

**Daganatsejtek genetikai és funkcionális vizsgálata
cytometriai módszerekkel**

PhD értekezés tézisei

Dr. Máhes Gábor

PTE ÁOK, Patológiai Intézet

2001

Bevetető

A malignus transzformáció hátterében fennálló genomikus elváltozások az egyes daganatsejtekben nagyon különböző funkcionális eltéréseket eredményezhetnek. Az eltérések jelentős mértékben befolyásolják a betegség kezelése során alkalmazott terápiás eszközök hatékonyságát. A daganatsejtek érzékenysége klasszikus kemoterápiás szerekre (sejtciklus blokkolók, enzimgátlók, receptorblokkolók), de immun- és génterápiás beavatkozások esetén is biológiai változók függvényei. Ezért klinikailag is indokolt – speciális diagnosztikai igények kielégítésére – olyan módszerek kifejlesztése, melyek sejszinten, a molekuláris diagnosztikai módszerek kiegészítéseképpen, lehetővé teszik ugyanazon neoplasztikus sejtek, ill. sejtpopulációk pontos vizsgálatát mind genomikus, mind expressziós szinteken. Az utóbbi 30 év robbanásszerű fejlődése a számítógépes tudományok terén a sejtanalitikai lehetőségeket is jelentősen kibővívelte. Ennek köszönhetően jelenleg szinte valamennyi típusú fluoreszcens és nem-fluoreszcens jelölési módszer in situ mennyiségi vizsgálata lehetséges. Mikroszkópos szinten – változatlanul – klinikailag is igen értékes információk nyerhetők genomikus és expressziós szinten egyaránt.

Céltűzések

Jelen értekezés olyan módszertani törekvéseket ismertet, melyek lehetőséget nyújtanak – áramlások cytometria és digitális képanalízis segítségével – az említett változók párhuzamos in situ tanulmányozására, egyazon eljárás keretében. Munkánk során a daganatsejtek viselkedését a sejtproliferáció, nucleoláris (LDNS) aktivitás, a sejmag DNS-tartalom változása és specifikus chromosomális elváltozások bemutatása kapcsán kíséreltük meg megközelíteni.

Egyik célkitűzésünk az akrocentrikus chromosomákon lokalizált argyrophil NOR szekvenciák működésének fluoreszcens láthatóvá tétele, az AgNOR mennyiségi meghatározása és dinamikájának részletes tanulmányozása volt.

Másrészről egyes tumorsejtek specifikus molekuláris cytogenetikai jellegzetességeinek kivizsgálására immunfenotípus, DNA-tartalom és in situ hibridizáció (FISH) kombinációjából álló, automatizált vizsgálatok kitéseztetésére vállalkoztunk.

Eredmények

1. A riboszomális gének (rDNS) aktivitásának, valamint a sejt DNS-tartalmának párhuzamos vizsgálatára új áramlásos cytometria eljárás került kidolgozásra. A sulffydryl-csoportok kimutatására bevezetett kumarin alapú CPM fluoreszcens festés jól reprezentálja az ezüstözéssel módosított láthatóvá tehető AgNOR-okat. Az eljárás lehetővé teszi a nucleolaris rDNS aktivitás és a nuclearis DNS tartalom párhuzamos vizsgálatát. A módszer segítségével jelentős különbségek voltak észlelhetők nem transzformált normál növekedésű és daganatos sejtek között.
2. Specifikus monoclonális antitestek és DNS-tartalom mérés alkalmazásával elsőként közelítettük meg a nucleolaris organizációs régió (NOR) lokalizációjú fehérjék fehérjék expresszióváltozása jelentősebb időbeli eltérést mutatott, általánosságban azonban valamennyi jelölés jól reprezentálta a fokozott avagy csökkent sejltaktivitást.
3. A daganatsejtek DNS-tartalmának, metafázis és interfázis cytogenetikai eltéréseinek összehasonlítása leukemiában az alkalmazott módszerekkel eltérő eredményekre, a technikák kiegészítő jellegére hívta fel a figyelmet. Az egyes daganatsejtek szintjén az elváltozások nagyonis különbözőeknek, ami a tumorsejtpopulációkban tapasztalt funkcionális heterogenitás molekuláris mechanizmusaira világít rá.
4. Ezen okokból érdeklődésünk középpontjába kerültek az olyan lehetőségek, amelyek nem a sejtpopuláció szintjén, hanem az egyes sejtekben kimutatható egyedi elváltozásokat reprezentálják. Többparaméteres immunológiai és molekuláris cytogenetikai vizsgálatok céljára kifejlesztésre került egy automatizált mikroszkópos képanalizáló rendszer, mely lehetővé teszi akár igen ritkán előforduló tumorsejtek érzékeny kimutatását és részletes funkcionális analízist sorozatvizsgálatok formájában. A módszer elsőként neuroblastoma sejtek quantitatív csontvelői kimutatására és cytogenetikai jellemzésére került alkalmazásra.
5. A ritka tumorsejtek mennyiségi meghatározása jelentős klinikai igény, mivel rajta keresztül lehetséges az alkalmazott terápiák hatékonyságának lemérése. Automatizált képanalizis keretei erre is kiváló lehetőséget biztosítanak. Kísérleteinkben 1/10 millió sejt érzékenység mellett is ugyanolyan eredményességgel lehetett molekuláris és funkcionális vizsgálatokat végezni, jelentősen növelve ezzel a minimális reziduális betegség (MRD) kimutatásának hatékonyságát.

