonban érdekes összefüggéseket mutatott a megvizsgált szövettípusokban. Emlőrák szövetekben a normál emlő állományhoz képest jelentősen emelkedett az AMI és egyértelműen overexpresszáltnak értelmeztük a 0,3 feletti értékeket. A megvizsgált emlőkarcinomák jelentős hányadában igazolódott relatív overexpresszió, ez azonban – a sejtproliferációs 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 fiziológiásan magasabb G2 fázis arányban találtuk. Ennek oka valószínűleg a nyiroktüszőben zajló speciális folyamatokban keresendő. A tüsző nagy diverzitással rendelkező aktivált B-sejtjei ugyanis klonálisan szelektálódnak, a magas affinitású klónok túlélést követően intenzíven proliferálnak, míg a kis affinitással rendelkező sejtek növekedése elakad és elpusztulnak. Feltételezzük, hogy ezen eliminációs program a sejtciklus lelassulásával jár, mely a G2-fázisban blokádot és ennek köszönhetően a fokozott AuB jelölődést is eredményez. Ez utóbbi mechanizmus a B-sejtes limfómákban természetesen már nem érvényesül, a neoplasztikus sejtek ezen gátló szabályozás alól kikerülnek és így a limfómás klónok AuB expresszió a „kontrollhoz” képest ténylegesen alacsonyabb. Ezzel ellentétben az agresszív limfómákban a tényleges sejtproliferáció mértéke fokozott, és ezzel párhuzamosan az AuB expresszáló G2 fázisos sejteknek az aránya a felgyorsult sejtciklusnak köszönhetően alacsonyabb. Bizonyos limfómás esetekben azonban az AuB relatív expressziója kimagasló, amit tényleges overexpresszióként kell értékelnünk. Limfómás tanulmányunkban az AuB fokozott expresszióját mutató eseteinek elkülönítésére az AMI küszöbértékét 0,5-nél állapítottuk meg. Eredményeink szerint az agresszív limfómák jelentős részében kifejezett AuB overexpresszió mutatható ki, mely eddig nem ismert regulációs okokkal állhat összefüggésben.

Általánosságban elmondható, hogy proliferáció mértéke, a sejtciklus sebessége egyes fehérjék megjelenését, mennyiségét alapvetően befolyásolja, ezért a meghatározás során ezt a szempontot hangsúlyosan figyelembe kell venni. Meglátásunk szerint az AuB expresszióra vonatkozó szakirodalom jelentős része a kináz fokozott jelenlétének kapcsán egyszerűen a háttérben zajló aktív proliferációs aktivitás egyik következményét méri. Az

AuB expresszió/overexpresszió klinikai jelentőségének megítélését ezért újabb vizsgálatokkal szükséges alátámasztani.

5.5.2. Az AURKB lókusz eltérései emlőrákban és limfómákban

Molekuláris citogenetikai vizsgálatainkkal a korábbi észleléseknek megfelelően AURKB génamplifikációt sem emlőkarcinomában, sem limfómában nem tudtunk kimutatni, de izolált esetekben a 17p13 lókusz érintettségét – relatív vesztést - tapasztaltuk. FISH vizsgálataink alapján az emlőrákok 12,0%-ában (6/50 esetben), a limfómák 8,0%-ában (4/50) a vesztés az AURKB és a TP53 gént egyaránt érintette. A 17p13 régióban észlelhető, citogenetikai szinten mérhető genetikai eltérések ugyanakkor korlátozott, ill. statisztikailag nem megerősíthető összefüggéseket mutattak az AuB expressziójával a sejtkinetikai szempontok korrigálása után. A lokalizációjában igen közelinek tekinthető, a FISH vizsgálatokkal igazolt egyidejű AURKB és TP53 génvesztések esetén egyes limfómákban ugyan csökkent AuB expresszió volt mérhető, de ennek tényleges mértéke és gyakorisága nem volt vizsgálatunkban megítélhető. Érdekes összefüggés volt ugyanakkor mindkét tumortípusban a 17p13 vesztés és a 17-es kromoszóma poliszómiáját/aneuszómiáját között. AURKB és TP53 kodeléciót kizárólag olyan esetekben észleltünk, ahol egyidejűleg 17-es aneuszómia is fennállt. Ez az észlelés felveti annak a lehetőségét, hogy a kodeléció egyben egy esetleges funkcionális szinergizmust is képvisel a sejtek túlélése szempontjából. Hipotézisünk szerint a p53 deficiencia és az AuB dereguláció együttes előfordulása esetén a mitotikus hibák fennmaradása még valószínűbb, ami a daganat progressziójának kedvez. Elméletünket támogatja, hogy az Aurora B és a p53 interakciója több szempontból is bizonyított a normális sejtciklus esetében is [220;221]. A legújabb adatok szerint a koordinált működés zavarának kiemelkedő szerepe lehet a célzott kináz gátlás hatékonysága szempontjából [222;223].

5.5.3. Az Aurora-kináz szövettani meghatározásának jelentősége

Aktuális szemléletünk szerint a kináz fehérje expresszió a kinázműködés fokozódásával is jár. Jelen esetben is fontos tehát az általunk szöveti körülmények között megvizsgált overexpresszió biológiai és klinikai jelentőségének kérdése. Az AuA esetében az expressziót részben génamplifikáció okozza, míg az AuB esetében ezt nem tudtuk kimutatni, nyilvánvalóan más okokra vezethető vissza. A szakirodalomból ismert, hogy az emlő,

limfóma és egyéb tumorfajták jelentős része mutat overexpressziót, amely minden jel szerint túlélési előnnyel és a esetenként betegség rossz prognózisával jár [224;225;226]. Tanulmányaink alapján a sejtciklushoz társuló arányos AuB expressziót és az egyértelmű szabályozási defektusok által kialakuló overexpressziót szöveti szinten az AMI meghatározásával el lehet különíteni. Míg azonban a fokozott sejtproliferáció prognosztikai szerepe világos és általánosan elfogadott, a valós AuB overexpresszió klinikai hatásával kapcsolatban jelenleg nem állnak rendelkezésre adatok.

Látszólag ellentmondásos, hogy a daganatos proliferáció során általánosságban az AuB overexpressziója jellemző, míg kromoszomális szinten az AURKB lókusz relatív vesztésével találkozhatunk. Munkáink során azonban éppen azt igazoltuk, hogy a tényleges overexpresszió gyakorisága a sejtkinetikai aspektusok figyelembe vétele után lényegesen alacsonyabb, mint azt korábbi tanulmányok leírták. Eredményeink arra utalnak, hogy az AMI által meghatározott relatív expresszió mértéke változatos, 17p13 vesztés esetén akár lényegesen csökkent is lehet. Az Aurora B expressziót feltehetően párhuzamosan több, kevésbé ismert mechanizmus szabályozza és korrekt mérését a sajátos sejtciklusbeli eloszlás is nehezíti. A kináz aktivációs hatását ugyanakkor az expresszió mértéke nem feltétlenül tükrözi, ehhez a szabályozási környezet részletes ismerete volna szükséges. Immunhisztokémiai vizsgálatainkban az AuB aktivitást indukáló survivin és a hatást tükröző foszfo-H3 jelölődés a sejtciklussal és az AuB expresszióval arányos mértékben változott, a megközelítés azonban a szabályozás pontos menetére nem enged további következtetéseket levonni.

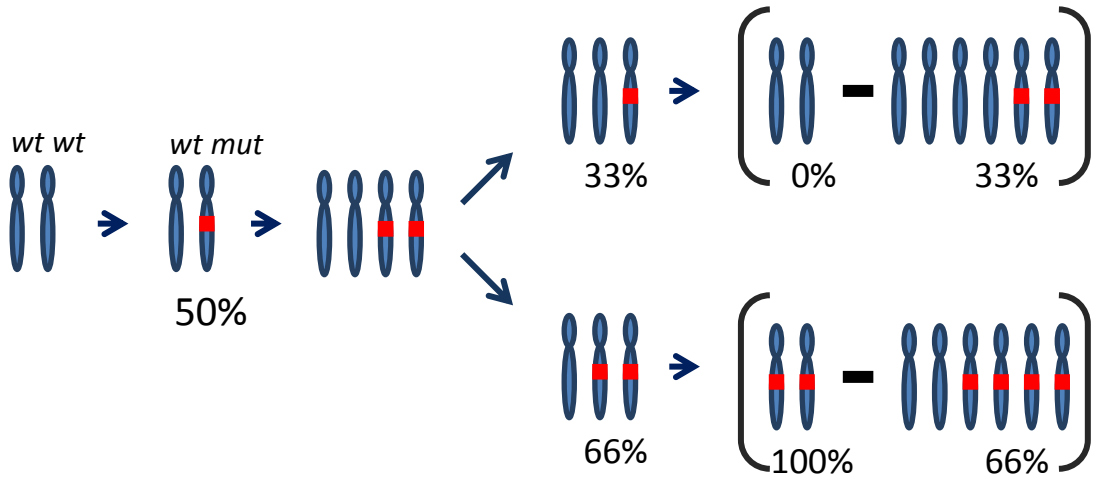
A tényleges kináz expresszió a mechanizmustól függetlenül célpontot kínál az Aurora-gátlókkal végzett kezelések számára. Az Aurora-kinázok is különösen azóta állnak az az érdeklődés középpontjában, amióta a farmakológiai kísérletekben (és újabban a korai klinikai tanulmányokban) a kináz ellen kifejlesztett kis molekula jellegű hatóanyagok ígéretes hatékonyságot mutattak [227;228]. Újabban léteznek az általános kinázgátló molekulák mellett szelektív AuA és AuB inhibitorok is [229;230]. Az elképzelések szerint a mitotikus kinázok gátlásával a sejtosztódás több pontja sérül a korábban leírt mechanizmusoknak megfelelően, amely az osztódó tumorsejtekben mitotikus katasztrófához és sejtpusztuláshoz vezet [231]. Ezen túl a genetikailag instabil, p53 deficiens daganatsejtek elvileg akár még érzékenyebbek is lehetnek a gátló hatásra.

