Doktori (Ph.D.) értekezés

## Hemopoetikus tumorokra jellemző transzlokációk automatizált i-FISH analízise

Alpár Donát

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Nagy Judit Program: Molekuláris pathomorfológia Program és témavezető: Prof. Dr. Pajor László

> Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Pathológiai Intézet

> > Pécs, 2008

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés - irodalmi áttekintés	
1.1. Molekuláris citogenetika - <i>in situ</i> hibridizáció	
1.2. Fluoreszcencia <i>in situ</i> hibridizáció (FISH)	
1.2.1. FISH szondák	9
1.2.2. FISH-hez kapcsolódó módszerek	
1.3. Az i-FISH alkalmazása a hematonatológiában	
1.4. Az i-FISH jelmintázatok értékelése	
1.4.1. Műszerek	
1.4.2. Numerikus kromoszóma aberrációk kimutatása	
1.4.3. Strukturális kromoszóma aberrációk kimutatása	
1.4.4. Sejtvonal specifikus vizsgálatok	
1.4.5. Diagnosztikai határérték megállapítása	
1.4.6. Automatizált analízis	
2. Célkitűzés	
2. A nua ach ás mádsronch	21
3. Anyagok es modszerek	
3.1. MINUAK	
3.2. Immunchokenna	
3.3. Aramiasi citometria	
3.4. Pasztazo Huoreszcencia mikroszkopia (SFM)	
3.5. Immunienoupizalas SFM-mei	دد دد
3.0. I-FISH jetotes	
5.7.1-FISH analizis	
3.7.1. Manualis erlekeles	
5.7.2. Automatizait effekeles	,
4. Eredmények	39
4.1. A BCR/ABL transzlokáció automatizált i-FISH analízise	
4.1.1. Eredmények	
4.1.2. Az eredmények értékelése	
4.2. Reziduális leukémiás sejtek automatizált detektálása egymást köv	ető CD10
immunfenotipizálással és ETV6/RUNX1 i-FISH analízissel gyermek	kori akut
limfoblasztos leukémiában	
4.2.1. Eredmények	
4.2.2. Az eredmények értékelése	
4.3. Dupla-fúziós és disszociációs i-FISH szondák mintázatainak au	tomatizált
értékelése formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti metszeteken	
4.3.1. Eredmények	
4.3.2. Az eredmények értékelése	53
5. Megbeszélés	
6. Az új eredmények összefoglalása	

7. Köszönetnyilvánítás	65
8. Irodalomjegyzék	66
9. A disszertáció alapját képező publikációk	89
10. Egyéb publikációk	93

# Rövidítések jegyzéke

2D	kétdimenziós (two dimensional)
3D	háromdimenziós (three dimensional)
ABL	Abelson murine leukemia gén
afu	önkényes fluoreszcencia egység (arbitrary fluorescence unit)
ATM	ataxia telangiectasia mutált gén
BAC	bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial arteficial chromosome)
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma 2 gén
BCR	breakpoint cluster region gén
CCND1	cyclin D1 gén
CEP	centromer-specifikus szonda (chromosome enumeration probe)
CIF	kombinált immunfenotipizálás és i-FISH (combined immunophenotyping and i-FISH)
CLL	krónikus limfoid leukémia (chronic lymphoid leukemia)
CML	krónikus mieloid leukémia (chronic myeloid leukemia)
COBRA	kombinatórikus bináris arány jelölés vizsgálat (combined binary ratio
	labeling analysis)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol (4',6-diamidine-2-phenyl indole)
DF	dupla-fúziós szonda (dual-fusion probe)
DI	disszociációs szonda (break-apart or split probe)
DNS	dezoxi-ribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
dNTP	degenerált nukleotid-trifoszfát (degenerated nucleotide triphosphat)
ETV6	ETS variant 6 gén (korábban TEL)
ES	extraszignálos szonda (fusion extrasignal probe)
F	fúziós i-FISH szignál (fusion i-FISH signal)
FICTION	fluoreszcens immunfenotipizálás és interfázis citogenetika neopláziák
	vizsgálatára (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a
	tool for investigation of neoplasms)
FISH	fluoreszcencia in situ hibridizáció (fluorescence in situ hybridization)
FITC	fluoreszcein izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)
FP	formalin-fixált, paraffinba ágyazott (formalin fixed, paraffin-embedded)
G	zöld i-FISH szignál (green i-FISH signal)

i-FISH	FISH interfázis sejtmagon (FISH on interphase nucleus)
IGH	immunglobulin nehézlánc gén (immunglobulin heavy chain gene)
ISH	in situ hibridizáció (in situ hybridization)
kb	kilobázis (kilobase)
LSI	lókusz-specifikus szonda (locus specific identifier)
MAC	morfológia-antitest-kromoszóma (morphology-antibody-chromosomes)
Mb	megabázis (megabase)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
M-FISH	sokszínű FISH (multi-colour FISH)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
PAC	P1 eredetű mesterséges kromoszóma (P1 derived arteficial chromosome)
pALL	gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (pediatric acute lymphoblastic
	leukemia)
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
Ph	Philadelphia-kromoszóma (Philadelphia-chromosome)
PNS	peptid-nukleinsav (peptide nucleic acid)
R	piros i-FISH szignál (red i-FISH signal)
RARA	$\alpha$ -retinsav receptor gén (retinoic acid receptor $\alpha$ )
RGB	piros-zöld-kék (red-green-blue)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
RQ-PCR	valós idejű kvantitatív PCR (real-time quantitative PCR)
RQ-RT-PCR	real-time kvantitatív reverz transzkripciós PCR (real-time quantitative
	reverse transcription PCR)
RUNX1	runt-related transcription factor 1 gén (korábban AML1)
SD	standard deviáció (standard deviation)
SF	egyszerű-fúziós szonda (single fusion probe)
SFM	pásztázó fluoreszcencia mikroszkópia (scanning fluorescence microscopy)
SKY	spektrális kariotipizálás (spectral karyotyping)
YAC	élesztő mesterséges kromoszóma (yeast arteficial chromosome)
WCP	teljes kromoszóma festék (whole chromosome painting)