Az értékezés benyújtásáig (2001 március) megjelent közlemények:

1. Gábor Méhes, Endre Kálmán, László Pajor: In situ fluorescent visualization of nucleolar organizer region-associated proteins with a thiol reagent
J Histochem Cytochem 41(9): 1413-1417, 1993
2. Gábor Méhes, László Pajor: Nucleolin and fibrillinin expression in stimulated lymphocytes and differentiating HL-60 cells. A flow cytometric assay
Cell Prolif 28: 329-336, 1995
3. György Csanky, Zoltán Szereday, Tamás Magyarlaci, Gábor Méhes, Tamás Herbert, István Buzogány: Renal angliomyolipoma: a report of three cases with regional lymph node involvement and/or with renal cell carcinoma
Tumor 81:469-474, 1995
4. Méhes Gábor, Pajor László, Konya Tibor, Kajár Pál, Méhes Károly: Csontvelői és perifériás vérszövetek vizsgálata áramlásos DNS cytometriával gyermekkorú akut lymphoblastos leukemiában
Gyermekgyógyászati Szemle 46(1): 44-49, 1995
5. Gábor Méhes, Andrács Tamás, László Pajor, Károly Méhes: Objective analysis of centromere separation
Hum Genet 97: 365-366, 1996
6. Éva Gömöri, István Mészáros, Gábor Méhes, Tamás Dóczy, László Pajor: Cell kinetic analysis in recurrent neuro-epithelial tumours
Acta Neurochir 138: 1036-1041, 1996
7. Gömöri Éva, Mészáros István, Méhes Gábor, Dóczy Tamás, Pajor László: Neuroepitheliális daganatok prognózisának vizsgálata sejtiproliferációs szempontból
Ideggyógyászati Szemle 9-10:315-320, 1996
8. Szabai Károly, Méhes Gábor, Kosztolányi György, Kajár Pál, Lendvai Gábor, Szanyi István, Pajor László: Interfázis cytogenetika alkalmazása a DNS-tartalom változásának megítélésére gyermekkorú akut lymphoid leukemiában (ALL)
Orv Hetil 138: 3111-3119, 1997
9. Vajda Péter, Farkas András, Váscsán Aritla, Méhes Gábor, Pintér András: Ureteropóliás egyomosságmentesüléssel - állatfajtalesztés modell kutyákban
Magyar Urológia 10(2): 199-204, 1998
10. László Pajor, András Marolcsy, János A. Vass, Gábor Méhes, Éva Marton, Ferenc Szabó, János L. Iványi: Phenotypic and genotypic analyses of blastoid cell population suggest that pure B-lymphoblastic leukemia may arise from myelodysplastic syndrome
Leuk Res 22(1): 13-17, 1998