Pillanatnyilag azonban még tisztázatlan, hogy mely daganattípusok és -sejtek lesznek az esetleges Aurora-blokkolók igazi indikációi. Nem világos, hogy az Aurora-kináz inhibitor hatás a fokozott kináz expresszióval rendelkező daganatokban jobban érvényesül-e, vagyis a kináz overexpresszió prediktív biológiai/patológiai tényezővé válhat-e. Mindezek miatt az

AuB expresszió standardizált vizsgálata előtérbe került. Munkáinkban a szöveti szintű expresszió egyik kényes kérdésének, a relatív fehérjeexpresszió meghatározásnak vizsgálatával egy esetleges predikciót szolgáló immunhisztokémiai teszt alapjait is le kívántuk fektetni.

5.6. Az aneuploidia és az allélikus heterogenitás összefüggése és hatása a tumorgenom stabilitására

A többféle mechanizmus eredményeképpen létrejövő aneuploidia a tumorigenezis/tumorprogresszió során végbemenő genomikus átrendeződés talán legmarkánsabb megnyilvánulása. Saját vizsgálatainkban is gyakran észleltük, hogy a kópiaszám változások egyéb szegmentális, strukturális eltérésekkel, vagy éppenséggel génmutációkkal együtt jelentkeznek. A progresszió során hirtelen, egylépcsős, és lassú fokozatos átrendeződések is megfigylhetők, melyek duplikációk és a vesztések egész sorát eredményezhetik. A ploidia és a szubkromoszomális, szekvenciális eltérések (mutációk) nyilvánvalóan egymásra is nagy hatással vannak, melyek eredményeképpen különböző genetikával rendelkező szubklónok jönnek létre. Mint a neuroblasztóma vizsgálatainkban is tapasztaltuk, a fő (driver) eltérések jelentős része stabil és klonális marad a disszeminációs folyamat teljes ideje alatt. Ugyanakkor ismert és gyakori jelenség, hogy egy (driver) mutáció (pl. KRAS) a daganatsejtekben csak alacsony mértékben reprezentált. Az egyes daganatokban mennyiségileg meghatározva (pl. allélspecifikus PCR) a mutáció aránya (mutáns/vad allél) valóban ritkán éri el az elméletileg számított 50%-ot, amihez a normál sejtek szükségszerű kontaminációja mellett az intratumorális allélheterogenitás is hozzájárul. Aneuploid sejtpopulációkban a kromoszóma/kópiaszám függvényében akár sejtről-sejtre is változhat a mutáns/vad allélarány. Felfogásunk szerint minél inkább aneuploid tehát a daganat és minél változatosabb az osztódási hibák sora, annál valószínűbb statisztikailag a mutáns allélokra vonatkozó heterogenitás (30. ábra).



30. ábra. Gén mutációk allélikus hetergenitásának modellje aneuploid daganatsejt populációkban. Az allélek/kromoszómák kópiaszámának emelkedésével a mutáns gén (pirossal jelezve) relatív mennyisége sejtenként különbözővé válik és az allélek újraeloszlása kapcsán sejtciklusonként változik. A mutáns allél teljes elvesztése (0%) akár a vad genotípusú sejtek ismételt megjelenéséhez és jelentősebb tumor heterogenitás kialakulásához is vezethet, amennyiben a szubklón életképes marad.

Az intratumorális, intercelluláris heterogenitás magyarázatára kézenfekvő az instabil aneuploidia megjelenése, mely az allélek gyakoriságának dinamikus alakulását és a mutáns/vad arány jelentős sejtenkénti eltéréseit is eredményezheti. Külön jelentőséget kaphat mindez a mutációk klinikai interpretációja kapcsán, hiszen ugyanannak a neoplasztikus folyamatnak a sejtjei a genom újrarendeződését követően, heterogén genotípust mutatva, a célzott anti-tumor kezelésre teljesen eltérően reagálhatnak.

5.7. Perspektívák a genomikai heterogenitás megismerésében

Az aneuploidia és a genetikai heterogenitás tanulmányozása és a progresszióval összefüggő esetleges oda/visszahatások mára a daganatbiológia egyik legizgalmasabb kérdésévé váltak. A kópiaszám és DNS-bázis eltérések párhuzamos és teljeskörű vizsgálata intenzív technológiai fejlődés után a legújabb genomikai módszerekkel igen nagy precizitással, teljes mélységében lehetséges. A teljes exom amplifikálásának és szekvenálásának rutinná vált lehetőségével ezek az eltérések sejtpopuláció szintjén szépen megadhatók, az új generációs szekvenálás (NGS) eredménye azonban a sejtekre jellemző átlagos szekvencia eltéréseket tükrözi. Mint munkáinkban mi is többszörösen felhívtuk rá a figyelmet, a populációkat igen jelentős heterogenitás jellemezheti. Ezért az egyes sejtek, sejtklónok vizsgálatára nagy reményeket fűznek az egysejt-szekvenálás módszeréhez (single cell sequencing), amely a

sejtpopulációt alkotó izolált sejtek nagyfelbontású genomikai vizsgálatát és a mutációk sejtenkénti kimutatását teszi lehetővé [232]. Ezzel az új módszerrel az egyes sejtek genomjainak összehasonlítása révén a sejtek/sejtklónok közötti kapcsolatot és fejlődési utakat soha nem látott részletességgel, nukleotid szinten lehet jellemezni, beleértve a fehérjét kódoló és a nem kódoló szekvenciákat is [233]. Mindez azonban még hosszabb technikai és bioinformatikai fejlesztést és módszertant is igényel. Jelenleg a hatékonyan szekvenálható 10-100 sejtes populációk vizsgálata során is hatalmas mennyiségű genomikai információ kerül kinyerésre. Az alacsonyan reprezentált, 5%-nál ritkábban előforduló heterogén jellegzetességek ugyanakkor ilyen sejtszám mellett egyelőre nemigen célozhatók meg [234].

Az új generációs DNS-szekvenálás technológiai igénye a korábbi évtizedek módszereire, eredményeire alapozva fogalmazódott meg. A genetikai háttér, így a heterogenitás kérdésének megismeréséhez rendkívüli mértékben hozzájárultak az in situ, szövettani szintű genetikai/genomikai vizsgálómódszerek. Ezek nagy része mára kiforrott, rutin eljárás. A szöveti mérések, az in situ hibridizációs eljárások klinikailag fontos markerek kimutatásában segítenek, a patológiai diagnosztika részévé váltak. Az egyes sejtek jellemzésére ezek a módszerek továbbra is hatékonyak és maradnak is a jövőben, különösen, ha az újonnan felmerülő, gyakorlati kérdések hatására fejlesztésük folyamatos marad.

6. Összefoglalás

Az aneuploidia, azaz a daganatos genom mennyiségi elváltozása a malignus transzformáció egyik legmarkánsabb jellegzetessége, hátterében számos mechanizmus meghúzódik. A kromoszómák számának változása mellett azonban kiterjedt szegmentális kromoszómahibák és rövid, nukleotid szintű eltérések is megjelennek. Ezek egy része a jelenlegi ismereteink szerint a kromoszómák szegregációs defektusa, a sejtosztódás hibája miatt jön létre, melynek oka lehet eddig ismeretlen eredetű endogén genomikus, genotoxikus és vírus által indukált. A durva genomeltérések eredményeképpen szövettanilag, citológiailag is észlelhető sejt, sejtmag elváltozások jelentkeznek, melyek a diszplasztikus, neoplasztikus sejtek azonosítására klinikai mintákban is alkalmasak. A masszív aneuploidia szöveti megnyilvánulásaként tumoros óriássejtek képződnek, az osztódási defektusok morfológiai szinten atípusos, multipoláris mitózisok formájában azonosíthatók.

A molekuláris citogenetika elérhetővé válásával és az egyes sejtkomponensek immunmorfológiai kimutathatóságával a kromoszóma hibák jellege és gyakorisága, az aneuploidia kialakulásában szerepet játszó patológiás mechanizmusok szöveti, citológiai körülmények között is vizsgálhatóvá váltak. A biológiai folyamatok egymásra épülését több módszer párhuzamos alkalmazásával kívántuk munkáinkban követni, melyhez a digitális mikroszkópia különböző formái jelentős támogatást nyújtottak. Vizsgálatainkhoz a kombinált in situ metodikák egész sorát kísérleteztük és próbáltuk ki, így sikerrel alkalmaztuk a lézer scanning citometriát (LSC) a daganatsejtek DNS-tartalmának, receptroexpressziójának és kromoszomális összetételének jellemzésére. Automatizált mikroszkópos immunfluoreszcens és FISH (AIPF) vizsgálatainkban az immunfenotípus alapján azonosított ritka daganatsejtek genetikáját és funkcionális állapotát elemeztük. Metodikai fejlesztéseket végeztünk a FISH reakció protokolljának gyorsítására (egynapos FISH) és a FISH jelek digitális azonosításának és kiértékelésének megkönnyítésére. Egyes mutációk összetett szöveti környezetben való kimutatása igen hatékonynak bizonyult a mutáns fehérje elleni specifikus antitest immunhisztokémiai alkalmazásával.

A LSC alkalmazások segítségével nagyobb számú klinikai cervix citológiai mintában igazoltuk a nagyrizikójú diszplázia (H-SIL), az onkogén humán papillomavírus fertőzés és az aneuploidia jelensége közötti összefüggést. A megvizsgált esetekben a vírus asszociált poliploidizáció és aneuploidia random jeleit észleltük. A 9c feletti DNS-tartalommal rendelkező „magasan aneuploid”óriássejtek ugyanakkor a progresszív elváltozásokra voltak jellemzőek, prediktív marker jellegüket a klinikai kimenetel is alátámasztotta. A DNS-index

alapján kiszűrt >9c aneuploid sejtek egy részében célzott FISH vizsgálatainkkal klonális jellegű kromoszomális eltéréseket igazoltunk, melyeket szokványos feldolgozás mellett nem lehetett kimutatni. A diszplázia nagyfokú heterogenitásában méréseinkkel ki tudtuk szűrni a klonális neoplasztikus proliferáció jeleit.