### 1. Bevezetés - irodalmi áttekintés

#### 1.1. Molekuláris citogenetika - in situ hibridizáció

A modern citogenetika fejlődése a kromoszómasávozási technikák kialakulásával vette kezdetét [1,2]. Metafázis preparátumokon kromoszómák értékelése sávozás nélkül is lehetséges [3], a homogén festéssel nyerhető paraméterek (kromoszóma hossz, karok aránya, centromerikus index) azonban csak erősen korlátozott mértékű információt képesek nyújtani a normál kariotípust ért változásokról. Sávozási módszerekkel a különböző kromoszómák pontosan azonosíthatók és számos kromoszómális rendellenesség specifikusan leírható. Ennek köszönhető, hogy a sávmintázat vizsgálata döntő szerepet játszott az öröklött- és szerzett, humán betegségekre jellemző genetikai változások felismerésében [4,5]. A hagyományos (konvencionális) citogenetikai vizsgálat lehetővé teszi a sejtek teljes kromoszóma készletének vizsgálatát egyedi sejt szinten (1. ábra). Alkalmazhatóságát azonban korlátozza, hogy (i) sejttenyésztést igényel, így csak mitótikus aktivitással rendelkező sejtek vizsgálatához használható; (ii) a kromoszóma garnitúrát érintő többszörös átrendeződések megfejtése gyakran nem könnyű feladat csupán monokromatikus sávozási mintázat alapján; (iii) a kevesebb, mint 3 - 10 megabázis (Mb) hosszúságú DNS szakaszokat érintő aberrációk kimutatására nem alkalmas [6]; és (iv) a mitótikus alakok összessége bizonyos esetekben nem megfelelő arányban, vagy egyáltalán nem reprezentálja a genetikai eltérést hordozó sejtpopulációt [7]. Utóbbi jelenség hátterében a különböző sejttípusok eltérő osztódási képessége és az ennek következtében fellépő klonális szelekció áll.

A citogenetika második fellendülése az *in situ* hibridizációs (ISH) módszer kidolgozásának köszönhető. Ennek lényege, hogy a minta meghatározott nukleinsav (DNS vagy RNS) szakaszához azzal komplementer, ugyanakkor jelölt, így láthatóvá tehető szekvenciát (szonda) kapcsolnak. Az eljárás során a mintát és a szondát általában hőkezeléssel (ritkábban valamilyen kémiai ágenssel, pl.: formamid) egyszálúvá alakítják (denaturáció), majd a hőmérséklet csökkentésével megindítják a nukleinsav molekulák reasszociációját (renaturáció). A renaturáció során bekötődött jelölt szondák ISH szignálként azonosíthatók, a detektáló műszer típusát a jelölés módja határozza meg. A különböző ISH technikák képezik a molekuláris citogenetika alapját, melynek előnye a konvencionális citogenetikával szemben, hogy (*i*) nem igényel feltétlenül sejttenyésztést, így nem kell számolni a klonális szelekcióval és a kellő mennyiségű értékelhető sejt hiányával; (*ii*) érzékenységének köszönhetően rejtett (kriptikus) aberrációk kimutatására is alkalmas; (*iii*) megfelelő preparálási technika és műszeres felkészültség mellett a genetikai adatok morfológiai-, fenotípusos-, illetve topográfiai paraméterekkel is társíthatók, egyedi sejt szinten [8].

Az első in situ hibridizációs kísérleteket Pardue és Gall, valamint John és mtsai. végezték az 1960-as évek végén [9,10]. A szondát radioizotóppal jelölték, a detektálást autoradiográfiával végezték. Az eljárás hátrányai az alábbiak: (i) a radioaktív anyagok természetüknél fogya bomlékonyak, specifikus aktivitásuk az idő előrehaladtával változik; (ii) a jelölés magas szenzitivitása rendkívül alacsony térbeli feloldással párosul; (iii) a radioaktív detektálás során hosszú expozíciós időre van szükség ahhoz, hogy a radiográfiás filmen mérhető intenzitású jel keletkezzen; (iv) a radioaktív módon jelölt szonda költséges és veszélyes anyag, melynek kezelése nagy körültekintést igényel; (v) a többszínű jelölést nem teszi lehetővé. E problémák hatására további szondajelölési stratégiák kerültek kidolgozásra, így jelentek meg többek között a fluoreszcens festékekkel jelölt szondák [11], a fénymikroszkóppal kromogén vizsgálható enzim-alapú riporter molekulák és [12] az elektronmikroszkópiához kifejlesztett arany-alapú jelölő rendszerek [13]. Az összes módszer közül legelterjedtebbé a fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) vált, mely lehetővé tette a nagy feloldású, gyors és biztonságos jelölést. Az értékeléshez ebben az esetben leginkább fluoreszcencia mikroszkópia, vagy áramlási citometria használatos. A spektrális optikai szűrőeszközök és a fluoreszcens jelölési technikák fejlődése a későbbiekben elvezetett egészen a sokszínű jelölésekig és az élő sejtek vizsgálatához is.