11. László Pajor, Károly Szuhai, Gábor Méhes, György Kosztiányi, Pál Jáksó, Gábor Lendvai, István Szanyi, Pál Kajfár: Combined metaphase, interphase cytogenetic and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 34:87-94, 1998
 12. Laczó Ágnes, Jáksó Pál, Kereskai László, Szuhai Károly, Méhes Gábor, Pajor László: A t(12;21) incidenciája és megoszlása a gyermekkori akut lymphoblastos leukæmia prognosztikai csoportjában *Ony Heil* 141: 1495-1500, 2000
 13. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Sequential functional and cytogenetic analysis of single tumor cells in disseminated neuroblastoma, in J. Graham (ed): *Proceedings of the First Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics (QMC 2000)*, Bari, Italy, pp 216-218, 2000
 14. Gábor Méhes, Armin Witt, Ernst Kubista, Peter F. Ambros: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis (letter) *Cancer* 89(3): 709-711, 2000
 15. Gábor Méhes, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis *Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 42: 357-362, 2000
 16. Gábor Méhes, Andrea Luegmayr, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Inge M. Ambros, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Automatic detection and genetic profiling of disseminated neuroblastoma cells *Med Pediatr Oncology* 36: 205-209, 2001
- Kongresszusi előadások és poszterek jegyzéke :**
1. Gábor Méhes : Fluorescent visualization of nucleolar region associated proteins with a thiol reagent. The Nucleolus Colloquium, Bécs, 1992. szeptember 23-25.
 2. Méhes Gábor: A nucleolus működésének vizslálai lehetőségei: ezüstözéses és áramlási cytometria eljárások. Tudományos Ülés, Pécs, 1993. február 8.
 3. Méhes Gábor: AgNOR proteinnek és nucleolin (C23 protein) lokalizációja a sejlmagban. Pathologus Találkozó, Székesfehérvár, 1994. szeptember 30.
 4. Méhes Gábor: Klinikai és molekuláris cytogenetika myeloproliferatív betegségekben. Hematopathologia Tutorial, Pécs, 1997. március 27.
 5. Gábor Méhes, Margit König, Oskar A. Haas: Analysis of asynchronous replication pattern of ABL and BCR in normal and Ph chromosome positive cells with fluorescence in situ hybridisation. Tumorzytogenetische Arbeitsstaugung, Friedrchtshdorf, 1997. május 22.

6. Gábor Méhes, Margit König, Oskar A. Haas: Asynchronous replication pattern of ABL and BCR in normal and Ph chromosome-positive cells with fluorescence in situ hybridisation. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und der Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Linz, 1997. oktober 12-15.
7. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros : Automatic bone marrow analysis: sequential immunological and FISH demonstration of MRD. 11. Tumorzytogenetische Arbeitsstaugung, Jena, 1998. május 21-23.
8. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros : Automatic bone marrow analysis : sequential immunological and FISH demonstration of MRD. Kind-Philip Tagung, Bécs, 1998. június 11-13.
9. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros : A new approach for the detection of minimal residual disease in neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research, Bath, 1998. június 15-17.
10. Méhes Gábor: Minimális reziduális betegség vizsgálata immunológiai és molekuláris cytogenetikai módszerekkel. MPT Kongresszus, Gyula, 1998. augusztus 27.
11. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Monitoring and functional analysis of minimal residual disease in neuroblastoma patients. CA-AMCA Meeting, Budapest, 1999. március 11-14.
12. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Cytogenetic and functional characterization of rare tumor cells in the bone marrow. Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa, Pécs, 1999. augusztus 25-28.
13. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Andrea Luegmayr, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Monitoring and functional characterization of rare tumor cells in hematopoietic samples. ECCO 10, Bécs, 1999. szeptember 12-16.
14. Gábor Méhes, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Quantitative analysis of rare tumor cells by automated microscopy. 12th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 1999. oktober 22-24.
15. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Proliferative potential of tumor cells disseminated in the hematopoietic system. 12th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 1999. oktober 22-24.
16. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Helmut Gardner, Peter F. Ambros: Sequential functional and cytogenetic analysis of single tumor cells in disseminated neuroblastoma. Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetic Analysis, Bari, 2000. április 13-15.

17. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Proliferative potential of neuroblastoma cells disseminated in the hematopoietic system. ISAC XX, Montpellier, 2000. május 20-25.
18. Gábor Méhes, Thomas Lörch, Helmut Gadner, Peter F. Ambros: Proliferative potential of isolated neuroblastoma cells disseminated to the bone marrow. Kind-Philip Tagung, Wilsede, 2000. június 7-10.
19. Gábor Méhes, Thomas Lörch, Helmut Gadner, Peter F. Ambros: Quantification and functional analysis of isolated tumor cells in the bone marrow of neuroblastoma patients. SIOP Congress, Amsterdam, 2000. október 2-5.