A hematogén úton szóródott, a vérben, csontvelőben előforduló ritka dagantsejtek azonosítására az AIPF módszert alkalmaztuk. Neuroblasztómás betegek csontvelő vizsgálata során 10^{-6} érzékenységgel lehetett tumorsejteket találni, melyek genetikai elemzése sorozatos FISH alkalmazásával lehetséges volt. A diagnóziskor és a kezeléseket követően vett mintákban a primer tumor genetikai jellegzetességei (NMYC, del1p36, 17q sokszorozódás) lényegében egységesen jelen voltak, azaz a disszemináció során az alapvető (driver) eltérésekre nézve heterogenitás nem állt fenn. A pusztuló, klinikailag kérdéses relevanciájú disszeminált tumorsejteket módszerünkkel elkülönítve tudtuk elemezni neuroblasztómás és emlőrák sejtek szóródása során.

További vizsgálatainkban az aneuploidia és genom instabilitás hátterében potenciálisan meghúzódó mitotikus hibák természetét vizsgáltuk részletesen. Ezen belül a kromoszóma szegregáció és a sejtosztódás egyik fő effektorának, az Aurora B kináznak az expresszióját, az AURKB lókusz állapotát és a daganatra való hatását tanulmányoztuk emlőrákban és agresszív limfómában. Eredményeink az AuB és a sejtproliferáció szoros összefüggését mutatták, ami a G2+M fázis reprezentációjából adódik. Az overexpresszió megítélésére ezért bevezettük a sejtproliferációval korrigált AuB pozitivitás fogalmát, amit az AuB és a proliferációs frakciót megadó Mib1 expresszió hányadosa képvisel (AMI). Az AMI alapján meghatározott AuB overexpresszió mértéke jelentős, de elmarad a szakirodalomban megjelentnél. Az overexpresszió hátterében az AURKB lókusz kópiaeltéréseit nem tudtuk igazolni. Az AURKB és a TP53 lókusz kodeléciója viszont a 17-es kromoszóma aneuszómia esetén volt tapasztalható, mely az Aurora B, a p53 deficiencia és az aneuploidia közötti szorosabb összefüggésekre hívja fel a figyelmet.

Eredményeink arra világítanak rá, hogy a daganatprogresszió során a genom dinamikus változása és az ebből eredő heterogenitás jelentős mértékben az aneuploidiához kapcsolódóan jön létre. A kezdeti érdeklődést követően a genomikus DNS és a kromoszómák mennyiségi változása vesztett klinikai-diagnosztikai jelentőségéből, de a ploiditás egyes elemeinek és a molekuláris mechnizmusok megértésének hatására teljesen új szemlélet van kibontakozóban, az kromoszomális instabilitás jelensége önmagában terápiás célponttá vált. A folyamatok részletes vizsgálata sejtszinten automatizált digitális mikroszkópos segítséggel hatékony formában történhet.

7. Irodalomjegyzék

1) Vogelstein B, Kinzler KW (2004): Cancer genes and the pathways they control
Nature Med, 10: 789 - 799
2) Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation
Cell; 144(5):646-74.
3) Loeb LA, Monnat RJ Jr. (2008): DNA polymerases and human disease
Nat Rev Genet; 9(8):594-604.
4) Lupski JR (2007): Genomic rearrangements and sporadic disease
Nature Genet, 39(7):S43 - S47
5) Jabbour E, Kantarjian H (2014): Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management
Am J Hematol; 89(5):547-56.
6) Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC et al. (2014): Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia
N Engl J Med; 371(11):1005-15.
7) Kelleher FC, Thomas DM (2012): Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours
Clin Sarcoma Res;2(1):6.
8) Bagg A (2006): Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements: minding your B's and T's in assessing lineage and clonality in neoplastic lymphoproliferative disorders
J Mol Diagn;8(4):426-9; quiz 526-7.
9) Pihan GA. (2013): Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprograming in cancer
Front Oncol; 3:277.
10) Schvartzman JM, Sotillo R, Benezra R. (2010): Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease
Nat Rev Cancer; 10(2):102-15.
11) Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA. (2010): Mechanisms of chromosomal instability
Curr Biol; 20(6):R285-95.

12) Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, Toretsky JA, Rosenberg SA, Shukla N, Ladanyi M, Samuels Y, James CD, Yu H, Kim JS, Waldman T. (2011): Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer
Science; 333(6045):1039-43.

13) Nowel PC, Hungerford DA. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia
Science; 142:1497.

14) Bolland DJ, Wood AL, Corcoran AE (2009): Large-scale chromatin remodeling at the immunoglobulin heavy chain locus: a paradigm for multigene regulation
Adv Exp Med Biol; 650:59-72.

15) Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G (2004): Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation
Cytogenet Genome Res; 104(1-4):14-20.

16) Davis AJ, Chen DJ (2013): DNA double strand break repair via non-homologous end-joining
Transl Cancer Res; 2(3):130-143.

17) Mladenov E, Iliakis G (2011): Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways
Mutat Res; 711(1-2):61-72.

18) Kolodner RD, Putnam CD, Myung K. (2002): Maintenance of genome stability in Saccharomyces cerevisiae
Science; 297(5581):552-7.

19) Assaf C. Bester, Maayan Roniger, Yifat S. Oren, Michael M. Im, Dan Sarni, Malka Chaoat, Aaron Bensimon, Gideon Zamir, Donna S. Shewach, Batsheva Kerem: Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development
Cell; 145:435-446

20) McClintock B (1941): The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays
Genetics; 26(2): 234–282.

21) O'Sullivan, R.J. and Karlseder, J. (2010) Telomeres: protecting chromosomes against genome instability
Nat Rev Mol Cell Biol; 11:171-181.

22) Heng HH, Bremer SW, Stevens J, Ye KJ, Miller F, Liu G, Ye CJ (2006): Cancer progression by non-clonal chromosome aberrations

J Cell Biochem; 98(6):1424-35.

23) Holland AJ, Cleveland DW (2012): Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements
Nat Med; 18(11):1630-8.

24) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors
Science; 258(5083):818-21.

25) Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation
Mol Pathol; 52(5):243-51.

26) Imataka G, Arisaka O (2012): Chromosome analysis using spectral karyotyping (SKY)
Cell Biochem Biophys; 62(1):13-7.

27) Weimer J, Koehler MR, Wiedemann U, Attermeyer P, Jacobsen A, Karow D, Kiechl M, Jonat W, Arnold N (2001): Highly comprehensive karyotype analysis by a combination of spectral karyotyping (SKY), microdissection, and reverse painting (SKY-MD)
Chromosome Res; 9(5):395-402.

28) Pan Y, Kytölä S, Farnebo F, Wang N, Lui WO, Nupponen N, Isola J, Visakorpi T, Bergerheim US, Larsson C (1999): Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping
Cytogenet Cell Genet; 87(3-4):225-32.

29) Roschke AV, Tonon G, Gehlhaus KS, McTyre N, Bussey KJ, Lababidi S, Scudiero DA, Weinstein JN, Kirsch IR (2003): Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel
Cancer Res; 63(24):8634-47.

30) Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, Taillon BE et al.(2007): Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome
Science; 318(5849):420-6.

31) Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, et al. (2009): Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes
Nature; 462:1005–1010

32) Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, et al. (2011): Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development
Cell; 144(1):27-40.

33) Jones MJ, Jallepalli PV (2012): Chromothripsis: chromosomes in crisis
Dev Cell; 23(5):908-17.

34) Maher CA, Wilson RK (2012): Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process
Cell; 148(1-2):29-32.

35) Kloosterman WP, Hoogstraat M, Paling O, Tavakoli-Yaraki M, Renkens I, Vermaat JS, van Roosmalen MJ, van Lieshout S, Nijman IJ, Roessingh W, van 't Slot R, van de Belt J, Guryev V, Koudijs M, Voest E, Cuppen E (2011): Chromothripsis is a common mechanism driving genomic rearrangements in primary and metastatic colorectal cancer
Genome Biol; 12(10):R103.

36) Przybytkowski E, Lenkiewicz E, Barrett MT, Klein K, Nabavi S, Greenwood CM, Basik M (2014): Chromosome-breakage genomic instability and chromothripsis in breast cancer
BMC Genomics; 15:579.

37) Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M, et al. (2013): Punctuated evolution of prostate cancer genomes
Cell; 153(3):666-77.

38) Shen MM (2013): Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome
Cancer Cell; 23(5):567-9.

39) Ballas LK, Hu BR, Quinn DI (2014): Chromoplexy and hypoxic microenvironment drives prostate cancer
Lancet Oncol;15(13):1419-21.

40) Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, Fraser M, Ross-Adams H, Erho N, at al (2014): Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study
Lancet Oncology; 15(13):1521–1532

41) von Hansemann, D. (1890): Ueber asymmetrische Zelltheilung in epithel Krebsen und deren biologische Bedeutung
Virchow's Arch Path Anat; 119:299

42) von Hansemann D. (1891): Ueber patologische Mitosen.
Arch Pathol Anat Phys Klin Med; 119: 299-326

43) Mitelman F, Johansson B, Mertens F (Eds.) (2015): Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer
http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman

44) Nigg EA (2001): Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints
Nat Rev Mol Cell Biol; 2(1):21-32.

45) Fu J, Bian M, Liu J, Jiang Q, Zhang C. (2009): A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function
Proc Natl Acad Sci U S A;106(17):6939-44.

46) Hans F, Skoufias DA, Dimitrov S, Margolis RL. (2009): Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B
Mol Biol Cell;20(15):3491-502.

47) Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. (2007): Chromosomal passengers: conducting cell division
Nat Rev Mol Cell Biol; 8(10):798-812.

48) Vader G, Lens SM. (2008): The Aurora kinase family in cell division and cancer
Biochim Biophys Acta; 1786(1):60-72.

49) Gadea BB, Ruderman JV. (2006): Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin
Proc Natl Acad Sci U S A; 103 (12): 4493-8.

50) Liu D, Lampson MA. (2009): Regulation of kinetochore-microtubule attachments by Aurora B kinase
Biochem Soc Trans; 37(Pt 5):976-80.

51) Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, Jiang T, Li Q, Neve RM, Gray JW, Cai WW, Balmain A (2007): Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice
Cancer Cell; 11(2):161-73.

52) Chiang CM (2012): p53-Aurora A mitotic feedback loop regulates cell cycle progression and genomic stability

Cell Cycle; 11(20):3719-20.

53) Bodvarsdottir SK, Hilmarsdottir H, Birgisdottir V, Steinarsdottir M, Jonasson JG, Eyfjord JE (2007): Aurora-A amplification associated with BRCA2 mutation in breast tumours
Cancer Lett; 248(1):96-102.

54) Staff S, Isola J, Jumppanen M, Tanner M (2010): Aurora-A gene is frequently amplified in basal-like breast cancer
Oncol Rep; 23(2):307-12.

55) Hienonen T, Salovaara R, Mecklin JP, Järvinen H, Karhu A, Aaltonen LA (2006): Preferential amplification of AURKA 91A (Ile31) in familial colorectal cancers
Int J Cancer;118(2):505-8.

56) Nishida N, Nagasaka T, Kashiwagi K, Boland CR, Goel A (2007): High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers
Cancer Biol Ther; 6(4):525-33.

57) Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak BA (2002): mplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer
J Natl Cancer Inst; 94(17):1320-9.

58) Lassus H, Staff S, Leminen A, Isola J, Butzow R (2011): Aurora-A overexpression and aneuploidy predict poor outcome in serous ovarian carcinoma
Gynecol Oncol; 120(1):11-7.

59) Zhu J, Abbruzzese JL, Izzo J, Hittelman WN, Li D (2005): AURKA amplification, chromosome instability, and centrosome abnormality in human pancreatic carcinoma cells
Cancer Genet Cytogenet; 159(1):10-7.

60) Ye D, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Xiao L, Vadhan-Raj S, Fernandez MH, Nguyen MH, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. (2009): Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia
J Hematopath;2(1):2-8.

61) Heredia FF, de Sousa JC, Carvalho AF, Magalhaes SM, Pinheiro RF (2012): Aurora-B expression may not contribute to disease progression: a reflection of the heterogeneous pathogenesis?
Haematologica; 97(10):e37-9.

62) Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002): Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells
EMBO J; 21(4):483-92.

63) Tao Y, Leteur C, Calderaro J, Girdler F, Zhang P, Frascogna V, Varna M, Opolon P, Castedo M, Bourhis J, Kroemer G, Deutsch E (2009): The aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe
Cell Cycle; 8(19):3172-81.

64) Gully CP, Zhang F, Chen J, Yeung JA, Velazquez-Torres G, Wang E, Yeung SC, Lee MH (2010): Antineoplastic effects of an Aurora B kinase inhibitor in breast cancer
Mol Cancer; 9:42.

65) Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N (2004): High expression of Aurora-B/Aurora and Ipll-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas
J Neurooncol;67(1-2):53-64.

66) 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.

67) 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.

68) 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.

69) 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.

70) 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.

71) Archambault V, Lépine G, Kachaner D (2015): Understanding the Polo Kinase machine
Oncogene; doi: 10.1038/onc.2014.451.

72) Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, Ferris DK. (1997): Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase
Biochem Biophys Res Comm; 234(2):397-405.

73) Eckerdt F, Yuan J, Saxena K, Martin B, Kappel S, Lindenau C, Kramer A, Naumann S, Daum S, Fischer G, Dikic I, Kaufmann M, Strebhardt K. (2005): Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells
J Biol Chem; 280(44):36575-83.

74) Fry AM, Meraldi P, Nigg EA. (1998): A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators
EMBO J; 17(2):470-81.

75) Mayor T, Hacker U (2002): The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles
J Cell Sci; 115(Pt 16):3275-84.

76) Hayward DG, Clarke RB, Faragher AJ, Pillai MR, Hagan IM, Fry AM. (2004): The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer
Cancer Res; 64(20):7370-6.

77) Goldenson B, Crispino JD (2015): The aurora kinases in cell cycle and leukemia
Oncogene;34(5):537-545.

78) Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JM, Miller KM. (2004): VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo
Nat Med; 10(3):262-7.

79) Mehra R, Serebriiskii IG, Burtness B, Astsaturov I, Golemis EA (2013): Aurora kinases in head and neck cancer
Lancet Oncol; 14(10):e425-35. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70128-1.

80) Umene K, Banno K, Kisu I, Yanokura M, Nogami Y, Tsuji K, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, Nomura H, Tominaga E, Susumu N, Aoki D (2013):

Aurora kinase inhibitors: Potential molecular-targeted drugs for gynecologic malignant tumors
Biomed Rep;1(3):335-340.

81) Boveri, Th. (1904). Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zelkerns
G.Fisher, Jena.

82) Chan JY. (2011): A clinical overview of centrosome amplification in human cancers
Int J Biol Sci; 7(8):1122-44.

83) Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K. (1999): Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression
Oncogene; 18(11):1935-44.

84) Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schröck E, Neumann T, Jauho A, Auer G, Ried T. (2000): Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations
Genes Chromosomes Cancer; 27(2):183-90.

85) Nigg EA. (2002): Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?
Nat Rev Cancer; 2(11):815-25.

86) Storchova Z, Pellman D. (2004): From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer
Nat Rev Mol Cell Biol; 5(1):45-54.

87) Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. (1998): Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors
Cancer Res; 58(17):3974-85.

88) Lingle WL, Salisbury JL. (1999): Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors
Am J Pathol.; 155(6):1941-51.

89) Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. (2000): The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle
Proc Natl Acad Sci U S A; 29;97(18):10002-7.

90) Gisselsson D, Håkanson U, Stoller P, Marti D, Jin Y, Rosengren AH, Stewénius Y, Kahl F, Panagopoulos I. (2008): When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses
PLoS One; 3(4):e1871

91) Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. (2011): Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability
Nat Rev Mol Cell Biol; 12(6):385-92.

92) Kimura M, Yoshioka T, Saio M, Banno Y, Nagaoka H, Okano Y (2013): Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins
Cell Death Dis; 4:e603. doi: 10.1038/cddis.2013.108.

93) Brinkley BR. (2001): Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division
Trends Cell Biol; 11(1):18-21.

94) Lingle WL, Salisbury JL. (1999): Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors
Am J Pathol; 155(6):1941-51.

95) Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJ, Ramaekers FC. (2004): Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities
J Pathol; 202(1):23-33.

96) Lu X, Lin Q, Lin M, Duan P, Ye L, Chen J, Chen X, Zhang L, Xue X. (2014): Multiple-integrations of HPV16 genome and altered transcription of viral oncogenes and cellular genes are associated with the development of cervical cancer
PLoS One; 9(7):e97588.

97) 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.

98) 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.

99) Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Hopfenmüller W, Foss HD, Stein H, Kühn W. (2007): The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer
J Clin Pathol; 60(6):649-55.

100) Moureau-Zabotto L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefranc JP, Antoine M, Genestie C, Deniaud-Alexandre E, Bernaudin JF, Touboul E, Fleury-Feith J. (2005): Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer
Breast Cancer Res Treat; 91(1):61-71.

101) Pinto AE, Pereira T, Santos M, Branco M, Dias A, Silva GL, Ferreira MC, André S. (2013): DNA ploidy is an independent predictor of survival in breast invasive ductal carcinoma: a long-term multivariate analysis of 393 patients
Ann Surg Oncol; 20(5):1530-7.

102) Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. (1998): Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity
Proc Natl Acad Sci U S A; 95(6):2950-5.

103) Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H, Okano Y. (1999): Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast
Cancer Res; 59(9):2041-4.

104) Arnerlöv C, Emdin SO, Cajander S, Bengtsson NO, Tavelin B, Roos G. (2001): Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer
Anal Cell Pathol; 23(1):21-8.

105) Yasa MH, Bektas A, Yukselen V, Akbulut H, Camci C, Ormeci N. (2005): DNA analysis and DNA ploidy in gastric cancer and gastric precancerous lesions
Int J Clin Pract; 59(9):1029-33.

106) Jiang F, Caraway NP, Sabichi AL, Zhang HZ, Ruitrok A, Grossman HB, Gu J, Lerner SP, Lippman S, Katz RL (2003): Centrosomal abnormality is common in and a potential biomarker for bladder cancer
Int J Cancer; 106(5):661-5.

107) Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO, Lukens J (2000): Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study

J Clin Oncol;18(3):477-86.

108) Hero B, Simon T, Spitz R, Ernestus K, Gnekow AK, Scheel-Walter HG, Schwabe D, Schilling FH, Benz-Bohm G, Berthold F (2008): Localized infant neuroblastomas often show spontaneous regression: results of the prospective trials NB95-S and NB97
J Clin Oncol; 26(9):1504-10.

109) Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B (2005): EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations
Mod Pathol; 18(8):1027-33.

110) Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C (2011): HER2 testing in gastric cancer
Adv Anat Pathol; 18(1):53-9.

111) Park YS, Hwang HS, Park HJ, Ryu MH, Chang HM, Yook JH, Kim BS, Jang SJ, Kang YK (2012): Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use?
Hum Pathol; 43(3):413-22.

112) Ott G, Rosenwald A, Campo E (2013): Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification
Hematology Am Soc Hematol Educ Program; 2013:575-83.

113) Hollmann TJ, Hornick JL (2011): INI1-deficient tumors: diagnostic features and molecular genetics
Am J Surg Pathol; 35(10):e47-63.

114) Sjögren S, Inganäs M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J (1996): The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry
J Natl Cancer Inst; 88(3-4):173-82.

115) Bonnefoi H, Ducraux A, Movarekhi S, Pelte MF, Bongard S, Lurati E, Iggo R (2002): p53 as a potential predictive factor of response to chemotherapy: feasibility of p53 assessment using a functional test in yeast from trucut biopsies in breast cancer patients
Br J Cancer; 86(5):750-5.

116) Marchiò C, Lambros MB, Gugliotta P, Di Cantogno LV, Botta C, Pasini B, Tan DS, Mackay A, Fenwick K, Tamber N, Bussolati G, Ashworth A, Reis-Filho JS, Sapino A

(2009): Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis
J Pathol; 219(1):16-24.