#### 1.2. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

Az első FISH alkalmazást (1980) Bauman és mtsai. végezték, akik specifikus DNS szekvenciák kimutatásához 3' végen, rhodaminnal direkt jelölt RNS szondát használtak [11]. A későbbiekben más munkacsoportok fluorokrómmal módosított bázisok (fluoreszcein-11-dUTP) enzimatikus összekapcsolásával teljes hosszában jelölt, egyszínű szondákat hoztak létre [14]. Langer és mtsai. amino-allil módosított bázisokat (UTP, dUTP) használtak, melyekhez különféle hapténeket, fluorokrómokat kapcsoltak [15]. Ez a fejlesztés mérföldkőnek számított az *in situ* technológiák terén, mivel számos alacsony háttérzajjal rendelkező, direkt jelölt szonda egyszerű kémiai módszerrel való előállítását tette lehetővé. A következő kihívást az alacsony kópiaszámban jelenlévő szekvenciák vizsgálata jelentette, melyek kimutatásához az akkor ismert szondák specifikus fényintenzitása nem volt elegendő. A megoldást az indirekt szondajelölési módszerek hozták meg, melyek során a hibridizációs termékhez másodlagos riporter molekulákat kötöttek, így növelve mesterségesen a szonda által kibocsátott jelintenzitást. Az 1980-as években a DNS és mRNS minták vizsgálatához leginkább biotinilált szondákat és fluoreszcens streptavidin konjugátumokat használtak [16,17]. Körülbelül egy évtizeddel később, a mesterséges jelölési technikák fejlődésének köszönhetően már sikerült nagy mennyiségű fluorokróm molekulát kapcsolni az egyszálú DNS szondákhoz, így lehetővé vált a genomban alacsony számban megjelenő szekvenciák direkt jelöléssel való vizualizálása is [18]. A FISH szondák előállítása ezen a ponton elérte azt a fejlettségi szintet, mely felkeltette a különböző biotechnológiai cégek figyelmét is. Bár az ISH technika fellendülése igazából a hibrid termék fluoreszcens jelölésének köszönhető, a módszer széleskörű elterjedése a szondák kereskedelmi forgalomban való megjelenésének időpontjára tehető. Ezt bizonyítja az a tény, hogy a FISH-sel kapcsolatos nemzetközi publikációk száma a 80-as években gyakorlatilag stagnált, míg a 90-es években százszorosára (!) emelkedett. Az utóbbi három év irodalmát tekintve pedig elmondható, hogy havonta átlagosan 200 - 250 db FISH-sel kapcsolatos közlemény jelenik meg, mely érték jól jellemzi a módszer népszerűségét és hatékonyságát [19].

#### 1.2.1. FISH szondák

A FISH szondák a mintához hasonlóan egyaránt lehetnek DNS vagy RNS molekulák. Ezeken kívül léteznek peptid-nukleinsav (PNS) szondák is, melyekben a cukor-foszfát gerincet egy mesterségesen szintetizált peptidlánc (2-aminoetil-glicin) helyettesíti [20]. Hasonló körülmények között a PNS-DNS duplexek képződése gyorsabb és termális stabilitása magasabb, mint a DNS/RNS-DNS duplexeké. Ennek oka az, hogy a DNS/RNS molekulák foszfát-csoportjai között elektrosztatikus taszító kölcsönhatás van, mellyel PNS-DNS duplex esetén nem kell számolni [21].

Ahogy korábban már említésre került, a szondákat lehet direkt, vagy indirekt módon jelölni. Direkt eljárás esetén a szondához közvetlenül kapcsolódik a fluorokróm. Ennek előnye, hogy egyszerűbb metodikát igényel, a háttérzaj kis mértékű, ugyanakkor kevésbé szenzitív vizsgálatot tesz lehetővé. Az indirekt módszer során a szonda közvetlenül egy haptén molekulával (pl.: biotin, digoxigenin, ösztradiol) jelölt, melyhez különböző fluorokrómok (pl.: FITC, rhodamin, Texas Red) kapcsolhatók, akár több lépcsőben is. Ez az eljárás érzékenyebb vizsgálatot tesz lehetővé, ugyanakkor munkaigényesebb és több aspecifikus jellel kell számolni [22]. A kereskedelmi cégek általában direkt jelölt DNS szondákat forgalmaznak, melyek a fejlett gyártási technológiáknak köszönhetően jól értékelhető, erős szignálokat képesek kialakítani.

A DNS szondák klónozását rekombinációs technológiával végzik. A fragmentumokat valamilyen gazdasejtben (leggyakrabban Escherichia coli) sokszorosítják, mely azonban csak úgy lehetséges, ha a szonda kapcsolódik egy, a gazdasejtben autonóm replikációra képes vektorhoz [23]. A FISH elterjedésének elengedhetetlen feltétele volt a vektortechnológia fejlődése, mellyel lehetővé vált a néhány kilobázistól (kb) egészen a megabázis nagyságrendig terjedő inszertek sokszorosítása különböző típusú vektorok alkalmazásával: (*i*) plazmid 1 - 15 kb; (*ii*) bakteriofág < 25 kb; (*iii*) cosmid 30 - 45 kb; (*iv*) P1 eredetű mesterséges kromoszóma (PAC) 130 - 150 kb; (*v*) bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) < 300 kb; (*vi*) élesztő mesterséges kromoszóma (YAC) 100 - 2000 kb [24]. A vektor gazdasejtbe történő transzformálását a gazdasejt felszaporítása és az inszertet tartalmazó vektorok izolálása követi. A szondák fluorokrómokkal való jelölése manapság már többféle módon is lehetséges (random priming, rolling circle amplification), az eljárást azonban leggyakrabban még mindig nick transzlációval

végzik [25-27]. A módszer egyenletes jelölést eredményez, lehetővé teszi sokféle módosított nukleotid beépítését (pl.: biotin-, digoxigenin-, fluorokróm-dNTP), egyaránt megengedi cirkuláris és lineáris DNS jelölését, továbbá változatos szonda méretek használatát és többféle nukleotid szimultán alkalmazását.

Az 1980-as évek elején a FISH vizsgálatokat egyetlen színnel végezték [11,17]. Később, a technika alkalmazása során megnőtt az igény több célszekvencia szimultán vizualizálása iránt. Az évtized második felében különféle egyszínű szondák elegyének használatával először két-, majd három különböző nukleinsav szakasz kombinált analízise is elérhetővé vált [28-31]. A fluorokrómok gerjesztési és emissziós görbéinek átfedése miatt azonban spektrálisan elkülönülő szondákból hatékonyan legfeljebb négy-ötféle használható egyidejűleg. A 90-es években végül sikerült kidolgozni olyan stratégiákat, melyek áttörték a spektrális korlátokat. Azonos szondákat különböző fluorokrómokkal eltérő kombinációban jelölve lehetővé vált sok különböző célpont együttes vizsgálata is [32-34].

A FISH szondákat leggyakrabban aszerint csoportosítják, hogy a minta mely részéhez kapcsolódnak. Ez alapján három fő kategória különíthető el: (*i*) ismétlődő szekvenciákhoz kapcsolódó szondák; (*ii*) lókusz-specifikus szondák és (*iii*) teljes kromoszómát festő szondák.