117) Jiang H, Bai X, Zhao T, Zhang C, Zhang X (2014): Fluorescence in situ hybridization of chromosome 17 polysomy in breast cancer using thin tissue sections causes the loss of CEP17 and HER2 signals
Oncol Rep; 32(5):1889-96.

118) Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaft PL, Wiley JC, Kussick SJ, Gown AM (2011): Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy
J Clin Oncol; 29(31):4168-74.

119) Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G (2014): HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity
Mod Pathol; 27(1):4-18.

120) Liang Z, Zeng X, Gao J, Wu S, Wang P, Shi X, Zhang J, Liu T (2008): Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients
BMC Cancer; 8:363.

121) Ciesielski M, Kruszewski WJ, Smiałek U, Walczak J, Szajewski M, Szefel J, Wydra J, Kawecki K (2014): The HER2 Gene and HER2 Protein Status and Chromosome 17 Polysomy in Gastric Cancer Cells in Own Material
Appl Immunohistochem Mol Morphol. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000070

122) Wilkinson DG (1998): In situ hybridization - a practical approach
Oxford, University Press, New York

123) Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z (2013): Laser scanning cytometry: principles and applications-an update
Methods Mol Biol; 931:187-212.

124) Wollman R, Stuurman N (2007): High throughput microscopy: from raw images to discoveries
J Cell Sci; 120(Pt 21):3715-22.

125) 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.

126) 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.

127) 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.

128) 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.

129) Kayser G, Kayser K (2013): Quantitative pathology in virtual microscopy: history, applications, perspectives
Acta Histochem;115(6):527-32.

130) 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.

131) Bollmann R, Méhes G (2004): Analysis of tissue imprints by scanning laser cytometry
Curr Protoc Cytom; Chapter 7:Unit 7.22.

132) Ambros PF, Méhes G. (2004): Combined immunofluorescence and FISH: new prospects for tumor cell detection/identification
Curr Protoc Cytom; Chapter 8:Unit 8.13.

133) Bayani J, Squire JA (2004): Fluorescence in situ Hybridization (FISH)
Curr Protoc Cell Biol;Chapter 22:Unit 22.4. doi: 10.1002/0471143030.cb2204s23

134) Hegyi K, Lonborg 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.

135) Bedekovics J, Szeghalmy S, Beke L, Fazekas A, Méhes G (2014): Image analysis of platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFRβ) expression to determine the grade and dynamics of myelofibrosis in bone marrow biopsy samples
Cytometry B Clin Cytom;86(5):319-28.

136) Krutsay M (1980): Szövettani technika
Medicina Könyvkiadó, Budapest, ISBN-szám: 963-240-688-5

137) Reznicek L, Stumpf C, Seidensticker F, Kampik A, Neubauer AS, Kernt M (2014): Role of wide-field autofluorescence imaging and scanning laser ophthalmoscopy in differentiation of choroidal pigmented lesions
Int J Ophthalmol;7(4):697-703.

138) Lee CS, Lee AY, Forooghian F, Bergstrom CS, Yan J, Yeh S (2014): Fundus autofluorescence features in the inflammatory maculopathies
Clin Ophthalmol;8:2001-12.

139) Kara MA, Smits ME, Rosmolen WD, Bultje AC, Ten Kate FJ, Fockens P, Tytgat GN, Bergman JJ (2005): A randomized crossover study comparing light-induced fluorescence endoscopy with standard videoendoscopy for the detection of early neoplasia in Barrett's esophagus
Gastrointest Endosc;61(6):671-8.

140) Falk GW (2009): Autofluorescence endoscopy
Gastrointest Endosc Clin N Am.;19(2):209-20.

141) Dowson JH (1973): Quantitative histochemical studies of changes in the intensity of formaldehyde-induced fluorescence and autofluorescence during storage of tissue sections
Histochemie;37(1):75-9.

142) Fellner MJ, Chen AS, Mont M, McCabe J, Baden M (1979): Patterns and intensity of autofluorescence and its relation to melanin in human epidermis and hair
Int J Dermatol;18(9):722-30.

143) Dayan D, David R, Buchner A (1979): Lipofuscin in human tongue muscle
J Oral Pathol;(2):121-5.

144) del Castillo P, Molero ML, Ferrer JM, Stockert JC (1896): Autofluorescence and induced fluorescence in Epon embedded tissue sections
Histochemistry;85(5):439-40.

145) Harris DM, Werkhaven J (1987): Endogenous porphyrin fluorescence in tumors
Lasers Surg Med;7(6):467-72.

146) Tsuchida M, Miura T, Aibara K (1987): Lipofuscin and lipofuscin-like substances
Chem Phys Lipids.;44(2-4):297-325.

147) Méhes Gabor, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur automatichen analyse von biologischen proben

Graz, Oridis Biomed Forschungs- und Entwicklungs GmbH
http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062444

148) Méhes Gabor, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur bestimmung der relevanz von probenarraypraparaten
Graz, Oridis Biomed Forschungs- und Entwicklungs GmbH
http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062443

149) Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P et al. (2012): Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib
N Engl J Med; 366(8):707-14.

150) Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, Pusch S, Mechtersheimer G, Zentgraf H, von Deimling A (2011): Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody
Acta Neuropathol; 122(1):11-9.

151) Rössle M, Sigg M, Rüschoff JH, Wild PJ, Moch H, Weber A, Rechsteiner MP (2013): Ultra-deep sequencing confirms immunohistochemistry as a highly sensitive and specific method for detecting BRAF V600E mutations in colorectal carcinoma
Virchows Arch; 463(5):623-31.

152) Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, Rodriguez-Galindo C, Rollins BJ (2012): Recent advances in the understanding of Langerhans cell histiocytosis
Br J Haematol;156(2):163-72.

153) Minkov M (2011): Multisystem Langerhans cell histiocytosis in children: current treatment and future directions
Paediatr Drugs; 13(2):75-86.

154) zur Hausen H (1996): Papillomavirus infections--a major cause of human cancers
Biochim Biophys Acta;1288(2):F55-78.

155) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide
J Pathol;189(1):12-9.

156) zur Hausen H (2009): The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture)
Angew Chem Int Ed Engl;48(32):5798-808.

157) Nguyen HP, Ramírez-Fort MK, Rady PL (2014): The biology of human papillomaviruses
Curr Probl Dermatol;45:19-32.

158) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N (2002): The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology
JAMA.;287(16):2114-9.

159) Zielinski GD, Snijders PJF, Rozendaal L, et al. (2001): High-risk HPV testing iin women with borderline and mild dyskeryosis: long-term follow-up data and clinical relevance
J Pathol; 193:1-8.

160) Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J (2009): Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis
Public Health Genomics;12(5-6):268-80.

161) 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.

162) 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.

163) 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.

164) Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Filion M, Brochu P, Simard P, Russo PA, Yotov WV (1998): A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens
Diagn Mol Pathol; 7:317-323.

165) Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK (2000): Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study
J Clin Oncol;18(24):4067-76.

166) Cheung NK, Von Hoff DD, Strandjord SE, Coccia PF (1986): Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies
J Clin Oncol;4(3):363-9.

167) Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger RC (1991): Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma
N Engl J Med;324(4):219-26.

168) Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK, Schlichting E, Qvist H, Naume B (1998): Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase
J Pathol;185(4):427-34.

169) Tonini GP, Romani M (2003): Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma
Cancer Lett.;197(1-2):69-73.

170) Gisselsson D, Lundberg G, Ora I, Höglund M (2007): Distinct evolutionary mechanisms for genomic imbalances in high-risk and low-risk neuroblastomas
J Carcinog;6:15.

171) Ambros PF, Ambros IM, Kerbl R, Luegmayr A, Rumpler S, Ladenstein R, Amann G, Kovar H, Horcher E, De Bernardi B, Michon J, Gadner H (2001): Intratumoural heterogeneity of 1p deletions and MYCN amplification in neuroblastomas
Med Pediatr Oncol;36(1):1-4.

172) Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N (1999): Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma
N Engl J Med;340(25):1954-61.

173) Tonini GP, Longo L, Coco S, Perri P (2003): Familial neuroblastoma: a complex heritable disease
Cancer Lett;197(1-2):41-5.

174) Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO, Lukens J (2000): Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study
J Clin Oncol;18(3):477-86.

175) Cheung NK, Von Hoff DD, Strandjord SE, Coccia PF (1986): Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies
J Clin Oncol;4(3):363-9.

176) Sariola H, Terävä H, Rapola J, Saarinen UM (1991): Cell-surface ganglioside GD2 in the immunohistochemical detection and differential diagnosis of neuroblastoma
Am J Clin Pathol;96(2):248-52.

177) Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger RC (1991): Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma
N Engl J Med;324(4):219-26.

178) Faulkner LB, Tintori V, Tamburini A, Paoli A, Garaventa A, Viscardi E, Tucci F, Lippi AA, De Bernardi B, Bernini G (1998): High-sensitivity immunocytologic analysis of neuroblastoma cells in paired blood and marrow samples
J Hematother;7(4):361-6.

179) Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996): In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations
J Histochem Cytochem;44(9):959-68.

180) Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M (2008): Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: crosstalk between ploidy control and apoptosis
Mutat Res;651(1-2):30-9.

181) Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011): Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability
Nat Rev Mol Cell Biol;12(6):385-92.

182) Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y (2006): Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index
Histopathology;48(6):674-82.

183) Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M (2013): Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis
Oncology;84(4):219-25.

184) Pathmanathan N, Balleine RL (2013): Ki67 and proliferation in breast cancer
J Clin Pathol;66(6):512-6.

185) Luhn P, Houldsworth J, Cahill L, Schiffman M, Castle PE, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, Walker J, Wentzensen N (2013): Chromosomal gains measured in cytology samples from women with abnormal cervical cancer screening results
Gynecol Oncol;130(3):595-600.

186) Kuglik P, Smetana J, Vallova V, Moukova L, Kasikova K, Cvanova M, Brozova L (2014): Genome-wide screening of DNA copy number alterations in cervical carcinoma patients with CGH+SNP microarrays and HPV-FISH
Int J Clin Exp Pathol; 7(8):5071-82.

187) Wilting SM, Steenbergen RD, Tijssen M, van Wieringen WN, Helmerhorst TJ, van Kemenade FJ, Bleeker MC, van de Wiel MA, Carvalho B, Meijer GA, Ylstra B, Meijer CJ, Snijders PJ (2009): Chromosomal signatures of a subset of high-grade premalignant cervical lesions closely resemble invasive carcinomas
Cancer Res; 69(2):647-55.

188) Houldsworth J (2014): FHACT: the FISH-based HPV-associated cancer test that detects nonrandom gain at four genomic loci as biomarkers of disease progression.
Expert Rev Mol Diagn; 14(8):921-34.

189) DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Invasion and metastasis, Chapter 10; (Eds) DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology
10th Edition; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2014.

190) Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J (2008): Mechanisms of metastasis
Breast Cancer Res;10 Suppl 1:S2.

191) Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J (2011): Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization
Nature;481(7379):85-9.

192) Buchheit CL, Weigel KJ, Schafer ZT (2014):Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression
Nat Rev Cancer;14(9):632-41.

193) Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P (2013): Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression
Biochim Biophys Acta;1833(12):3481-98.

194) Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M (2007): Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology

Nature;450(7173):1235-9.

195) Young R, Pailler E, Billiot F, Drusch F, Barthelemy A, Oulhen M, Besse B, Soria JC, Farace F, Vielh P (2012): Circulating tumor cells in lung cancer
Acta Cytol;56(6):655-60.

196) Lianidou ES, Strati A, Markou A (2014): Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers
Crit Rev Clin Lab Sci;51(3):160-71.

197) Bordow SB, Norris MD, Haber PS, Marshall GM, Haber M (1998): Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma
J Clin Oncol; 16(10):3286-94.

198) Westermark UK, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson MA (2011): The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma
Semin Cancer Biol; 21(4):256-66.

199) Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H (2001): Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group
Cancer; 92(10):2699-708.

200) Altungoz O, Aygun N, Tumer S, Ozer E, Olgun N, Sakizli M (2007): Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma
Cancer Genet Cytogenet; 172(2):113-9.

201) Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F (2003): Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma
Clin Cancer Res; 9(13):4835-40.

202) Spitz R, Betts DR, Simon T, Boensch M, Oestreich J, Niggli FK, Ernestus K, Berthold F, Hero B (2006): Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma
Cancer Genet Cytogenet; 167(1):51-6.

203) Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK (2000): Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study
J Clin Oncol;18(24):4067-76.

204) Kerbl R, Urban CE, Ambros IM, Ambros PF (1998): Neuroblastoma screening for children: delay, repeat, or delete?

Med Pediatr Oncol; 31(2):111-2.

205) Morandi F, Corrias MV, Pistoia V (2015): Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma
Ann N Y Acad Sci; 1335(1):23-31.

206) Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger RC (1991): Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma
N Engl J Med; 324(4):219-26.

207) Cheung NK, Heller G, Kushner BH, Liu C, Cheung IY (1997): Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is routine marrow histology insensitive?
J Clin Oncol; 15(8):2807-17.

208) Offner S, Schmaus W, Witter K, Baretton GB, Schlimok G, Passlick B, Riethmüller G, Pantel K (1999): p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells
Proc Natl Acad Sci U S A;96(12):6942-6.

209) L'Abbate A, Macchia G, D'Addabbo P, Lonoce A, Tolomeo D, Trombetta D, Kok K, Bartenhagen C, Whelan CW, Palumbo O et al. (2014): Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer
Nucleic Acids Res;42(14):9131-45.

210) Staff S, Isola J, Jumppanen M, Tanner M (2010): Aurora-A gene is frequently amplified in basal-like breast cancer
Oncol Rep; 23(2):307-12.

211) Weier HU, Mao JH (2013): Meta-analysis of Aurora Kinase A (AURKA) Expression Data Reveals a Significant Correlation Between Increased AURKA Expression and Distant Metastases in Human ER-positive Breast Cancers
J Data Mining Genom Proteom; 4(1):127.

212) Wang Y, Sun H, Wang Z, Liu M, Qi Z, Meng J, Sun J, Yang G (2014): Aurora-A: a potential DNA repair modulator
Tumour Biol; 35(4):2831-6.

213) Zheng XQ, Guo JP, Yang H, Kanai M, He LL, Li YY, Koomen JM, Minton S, Gao M, Ren XB, Coppola D, Cheng JQ (2014): Aurora-A is a determinant of tamoxifen sensitivity through phosphorylation of ERα in breast cancer
Oncogene; 33(42):4985-96.

214) Nadler Y, Camp RL, Schwartz C, Rimm DL, Kluger HM, Kluger Y (2008): Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer
Clin Cancer Res; 14(14):4455-62.

215) Takeshita M, Koga T, Takayama K, Ijichi K, Yano T, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K (2013): Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer
Lung Cancer; 80(1):85-90.

216) Ruiz-Cortés ZT1, Kimmins S, Monaco L, Burns KH, Sassone-Corsi P, Murphy BD (2005): Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, Aurora B
Mol Endocrinol; 19(12):2991-3000. Epub 2005 Jul 14.

217) Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y (2006): Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index
Histopathology; 48(6):674-82.

218) Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M (2013): Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis.
Oncology; 84(4):219-25.

219) Pathmanathan N, Balleine RL (2013): Ki67 and proliferation in breast cancer
J Clin Pathol; 66(6):512-6.

220) Gully CP, Velazquez-Torres G, Shin JH, Fuentes-Mattei E, Wang E, Carlock C, Chen J, Rothenberg D, Adams HP, Choi HH, Guma S, Phan L, Chou PC, Su CH, Zhang F, Chen JS, Yang TY, Yeung SC, Lee MH (2012): Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53
Proc Natl Acad Sci U S A; 109(24):E1513-22.

221) Wang Y, Zhou BP (2012): FBW7-Aurora B-p53 feedback loop regulates mitosis and cell growth
Cell Cycle; 11(22):4113-4.

222) Kalous O, Conklin D, Desai AJ, Dering J, Goldstein J, Ginther C, Anderson L, Lu M, Kolarova T, Eckardt MA, Langerød A, Børresen-Dale AL, Slamon DJ, Finn RS (2013): AMG 900, pan-Aurora kinase inhibitor, preferentially inhibits the proliferation of breast cancer cell lines with dysfunctional p53
Breast Cancer Res Treat; 141(3):397-408.

223) Marxer M, Ma HT, Man WY, Poon RY (2014): p53 deficiency enhances mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Aurora kinases
Oncogene; 33(27):3550-60.

224) Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N (2004): High expression of Aurora-B/Aurora and Ipll-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas
J Neurooncol; 67(1-2):53-64.

225) 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.

226) 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.

227) Mehra R, Serebriiskii IG, Burtness B, Astsaturov I, Golemis EA (2013): Aurora kinases in head and neck cancer
Lancet Oncol; 14(10):e425-35.

228) Michaelis M, Selt F, Rothweiler F, Löschmann N, Nüsse B, Dirks WG, Zehner R, Cinatl J Jr (2014): Aurora kinases as targets in drug-resistant neuroblastoma cells
PLoS One; 9(9):e108758. doi: 10.1371/journal.pone.0108758.

229) Goldenson B, Crispino JD (2015): The aurora kinases in cell cycle and leukemia
Oncogene; 34(5):537-45.

230) Porcelli L, Guida G, Quatrale AE, Cocco T, Sidella L, Maida I, Iacobazzi RM, Ferretta A, Stolfa DA, Strippoli S, Guida S, Tommasi S, Guida M, Azzariti A (2015): Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy
J Transl Med; 13(1):26.

231) Tao Y, Leteur C, Calderaro J, Girdler F, Zhang P, Frascogna V, Varna M, Opolon P, Castedo M, Bourhis J, Kroemer G, Deutsch E (2009): The aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe
Cell Cycle; 8(19):3172-81.

232) Lovett M (2013): The applications of single-cell genomics
Hum Mol Genet; 22(R1):R22-6.

233) Macaulay IC, Voet T (2014): Single cell genomics: advances and future perspectives.
PLoS Genet; 10(1):e1004126. doi: 10.1371/journal.pgen.1004126

234) Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B, Hutchinson A, Deng X, Liu C, Horner MJ, Cullen M, Epstein CG, et al. (2012): Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer
Nat Genet;44(6):651-8.

8. Saját in extenso közlemények jegyzéke

8.1. Az értekezéshez felhasznált közlemények

1) **Mehes G**, Witt A, Kubista E, Ambros PF
Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic
AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY 159:(1) pp. 17-20. (2001)
IF: 7.103
Független idéző: 142 Függő idéző: 5 Összesen: 147

2) Bollmann R, Torka R, Schmitz J, Bollmann M, **Mehes G**
Determination of ploidy and breast cancer by laser steroid receptor status in scanning cytometry
CYTOMETRY 50:(4) pp. 210-215. (2002)
IF: 1.933
Független idéző: 5 Függő idéző: 2 Összesen: 7

3) Bollmann R, **Mehes G**, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M
Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples
CANCER CYTOPATHOLOGY 99:(1) pp. 57-62. (2003)
IF: 2.045
Független idéző: 18 Függő idéző: 9 Összesen: 27

4) Bollmann R, **Mehes G**, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M
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 CYTOPATHOLOGY 99:(2) pp. 113-117. (2003)
IF: 2.045
Független idéző: 21 Függő idéző: 10 Összesen: 31

5) Ambros PF, **Mehes G**, Ambros IM, Ladenstein R
Disseminated tumor cells in the bone marrow - chances and consequences of microscopical detection methods
CANCER LETTERS 197:(1-2) pp. 29-34. (2003)
IF: 2.614
Független idéző: 6 Függő idéző: 2 Összesen: 8

6) **Mehes G**, Luegmayr A, Kornmuller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF
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

AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY 163:(2) pp. 393-399. (2003)
IF: 6.946
Független idéző: 16 Függő idéző: 2 Összesen: 18