#### Ismétlődő (repetitív) szekvenciákhoz kapcsolódó szondák

Ezek a molekulák rövid, a genomban sok ezerszer ismétlődő szekvenciákhoz kapcsolódnak. Ide tartoznak a kromoszóma-specifikus centromer- és a pán-telomer szondák. A kromoszómák centromer régióit egy- vagy több szatellita DNS család építi fel, leggyakrabban alfa-szatellita DNS. Az alfa-szatellita DNS alegységek restrikciós enzimek által hasított pontjai eltérnek a különböző kromoszómák esetében, így lehetséges kromoszóma-specifikus centromer szondák klónozása, melyek elsősorban numerikus kromoszóma aberrációk azonosításához alkalmazhatók (2.A ábra). (Természetesen léteznek pán-centromer szondák is, melyek az összes humán kromoszóma centromerjével hibridizálnak.) A pán-telomer szondák a minden kromoszóma végén egymást követően ismétlődő (TTAGGG) szekvenciákhoz kapcsolódnak. Fontos, hogy ezek nem azonosak a kromoszóma-specifikus telomer-vagy szubtelomer szondákkal, melyek a telomerikus irányban elhelyezkedő utolsó, a

diploid genomban két példányban jelenlévő szekvenciákhoz kapcsolódnak. A repetitív szekvenciákat azonosító szondák kis méretűek, klónozásukhoz vektorként leggyakrabban plazmidot használnak.

#### Lókusz-specifikus szondák

A lókusz-specifikus szondák a haploid kromoszóma készlet egyetlen kópiában jelenlévő nukleinsav szakaszaihoz kapcsolódnak. Elsősorban strukturális eltérések (transzlokációk, inverziók, deléciók, amplifikációk) specifikus felderítéséhez használatosak (2.B,C,D ábra). Klónozásukhoz méretüktől függően különböző vektorokat használnak, kezdve a cosmidoktól egészen a nagyméretű mesterséges kromoszómákig (PAC, BAC, YAC). Ezeknél a szondáknál aspecifikus kötődés elvileg nem fordulhat elő, hiszen a kimutatandó célszekvencia csupán két kópiában van jelen a normál diploid genomban. Valójában azonban a nagy méretű szondák gyakran lefednek repetitív szekvenciákat tartalmazó régiókat is, ez pedig komoly problémát jelent. A jelenség kiküszöbölése kompetitív ISH-val lehetséges, mely során a hibridizációs elegy a targetben lévő repetitív szekvenciákkal komplementer-, nagy mennyiségű jelöletlen DNS-t (Cot-1 DNS) is tartalmaz. A vizualizálás így ténylegesen a specifikus szekvenciára korlátozódik. Másik megoldás, hogy a szonda gyártása során kiemésztik ezeket a régiókat és így több, kisebb méretű, egymáshoz közel elhelyezkedő szonda elegyét hozzák létre. Utóbbi eljárás munkaigényesebb, de a szonda fragmentumok penetrációja szempontjából is előnyös, hiszen egy kisebb molekula könnyebben hozzáfér a célszekvenciához.

#### Teljes kromoszómát festő szondák

Ezek a szondák egyszerű szondatípusok kombinációjával létrehozott komplex rendszerek. Általában áramlási citometriával szortírozott (vagy mikrodisszekcióval izolált) kromoszómákról van szó, melyeket degenerált oligonukleotid primer polimeráz láncreakcióval amplifikálnak és jelölnek. Az ily módon létrehozott szonda elegy homogénen láthatóvá teszi az egész kromoszómát szinte teljes hosszában. Az igazsághoz azonban hozzátartozik, hogy vannak bizonyos szakaszok, nevezetesen a centromer- és a telomer régiók, melyek kevésbé intenzíven festődnek, így detektáláskor alul-reprezentáltak. Ennek oka az, hogy a nagy mennyiségű tandem repetitív szekvenciákat tartalmazó szakaszokat a szonda gyártásakor a specifikus kapcsolódás érdekében tudatosan blokkolják. A teljes kromoszóma festékeken kívül léteznek kromoszómakar-specifikus és régió-specifikus szondák is, melyeket kromoszómák mikrodisszekciójával hoznak létre. A kromoszóma festékek főleg metafázis citogenetikában használatosak komplex numerikus- vagy strukturális anomáliák felderítéséhez (2.E ábra). Aberrációk specifikus interfázis vizsgálatához nem alkalmasak.

#### 1.2.2. FISH-hez kapcsolódó módszerek

A FISH alapú technikák az elmúlt két évtizedben óriási fejlődésen mentek keresztül, melyhez nagymértékben hozzájárult az eljárás különböző típusú kérdések megválaszolásához való adaptálása. Számos különféle, egymást kiegészítő metodika került kidolgozásra, melyek hasonló módszertani elveken alapulnak. Emellett azonban fontos megjegyezni, hogy az irodalomban több olyan technikát is FISH módszerként szoktak említeni, melyek ugyan fluoreszcencia hibridizációt használnak, de nem intakt sejtmagokon vagy metafázisokon. A membránon, vagy különféle chipeken végzett hibridizációk, továbbá a lineáris DNS láncon történő térképezések valójában nem tekinthetők *in situ* analíziseknek. Az azonban természetesen igaz, hogy ezek a FISH talaján születtek, ezért a legismertebb alkalmazások most következő nagyon rövid bemutatásánál az *in situ* módszerek mellett kitérek a nem *in situ* eljárásokra is.

#### Interfázis FISH (i-FISH)

Az interfázisban lévő sejtek vizsgálatának lehetősége óriási előnyt jelent olyan esetekben, mikor a szükséges mennyiségű és minőségű metafázisok előállítása problémás, továbbá ha a vizsgálható mitótikus alakok nem reprezentálják a neoplasztikus klónt. A módszer nem igényel sejttenyésztést, ezért bármely citológiaiés hisztológiai preparátum analízisére alkalmas. I-FISH-sel az összes kromoszóma aberráció típus vizsgálható, csupán egy megfelelő - a genetikai változást vizualizálni képes - szonda szükséges hozzá. Az interfázis analízishez nagy hibridizációs hatékonyságú szondákra van szükség. Ez különösen fontos deléciók feltérképezésekor. A cosmid szondák általában megfelelőek erre a célra, a nagy méretű YAC klónok azonban nem előnyösek, mert nehezebben penetrálnak a sejtmagba és az interfázisban szétterülő DNS szálon hosszú, fonalszerű jelet eredményeznek. Az eljárással az interfázis kromatin dekondenzált állapota miatt 100 kb nagyságrendű aberrációk is kimutathatók, a nagy érzékenységű kamerák (digitális mikroszkópia) alkalmazásával pedig 50 kb alatti feloldás is elérhető [35]. A módszer hátránya, hogy célzott kérdésekre ad választ, melyhez előzetes információra van szükség a vizsgált nukleinsav szakasz szekvenciáját illetően.

#### Hipermetafázis FISH (HMF)

A sejttenyésztést követő, hagyományos citogenetikai preparálás során a colchicin kezelés idejének megnyújtásával a megszokotthoz képest jóval több metafázishoz lehet jutni [36,37]. Az így nyert kromoszómák zsugorodottak, konvencionális citogenetikai értékeléshez használhatatlanok, ugyanakkor megfelelő FISH szondák alkalmazásával az aberrációk egyértelműen kimutathatók. A módszer tehát nagy számú sejt vizsgálatára alkalmas (mint az i-FISH), ugyanakkor eldönthető általa, hogy az eltérő színű szondák azonos vagy különböző kromoszómá(k)hoz kapcsolódtak-e (mint metafázis FISH esetén). Az i-FISH analízis százalékos nagyságrendű álpozitivitása így lecsökkenthető akár 10<sup>-5</sup> szintre is, az ezzel járó magas specificitás pedig elvileg lehetővé teszi a terápiát túlélő (reziduális) sejtek kimutatását különféle leukémiás és limfómás betegek mintáiban. A módszer e lehetőségét azonban nem lehet hatékonyan érvényesíteni, mivel kezelést követően a csontvelői állomány mitótikus indexe (osztódó sejtek / összes sejt) gyakran jelentősen visszaesik, így kevés analizálható metafázis nyerhető.

## Sokszínű kromoszómafestés (Multi-colour FISH, M-FISH; vagy Spectral KaryotYping, SKY)

Az M-FISH és a SKY képes a teljes kariotípusról információt adni. Különböző festékek használatával a huszonkét autoszómához és a két nemi kromoszómához tartozó DNS állomány eltérő színnel jelenik meg [38,39]. Összesen akár öt fluorokróm kombinálása is elegendő a huszonnégy szín kialakításához. Ez úgy lehetséges, hogy mindegyik kromoszómához más-más arányban kötődnek a különböző festékek, a monitoron megjelenő mesterséges színeket pedig a digitális képfeldolgozó rendszer utólagosan rendeli hozzá az egyes keverékekhez. A módszer kombinálja a hagyományos kariotipizálást a molekuláris analízis precizitásával. Az előnyök elsősorban a többszörös kromoszóma átrendeződések következtében kialakuló, komplex kariotípusok vizsgálata során jutnak érvényre. Az eljárás hátránya, hogy kromoszómán belüli (intra-kromoszómális), kis méretű szakaszt érintő eltéréseket (inverziók, deléciók, duplikációk) nem képes felfedni. Ez különösen a telomerikus régiók aberrációira igaz, melyek esetében a feloldás mindössze körülbelül 2,0 - 2,5 Mb [40,41]. Az M-FISH egy továbbfejlesztett változata a "kombinatórikus bináris arány jelölés vizsgálat" (combinatorial binary ratio labeling analysis - COBRA) FISH, mely négy fluorokróm használatával is képes huszonnégy színt kialakítani [34,42]. Ennél az eljárásnál egy ötödik festék bevezetése már negyvennyolc különböző digitális színt is elérhetővé tesz, mellyel specifikus kromoszómakar vizsgálatok végezhetők teljes kariotípus szinten [43].

#### Színes sávozás (colour banding)

E vizsgálathoz különböző módon jelölt, így eltérő színben detektálható YAC klónokat használnak [44]. A módszer alkalmas intrakromoszómális átrendeződések kimutatására [40], valamint komplex eltérések felderítésére is [45,46]. A feloldása azonban az összes színes sávozásos technikának meglehetősen alacsony, ezért használatuk inkább kiegészítő módszerként javasolt.

# Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések vizsgálata (multicolour assay for subtelomeric chromosome rearrangements, M-TEL)

A FISH egyik legfontosabb feladata a kriptikus átrendeződések felfedése azokban az esetekben, mikor a kariotípus látszólag normális. Az M-FISH és a SKY feloldása telomerikus régiókat érintő átrendeződések kimutatása terén limitált [40,41]. Emellett a hagyományos citogenetikával delécióként detektált eltérések számos esetben valójában kriptikus transzlokációk, vagy egyéb más aberrációk [47,48]. Példaként említhetők a különböző leukémiás esetek, melyek 15 - 20 %-ában a konvencionális citogenetika nem azonosít eltérést, mivel az megegyező méretű, hasonlóan festődő régiókat érint. A fentiekből következik, hogy a citogenetikai vizsgálatok igen hasznos eszközei a kromoszómák terminális szakaszaira specifikus PAC, illetve BAC klónok, melyekkel szubtelomerikus változások nagy precizitással kimutathatók [49].

#### I-FISH replikációs idő meghatározásához

A módszerrel azonosítani lehet a különböző DNS szakaszok replikációs státuszát. A megkettőződött lókuszok dupla jelként jelennek meg, a többi lókusz pedig egyszerű szignálként látható. Ily módon feltérképezhetők a genom korai- és késői replikációjú régiói [50,51].

#### RNS-FISH génexpresszió kimutatásához

A gének expressziójának vizsgálatához leggyakrabban használt módszerek sejt szinten csak egy átlagértéket képesek megadni az adott sejtpopuláció vonatkozásában. Az RNS-FISH lehetővé teszi egy adott gén aktivitásának vizsgálatát egyedi sejt szinten [52], eltérő színű szondák használatával pedig kombinált módon is értékelhetők expressziós mintázatok. Génspecifikus intron szondákkal folyamatban lévő, vagy a közelmúltban lezajlott transzkripciós folyamatok is vizsgálhatók, a keletkező RNS fluoreszcens jelként, az aktívan átíródó gén közelében jelenik meg [53].