7) Bollmann R, **Mehes G**
Analysis of tissue imprints by scanning laser cytometry.
CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY 26:(7.22) pp. 22:7.22.1-7.22.6. (2004)

8) Ambros PF, **Méhes Gábor**
Combined immunofluorescence and FISH: new prospects for tumor cell detection and identification
CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY 26:(8.13) pp. 8.13.1-8.13.11. (2004)

9) **Mehes G**, Speich N, Bollmann M, Bollmann R
Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 10:(3) pp. 142-148. (2004)
Független idéző: 35 Függő idéző: 1 Összesen: 36

10) Bollmann R, **Méhes G**, Speich N, Schmitt C, Bollmann M
Aberrant, highly hyperdiploid cells in human papillomavirus-positive, abnormal cytologic samples are associated with progressive lesions of the uterine cervix.
CANCER 105:(2) pp. 96-100. (2005)
IF: 4.800
Független idéző: 6 Függő idéző: 2 Összesen: 8

11) Thallinger GG, Baumgartner K, Pirklbauer M, Uray M, Pauritsch E, **Mehes G**, Buck CR,
Zatloukal K, Trajanoski Z
TAMEE: data management and analysis for tissue microarrays
BMC BIOINFORMATICS 8: Paper 81. 12 p. (2007)
IF: 3.493
Független idéző: 11 Összesen: 11

12) Kata Hegyi, **Gábor Méhes**
Mitotic Failures in Cancer: Aurora B Kinase and its Potential Role in the Development of Aneuploidy
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(4) pp. 761-769. (2012)
IF: 1.555
Független idéző: 3 Összesen: 3

13) Katalin Hegyi, Kristóf Egervári, Zsuzsa Sándor, **Gábor Méhes**
Aurora Kinase B Expression in Breast Carcinoma: Cell Kinetic and Genetic Aspects
PATHOBIOLOGY 79:(6) pp. 314-322. (2012)
IF: 1.948

Független idéző: 2 Összesen: 2

14) Hegyi K, Lonborg C, Monus A, **Mehes G**
One-Day FISH Approach for the High-Speed Determination of HER2 Gene Copy Status in Breast Carcinoma.
APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR MORPHOLOGY 21:(6) pp. 567-571. (2013)
IF: 2.059

15) **Mehes G**, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rozsa T, Kiss C
Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/Direct Sequencing and Immunohistochemistry.
AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY 38:(12) pp. 1644-1648. (2014)
IF: 4.592*

16) Bedekovics J, Szeghalmy S, Beke L, Fazekas A, **Mehes G**
Image analysis of platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFRbeta) expression to determine the grade and dynamics of myelofibrosis in bone marrow biopsy samples.
CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY 86:(4) pp. 319-328. (2014)
IF: 2.283*

8.2. Egyéb in extenso közlemények jegyzéke

1) Lacza A, Jakso P, Kereskai L, Szuhai K, **Mehes G**, Pajor L
A t(12;21) incidenciája és megoszlása a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia prognosztikai csoportjaiban
ORVOSI HETILAP 141:(27) pp. 1495-1500. (2000)
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

2) **Mehes G**, Lorch T, Ambros PF
Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis
CYTOMETRY 42:(6) pp. 357-362. (2000)
IF: 2.557
Független idéző: 16 Függő idéző: 7 Összesen: 23

3) **Mehes G**, Witt A, Kubista E, Ambros PF
Classification of isolated tumor cells and micrometastasis
CANCER 89:(3) pp. 709-711. (2000)

IF: 3.611
Független idéző: 6 Függő idéző: 1 Összesen: 7

4) Ambros PF, **Mehes G**, Hattinger C, Ambros IM, Luegmayr A, Ladenstein R, Gadner H
Unequivocal identification of disseminated tumor cells in the bone marrow by combining immunological and genetic approaches - functional and prognostic information
LEUKEMIA 15:(2) pp. 275-277. (2001)
IF: 4.293
Független idéző: 2 Függő idéző: 8 Összesen: 10

5) **Mehes G**, Luegmayr A, Ambros IM, Ladenstein R, Ambros PF
Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in the bone marrow
CLINICAL CANCER RESEARCH 7:(7) pp. 1969-1975. (2001)
IF: 5.076
Független idéző: 23 Függő idéző: 10 Összesen: 33

6) **Mehes G**, Luegmayr A, Hattinger CM, Lorch T, Ambros IM, Gadner H, Ambros PF
Automatic detection and genetic profiling of disseminated neuroblastoma cells
MEDICAL AND PEDIATRIC ONCOLOGY 36:(1) pp. 205-209. (2001)
IF: 1.114
Független idéző: 7 Függő idéző: 6 Összesen: 13

7) **Mehes G**, Ambros PF, Gadner H
Detecting disseminated solid tumor cells in hematopoietic samples: methodological aspects
HAEMATOLOGIA (BUDAPEST) 31:(2) pp. 97-109. (2001)
IF: 0.400
Független idéző: 7 Összesen: 7

8) Tornoczky T, Kalman E, Jakso P, **Mehes G**, Pajor L, Kajtar GG, Battyany I, Davidovics S, Sohail M, Krausz T
Solid and papillary epithelial neoplasm arising in heterotopic pancreatic tissue of the mesocolon
JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 54:(3) pp. 241-245. (2001)
IF: 1.866
Független idéző: 57 Összesen: 57

9) Ambros PE, **Mehes G**, Ambros IM, Luegmayr A, Ladenstein R, Gadner H
Detection, quantification and characterization of disseminated tumor cells
ACTA MEDICA AUSTRIACA 29:(Suppl. 59) pp. 58-61. (2002)
IF: 0.293

10) Hennerbichler S, **Mehes G**, Schmied R, Wintersteiger R, Dohr G, Ambros P, Sedlmayr P
Detection and relocation of rare events - A comparative study using the laser scanning cytometer and the Metafer/RCDetect microscope scanning system
JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS 53:(1-3) pp. 109-115. (2002)
IF: 1.383
Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5

11) **Mehes G**, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF
Cell growth and cell death in disseminated tumor cells
ACTA MEDICA AUSTRIACA 29:(Suppl. 59) pp. 62-64. (2002)
IF: 0.293

12) Vastyan AM, Pinter AB, Farkas AP, Vajda P, Lantos J, **Mehes G**, Roth E
Seromuscular gastrocystoplasty in dogs
UROLOGIA INTERNATIONALIS 71:(2) pp. 215-218. (2003)
IF: 0.525
Független idéző: 1 Függő idéző: 1 Összesen: 2

13) Molnár L, Nagy A, Dávid M, Szomor A, **Méhes G**, Kovács G, Losonczy H
Imatinib kezelési eredmények krónikus myeloid leukaemia késői krónikus fázisában, interferon-alfa kezelés után
ORVOSI HETILAP 145:(17) pp. 901-907. (2004)

14) Kajtar B, Deak L, Kalasz V, Pajor L, Molnar L, **Mehes G**
Multiple constitutional chromosome translocations of familial nature in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia: A report on a unique case
INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY 82:(4) pp. 347-350. (2005)
IF: 1.670
Független idéző: 3 Összesen: 3

15) Kovács Gábor, Molnár Lenke, Dávid Marianna, Nagy Ágnes, Szomor Árpád, Pajor László, **Méhes Gábor**, Kajtár Béla, Jáksó Pál, Lacza Ágnes, Magyarlaki Tamás, Losonczy Hajna
Új prognosztikai faktorok vizsgálata krónikus lymphoid leukaemiában
HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 38:(4) pp. 218-224. (2005)

16) **Mehes G**
Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 11:(4) pp. 205-210. (2005)
IF: 1.162
Független idéző: 28 Függő idéző: 2 Összesen: 30

17) Kajtar B, **Mehes G**, Lorch T, Deak L, Kneifne M, Alpar D, Pajor L
Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei
CYTOMETRY PART A 69A:(6) pp. 506-514. (2006)
IF: 3.293
Független idéző: 19 Függő idéző: 5 Összesen: 24

18) Kajtar B, Jakso P, Kereskai L, Lacza A, **Mehes G**, Bodnar MA, Dombi JP, Gasztonyi Z, Egyed M, Ivanyi JL, Kovacs G, Marton E, Palaczki A, Petz S, Toth P, Sziladi E, Losonczy H, Pajor L
Prognosztikai faktorok komplex vizsgálata krónikus lymphocytás leukémiában
ORVOSI HETILAP 148:(16) pp. 737-743. (2007)

19) Lueking, Beator J, Patz E, Müllner S, **Mehes G**, Amersdorfer P
Determination and validation of off-target activities of anti-CD44 variant 6 antibodies using protein biochips and tissue microarrays.
BIOTECHNIQUES 45:(4) pp. Pi-Pv. (2008)
IF: 2.587
Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7

20) Bedekovics J, Rejto L, Telek B, Udvardy M, Ujfalusi A, Olah E, Hevessy Z, Kappelmayer J, Kajtar B, **Mehes G**
Mutáns nucleophosmin fehérje kimutatása akut myeloid leukaemiában: az NPMc+ AML biológiai és klinikai jellemzői
ORVOSI HETILAP 150:(22) pp. 1031-1035. (2009)
Független idéző: 1 Összesen: 1

21) Kis A, Feher E, Gall T, Tar I, Boda R, Toth ED, **Mehes G**, Gergely L, Szarka K
Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population
EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES 117:(5) pp. 536-540. (2009)
IF: 1.956
Független idéző: 14 Függő idéző: 2 Összesen: 16

22) Losonczy H, Kovács G, Kajtár B, **Méhes G**, Szendrei T, Pótó L, Molnár L, Nagy Á, Dávid M, Szomor Á, Kosztolányi S, Csalódi R, Tóth O, Pajor L
Új prognosztikai faktorok diagnosztikai és klinikai jelentősége krónikus lymphocytás leukaemiában
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 62:(3) pp. 187-195. (2009)

23) Mannweiler S, Amersdorfer P, Trajanoski S, Terrett JA, King D, **Mehes G**
Heterogeneity of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in Prostate Carcinoma with Distant Metastasis
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 15:(2) pp. 167-172. (2009)