#### Kvantitatív FISH telomerhossz rövidülés becsléséhez

Minden humán kromoszóma telomer régiójában nagy mennyiségű tandem repetitív TTAGGG szekvencia található. E szakaszokhoz specifikus szondákat kapcsolva és a fluoreszcens szignál intenzitását mérve a telomer hossza kilobázis pontossággal megadható. Ezzel a módszerrel sikerült kimutatni a 90-es évek második felében, hogy ugyanazon donor különböző típusú sejtjeiben (csontvelői hemopoetikus sejt vs. fibroblaszt) az azonos kromoszómához tartozó telomerhosszok megegyeznek, továbbá normál csontvelőből származó metafázisok vizsgálata rámutatott arra, hogy adott sejten belül néhány kromoszóma kar (pl.: 17p) telomerikus szakasza következetesen rövidebb a többinél [54,55].

#### Komparatív genomiális hibridizáció (CGH)

A CGH DNS többletek és hiányok kimutatására alkalmas. Előnye, hogy a teljes genomot vizsgálja, így ismeretlen aberrációkat is felderít kromoszómális szinten [56]. Az eljárás során normál- és kóros sejtekből izolálnak DNS-t, melyekhez eltérő színű fluorokrómokat kötnek, majd a mindkét jelölt nukleinsavat egyenlő arányban tartalmazó eleggyel hibridizálnak normál metafázis kromoszóma preparátumot. Értékeléskor a két szín egymáshoz viszonyított relatív intenzitását vizsgálják digitális képeken, pixelenként. Egy adott kromoszómális szakaszon az arány eltolódása amplifikáció vagy deléció jelenlétére utal attól függően, hogy a kóros vagy a normál DNS-t jelölő szín válik-e uralkodóvá. CGH-el csak a legalább 10 - 20 Mb nagyságú deléciók és amplifikációk mutathatók ki, kisebb (1 Mb) szekvenciákat átfogó DNS többletek csak sokszoros amplifikáció mellett detektálhatóak. A módszer alkalmazását tovább korlátozza, hogy a mintának legalább 35 % tumorsejtet kell tartalmaznia [57] és strukturális eltéréseket nem lehet ezzel a technikával kimutatni. A CGH felbontásának javítását és a technika hátrányainak kiküszöbölését célozza meg a CGH microarray módszer. Ebben az esetben a tárgylemezre normál metafázis kromoszómák helyett klónozott DNS szekvenciák (BAC és YAC klónok) ezreit rögzítik. A felbontást e fragmentumok méretei határozzák meg. Mára már több tízezer CGH-array-hez alkalmas BAC és YAC klónt sikerült előállítani. Ezekkel 100 kb hosszú szakaszokat érintő változások is kimutathatók, nagy mértékű amplifikáció esetén pedig az érintett régió akár néhány kb is lehet. Megfelelő fragmentumok kombinálásával célzott vizsgálatokhoz alkalmas, betegség-specifikus chipeket lehet létrehozni [58]. A technika alapja lehet genomiális DNS alapú array CGH és cDNS alapú array CGH. Utóbbi nem csak a génkópiaszámok eltérését, hanem egyúttal a gének expresszióját is képes vizsgálni, mivel ugyanaz a chip mRNS hibridizációhoz is alkalmas [59]. Az array technikánál nehézséget okozhat, hogy a target cDNS szekvenciák mérete körülbelül 0,5 - 2,0 kb, így a genomiális DNS hibridizációja sokszor gyenge, mivel a genomiális DNS intron szekvenciákat is tartalmaz.

#### 3D kromoszóma organizáció vizsgálata interfázisban

Az interfázis sejteken végzett teljes kromoszóma-festések mutattak rá először arra, hogy az egyes kromoszómák nem véletlenszerűen, hanem egyértelműen körülhatárolt terekben (territórium) helyezkednek el a sejtmagon belül [60,61]. A territóriumok megakadályozzák a kromatin-állomány szabad keveredését [62]. A módszer eredményei nagymértékben hozzájárultak a jelenleg leginkább elfogadott modell kidolgozásához, miszerint interfázis sejtek magjaiban a kromatint alkotó összetevők három csoportra oszthatók: (*i*) nyílt kromatin; (*ii*) zárt kromatin; (*iii*) interkromatin domének. Utóbbiak tartalmazzák a transzkripció-, a splicing-, a DNS replikáció- és a repair rendszerek makromolekuláris komplexeit, melyekhez csak a nyílt kromatin egységek kapcsolódnak. Minden kromoszóma territórium különböző doméneket tartalmaz. A génben gazdag (korai replikációjú) és a génben szegény (közepes-késői replikációjú) egységek magas szintű rendezett nukleáris mintázatot mutatnak, mely végig jelen van az interfázis során, festett metafázis kromoszómákon pedig G (Giemsa) vagy R (reverz) sávozásként jelenik meg.

#### <u>Fiber-FISH</u>

Ez a kifejezés magában foglal minden olyan metodikát, mely során a DNS szálat különböző kezelésekkel kivonják a sejtmagból, majd a szondát a kinyújtott nukleinsav lánchoz kapcsolják [6,63]. A módszer - rendkívül jó feloldóképességének köszönhetően - forradalmasította a genom fizikai térképezését. A fiber-FISH-sel egymástól csupán néhány kilobázis távolságra elhelyezkedő szondák is nagy biztonsággal elkülöníthetők. Számos munkacsoport elérte az 1 kb feloldást [64-68], sőt még olyan közlemény is született, melyben a szerzők szub-kilobázis nagyságrendről számolnak be [69]. A fiber-FISH hatékony eszköz transzlokációk törésponti régióinak feltérképezéséhez, különösen akkor, ha a lehetséges töréspontok széles tartományban, szórtan helyezkednek el [70].

#### 1.3. Az i-FISH alkalmazása a hematopatológiában

Az i-FISH adekvát módszer numerikus- és strukturális kromoszóma anomáliák, valamint - digitális képi technikákkal történő együttes alkalmazás esetén sejtvonal-specifikus genetikai eltérések vizsgálatához. Utóbbival ugyanazon sejtről morfológiai-, immunfenotípus- és genotípus információkat lehet nyerni, mely sok esetben hasznos a diagnosztikában.