IF: 1.152
Független idéző: 36 Összesen: 36

24) Mannweiler S, Pummer K, Auprich M, Galle G, **Mehes G**, Ratschek M, Tsybrovskyy O, Moinfar F
Diagnostic Yield of Touch Imprint Cytology of Prostate Core Needle Biopsies
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 15:(1) pp. 97-101. (2009)
IF: 1.152
Független idéző: 4 Összesen: 4

25) Bidiga L, Asztalos L, Fülep Z, Fülesdi, **Méhes G**
Az új influenzavírus- (H1N1-) fertőzés okozta fatális kimenetelű tüdőgyulladás
ORVOSI HETILAP 151:(14) pp. 576-579. (2010)
Független idéző: 1 Összesen: 1

26) Damm S, Koefinger P, Stefan M, Wels C, **Mehes G**, Richtig E, Kerl H, Otte M, Schaider H
HGF-Promoted Motility in Primary Human Melanocytes Depends on CD44v6 Regulated via NF-kappa B, Egr-1, and C/EBP-beta
JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 130:(7) pp. 1893-1903. (2010)
IF: 6.270
Független idéző: 28 Összesen: 28

27) **Méhes G**
A follikuláris lymphomák pathológiája
HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 43:(1) pp. 93-95. (2010)

28) Nagy E, Eaton J W, Jeney V, Soares M P, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, **Méhes G**, Csonka T, Smith A, Vercellotti G M, Balla G, Balla J
Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis
ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY 30:(7) pp. 1347-1353. (2010)
IF: 7.215
Független idéző: 66 Függő idéző: 7 Összesen: 73

29) Radványi Mónika, Illés Árpád, **Méhes Gábor**, Kajtár Béla, Fazakas Ferenc, Garai Ildikó, Gergely Lajos
Myeloma multiplex és diffúz nagy B-sejtes lymphoma ritka társulása
LEGE ARTIS MEDICINAE 20:(10) pp. 661-665. (2010)

30) Auriel E, Bornstein NM, Berenyi E, Varkonyi I, **Gabor M**, Majtenyi K, Szepesi R, Goldberg I, Lampe R, Csiba L
Clinical, radiological and pathological correlates of leukoaraiosis
ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA 123:(1) pp. 41-47. (2011)
IF: 2.469

Független idéző: 11 Függő idéző: 1 Összesen: 12

31) Kajtár Béla, Deák Linda, Kalász Veronika, Pajor László, Molnár Lenke, **Méhes Gábor**
Multiplex konstitucionális kromoszómatranszlokációk egy Philadelphia-kromoszóma-pozitív krónikus myeloid leukaemiás betegben: esetismertetés és családvizsgálat
HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 44:(3-4) pp. 131-136. (2011)

32) Auriel E, Csiba L, Berenyi E, Varkonyi I, **Mehes G**, Kardos L, Karni A, Bornstein NM
Leukoaraiosis is associated with arterial wall thickness: A quantitative analysis.
NEUROPATHOLOGY 32:(3) pp. 227-233. (2012)
IF: 1.909
Független idéző: 2 Összesen: 2

33) Irsai Gábor, Tampu-Kiss Tatjana, Dezső Balázs, Miltényi Zsófia, Illés Árpád, **Méhes Gábor**
Szisztémás cytomegalovirus-fertőzés és szövődményei terápiarefrakter klasszikus Hodgkin-lymphomában
ORVOSI HETILAP 153:(19) pp. 751-755. (2012)

34) Klekner A, Fekete G, Rencsi M, **Méhes G**, Szabó P, Bognár L
Az 1p19q kodeléció klinikai relevanciája oligodendrogliomákban a Debreceni Idegsebészeti klinikán
IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE / CLINICAL NEUROSCIENCE 63:(1-2) pp. 17-24. (2012)
IF: 0.348
Függő idéző: 2 Összesen: 2

35) Kulcsar I, Szanto A, Varoczy L, **Mehes G**, Zeher M
Hodgkin's lymphoma developed after autologous stem cell transplantation for multiple myeloma: transformation or coincidental appearance?
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(3) pp. 733-736. (2012)
IF: 1.555

36) **Méhes Gábor**, Hegyi K, Csonka T, Fazakas F, Kocsis Z, Radványi G, Vadnay I, Bagdi E, Krenács L
Primary Uterine NK-Cell Lymphoma, Nasal-Type: A Unique Malignancy of a Prominent Cell Type of the Endometrium.
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(2) pp. 519-522. (2012)
IF: 1.555
Független idéző: 1 Összesen: 1

37) Páyer Edit, Miltényi Zsófia, Simon Zsófia, Szabados Lajos, Hegyi Katalin, **Méhes Gábor**, Illés Árpád
Uncommon late relapse of angioimmunoblastic T-Cell lymphoma after 16-year remission period

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18:(3) pp. 737-741. (2012)
IF: 1.555

38) Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Toth R, Orosz A, Szőllősi AG, **Méhes G**, Ádány R, Balázs M
Prognostic relevance of the expressions of CAV1 and TES genes on 7q31 in melanoma
FRONTIERS IN BIOSCIENCE (ELITE EDITION) E4: pp. 1802-1812. (2012)
Független idéző: 1 Összesen: 1

39) Bedekovics J, Rejto L, Telek B, Kiss A, Hevessy Z, Ujfalusi A, **Mehes G**
Identification of NPMc+ acute myeloid leukemia in bone marrow smears.
APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR MORPHOLOGY 21:(1) pp. 73-78. (2013)
IF: 2.059

40) Bedekovics Judit, Kiss Attila, Beke Livia, Karolyi Katalin, **Mehes Gabor**
Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR beta) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis
VIRCHOWS ARCHIV-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY 463:(1) pp. 57-65. (2013)
IF: 2.560
Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3

41) Gergely Buglyó, **Gábor Méhes**, György Vargha, Sándor Bíró, János Mátyus
WT1 microdeletion and slowly progressing focal glomerulosclerosis in a patient with male pseudohermaphroditism, childhood leukemia, Wilms tumor and cerebellar angioblastoma
CLINICAL NEPHROLOGY 79:(5) pp. 414-418. (2013)
IF: 1.232
Független idéző: 1 Összesen: 1

42) Szeghalmy S, Bedekovics J, **Méhes G**, Fazekas A
Digital measurement of myelofibrosis associated platelet derived growth factor receptor β (PDGFR β) expression in bone marrow biopsies
CIT JOURNAL OF COMPUTING AND INFORMATION TECHNOLOGY 21:(1) pp. 47-56. (2013)

43) Éva Pósfai, Gábor Irsai, Árpád Illés, **Gábor Méhes**, Imelda Marton, Csaba Molnár, István Csípő, Sándor Baráth, Lajos Gergely
Evaluation of Significance of Lymphocyte Subpopulations and Non-specific Serologic Markers in B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma Patients
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 20:(3) pp. 649-654. (2014)
IF: 1.806*

44) Gyongyosi A, Docs O, Czimmerer Z, Orosz L, Horvath A, Torok O, **Mehes G**, Nagy L, Balint BL
Measuring expression levels of small regulatory RNA molecules from body fluids and formalin-fixed, paraffin-embedded samples
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 1182: pp. 105-119. (2014)

45) **Mehes G**, Irsai G, Bedekovics J, Beke L, Fazakas F, Rozsa T, Kiss C
Activating BRAF V600E Mutation in Aggressive Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis: Demonstration by Allele-specific PCR/Direct Sequencing and Immunohistochemistry.
AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY 38:(12) pp. 1644-1648. (2014)
IF: 4.592*

46) Ottó Dócs, Ferenc Fazakas, Nóra Lugosiné Horváth, László Tóth, Csilla András, Zsolt Horváth, **Gábor Méhes**
Changes of KRAS Exon 2 Codon 12/13 Mutation Status in Recurrent Colorectal Cancer
PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH (2015)
IF: [1.806**]

47) **Méhes G**
Genetikai eltérések prognosztikai jelentősége B-sejtes krónikus lymphocytás leukémiában
HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 38:(3) pp. 148-154. (2005)

48) Kajtár B, **Méhes G**, Jaksó P, Kereskai L, Iványi JL, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, Dömötör M, Pajor L
A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorozása
ORVOSI HETILAP 147:(21) pp. 963-970. (2006)
Független idéző: 1 Összesen: 1

49) **Méhes G**
Az RNS interferencia jelentősége az onkológiai gyakorlatban
HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 40: pp. 119-123. (2007)

50) Molnár P, **Méhes G**
Prediktív molekuláris patológiai vizsgálatok magas gradusú, gliAlis eredetű daganatok diagnosztikájában: Predictive molecular pathological testing in the diagnosis of high-grade tumors of glial origin
MAGYAR ONKOLÓGIA 53:(1) pp. 33-38. (2009)

51) **Mehes G**, Kalman E, Pajor L
IN-SITU FLUORESCENT VISUALIZATION OF NUCLEOLAR ORGANIZER REGION-ASSOCIATED PROTEINS WITH A THIOL REAGENT

JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY 41:(9) pp. 1413-1417. (1993)
IF: 2.789
Független idéző: 6 Függő idéző: 2 Összesen: 8

52) **Mehes G**, Kovacs G, Kajtar B, Lacza A, Varnai A, Losonczy H, Pajor L
Karyotype complexity and V-H gene status in B-cell chronic lymphocytic leukemia
HAEMATOLOGICA: THE HEMATOLOGY JOURNAL 91:(10) pp. 1430-1431. (2006)
IF: 5.032

8.3. Nemzetközi szabadalom

1) **Méhes Gabor**, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur automatichen analyse von biologischen proben
Graz, Oridis Biomed Forshcungs- und Entwicklungs GmbH
http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062444

2) **Méhes Gabor**, Schmidt Wolfgang, Wrighton Christopher, Zatloukal Kurt, Zöbl Harald, Hecht Peter (2007): Verfahren und vorrichtung zur bestimmung der relevanz von probenarraypraparaten
Graz, Oridis Biomed Forshcungs- und Entwicklungs GmbH
http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007062443

9. Scientometriai adatok

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