A patológiai vizsgálatok szempontjából különös jelentőséggel bír, hogy az i-FISH alkalmazásának nem szab határt a formalinos fixálás és a paraffinba történő beágyazás. A vizsgálat nem csak citospin preparátumokon, kicseppentett sejteken, keneteken és lenyomati készítményeken végezhető el, hanem archivált anyagok metszetein illetve azokból izolált sejtmagokon is, lehetővé téve a retrospektív elemzést [71,72].

Az onkohematológiában az i-FISH analízis leggyakrabban a következő kérdéscsoportokat érinti: (*i*) morfológia és immunfenotípus alapján felvetett diagnózis megerősítése, pl.: *RARA* gén érintettsége akut promielocitás leukémiában; (*ii*) szubtípusba való besorolás és a megfelelő kezelés indikálása, pl.: *ETV6-RUNX1* átrendeződés gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában; (*iii*) prognosztikai csoportba való besorolás, pl.: *p53* és *ATM* gének deléciója krónikus limfocitás leukémiában; (*iv*) reziduális betegség nyomon követése, pl.: *BCR-ABL* génfúzió monitorozása krónikus mieloid leukémiában.

#### 1.4. Az i-FISH jelmintázatok értékelése

#### 1.4.1. Műszerek

Az i-FISH szignálok által létrehozott mintázat vizsgálható áramlási- és statikus citometriával vagy flureszcencia detektálására alkalmas bármilyen digitális mikroszkópiával [22,73-75]. A citométerek a DNS kis mértékű mennyiségi változásait és a kiegyensúlyozott strukturális átrendeződéseket nem képesek detektálni [7]. Létezik olyan műszer is, mely ötvözi az áramlási citometria sebességét a mikroszkópia képrögzítő képességével [76]. Alapvetően egy áramlási citométerről

van szó, mely az értékeléshez lefényképez minden egyes objektumot. A sejtek rendkívül gyors mozgása miatt azonban még a többszörös egymást követő expozíció és a fejlett digitális képfeldolgozó technika sem képes néhány mikrométernél jobb felbontást biztosítani, így a műszerrel strukturális eltérések nem vizsgálhatók.

#### 1.4.2. Numerikus kromoszóma aberrációk kimutatása

A számbeli kromoszómális eltérések vizualizálásához kromoszómaspecifikus, (peri)centromerikus régióhoz kapcsolódó szondát érdmes használni. A jelmintázat értékelésének alapja az, hogy normál, diploid garnitúra esetén a két homológ szomatikus kromoszómának megfelelően, sejtmagonként két hibridizációs szignál látható. Léteznek kereszthibridizációt mutató szondák (5/19-es, 13/21-es, 14/22-es kromoszómák), melyek használatakor a diszómiát négy szignál jelzi, míg XY genotípus esetén a szexkromoszómák tekintetében egy-egy intranukleáris hibridizációs jel látható. Kevesebb vagy több jel az adott kromoszóma vesztését, vagy nyerését jelzi. Keresztreagáló szondák esetén a jelszám változása alapján nem lehet egyértelműen azonosítani az érintett kromoszómát. A szignálszám a sejtciklusban elfoglalt pozíciótól nem függ, G<sub>2</sub>-ben is két szignál látható kromoszómánként normál sejtekben.

Az i-FISH eredmények értelmezésekor fontos tudni, hogy a jelszám csökkenése nem feltétlenül jelenti a teljes kromoszóma hiányát vagy egyáltalán bármi rendellenességet. Egyrészt ritkán előfordulhatnak (peri)centromerikus repetitív szekvenciákat érintő deléciók [7], másrészt kromoszóma non-diszjunkció esetén a többlet genetikai anyag centromerikus régióhoz kapcsolódó szondával nem minden esetben mutatható ki, hiszen ekkor a sejtmagban triszómia helyett diszómiára utaló két szignál detektálható.

Áramlási- vagy statikus DNS citometriával nagymértékű aneuploiditás felismerhető, ugyanakkor a csupán egy-két kromoszómát érintő többlet vagy hiány nem mindig fedhető fel [77]. Az i-FISH-nek különösen akkor van jelentősége, ha: (*i*) a DNS citometria - feloldási határa miatt - nem képes kimutatni az eltérést; (*ii*) a diagnózis szempontjából specifikusan egy adott kromoszóma eltérése fontos; (*iii*) az aneuploiditás kimutatásának közvetlen prognosztikai-terápiás vonzata van; (*iv*) mozaicizmus vizsgálatok indokoltak [78,79].

Hisztológiai preparátumok értékelésekor különösen fontos az eredmény óvatos interpretálása. Egyrészt a sejtmagok érintkezhetnek, sőt bizonyos mértékben át is fedhetnek, másrészt a rutinszerűen alkalmazott vékony metszetek készítésekor a magok egy része inkompletté válik. Amennyiben a célszekvencia a mag azon részén található, mely elveszik a metszés során, jelszám csökkenés következik be, mely hibás eredményhez vezet: triszómia esetén álnegativitáshoz, deléciós vizsgálatnál álpozitivitáshoz. Ez a jelenség a 'trunkációs effektus', mely miatt a számbeli kromoszóma eltérést hordozó malignus klón arányának metszet körülmények között legalább 25 %-nak kell lennie ahhoz, hogy felismerésre kerüljön [80]. A trunkációs effektus, melynek mértéke természetesen függ a vizsgált sejttípus magméretétől is, elkerülhető vastag (20 µm-es) metszetek konfokális mikroszkóppal való értékelésével. Ez az eljárás azonban rendkívül technika-, munka- és időigényes [81].

A szöveti minták vizsgálatának másik lehetséges módja a sejtmagok izolálása a hisztológiai környezetből [72,82]. Ebben az esetben a trunkációs hatással nem kell számolni, gyakorlatilag citológiai preparátumokon, ép sejtmagok vizsgálhatók. Ez nagy előny, ugyanakkor a módszer hátránya, hogy (*i*) többlet időt- és energiát igényel, (*ii*) a topográfia elvész és (*iii*) ha az elváltozás a sejtek csupán alacsony százalékában reprezentált, a szuszpenzióban a neoplasztikus magok aránya az i-FISH analízis kimutathatósági szintje alá eshet.

#### 1.4.3. Strukturális kromoszóma aberrációk kimutatása

Az i-FISH-sel azonosíthatók intersticiális mikrodeléciók, génamplifikációk, inverziók és transzlokációk, az érintett nukleinsav szakaszra specifikus szonda segítségével.

Azon strukturális eltérések vizsgálatához, melyek a DNS mennyiségi változásával járnak (deléciók, amplifikációk), érdemes a célszekvenciához kapcsolódó szondán kívül valamilyen referencia szondát is használni. Ez azért fontos, mert egy lókusz számbeli többlete vagy hiánya nem csak strukturális aberráció, hanem numerikus eltérés következménye is lehet. A referencia szondák a célszekvenciától távol, ugyanazon kromoszómát felépítő DNS lánchoz kapcsolódnak, nem feltétlenül, de legtöbbször a centromer régióhoz.

A jelenleg humán daganatokban ismert kiegyensúlyozott genetikai aberrációk több mint felét különböző hemopoetikus betegségekben azonosították [83]. Léteznek olyan inverziók, melyek fontos diagnosztikai szereppel bírnak (pl.: inv(16)(p13q22) akut mieloid leukémiában), a különböző limfómákban és leukémiákban azonban legfontosabbak a lényegesen nagyobb arányban előforduló, nem-random reciprok transzlokációk.

A transzlokációk előfeltételét képező kromoszómális törések gyakorlatilag soha nem egy meghatározott szekvencia pontnál, hanem a DNS hosszabb-rövidebb szakaszán, halmozódva fordulnak elő. A törésponti régió számos transzlokációnál eléri a 100 kb nagyságrendet, néhány esetben pedig meghaladja az 500 kb-t is [84,85]. Ebből következően ezen aberrációk polimeráz láncreakcióval (PCR) való kimutatása körülményes a sok primer pár szükségessége miatt. Megoldás a reverz transzkripciós polimeráz láncreakció (RT-PCR) lehet, ez a módszer azonban eredménytelen, ha nem íródik át fúziós mRNS. Ezekben az esetekben az i-FISH különösen nagy jelentőséggel bír, hiszen a transzlokációkat képes DNS szinten kimutatni, ugyanakkor a szondák megfelelő tervezésével könnyedén elérhető, hogy a módszer diagnosztikus eredményességét ne befolyásolja a töréspont variabilitása.

A transzlokációk i-FISH technikával történő kimutatásának több gyakorlati megoldása lehetséges, melyet elsősorban a törésponti régió nagysága és feltérképezettsége, valamint a potenciális partner kromoszómák száma (egy vagy több) határoz meg. A három alapvető szondatípus: a töréspontot átfedő ('spanning') szonda, az egyik töréspont két oldalát eltérő színnel jelölő disszociációs ('splitting' vagy 'break-apart') szonda, illetve a két töréspont egy-egy oldalát eltérő színnel jelölő fúziós szonda (3.A,B,C ábra). A gyakorlatban ezek kombinációit is használják (3.D,E ábra), fontos azonban tudni, hogy az egyes stratégiák álpozitivitása és automatizálhatósága jelentős mértékben eltér [86].

#### 1.4.4. Sejtvonal specifikus vizsgálatok

A metafázis citogenetikai preparátumokat igénylő vizsgálatok esetében nem lehet megállapítani egy adott metafázishoz tartozó 'eredeti' interfázis sejt morfológiáját és immunfenotípusát. Az i-FISH analízis megengedi az előzetes fenotipizálást. Ez lehetővé teszi az adatok egyedi sejt szintű korrelált gyűjtését, minőségileg magasabb szintű információ nyerését. Terápiás jelentősége is van a kombinált feno- és genotípus vizsgálatoknak, melyek a hagyományos morfológia, az immunhisztológia/citológia és az i-FISH ötvözésével, valamint digitális mikroszkópia felhasználásával megvalósíthatók. Az eljárást FICTION (Fluorescence immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation Of Neoplasms), illetve MAC (Morphology-Antibody-Chromosomes) technikának is nevezik [87-90].

#### 1.4.5. Diagnosztikai határérték megállapítása

Minden egyes i-FISH vizsgálat vonatkozásában meg kell határozni azt a pozitivitás értéket, mely felett a minta egyértelműen kórosnak tekinthető. Ehhez normál kontroll mintákból álló sorozaton le kell tesztelni a módszert. Fontos, hogy ezt minden laboratóriumnak el kell végeznie, nem szabad vakon bízva, más munkacsoportoktól származó eredményeket használni. A határérték számolásának leginkább elterjedt módja során a negatív kontroll minták átlagos álpozitivitását megnövelik a standard deviáció (SD) kétszeresével, vagy háromszorosával [91].

Az álpozitivitás hátterében álló leggyakoribb technikai okok a következők: (*i*) elégtelen hibridizáció - a szonda alacsony hatékonysággal penetrál a sejtmagba; (*ii*) aspecifikus szignál - a szonda nem csak a megfelelő célszekvenciához kapcsolódik; (*iii*) magas háttérzaj - a sejtmag autofluoreszcenciája gátolja a szignálok azonosítását; (*iv*) hasadt jel - a lókusz-specifikus szonda gyakran a célrégióhoz kapcsolódó több szonda kombinációja. Ezek elhelyezkedése nem feltétlenül folytonos a DNS szálon, így az interfázis sejtmagokban térbeli pozíciótól függően, különálló jelekként is megjelenhetnek; (*v*) random kolokalizáció - a biológiailag nem kolokalizált szondák a háromdimenziós (3D) sejtmag tárgylemezen való véletlenszerű elhelyezkedése miatt egymás mellé/alá helyeződhetnek.

Természetesen minden egyes említett jelenség csak bizonyos genetikai eltérések vizsgálata esetén vezet álpozitivitáshoz. Ugyanaz a hiba más típusú kérdés megválaszolásakor álnegativitásként jelentkezhet (pl.: az aspecifikus jeltöbblet triszómia vizsgálatakor álpozitivitást, deléció vizsgálatakor álnegativitást okoz).

Mennyiségi DNS eltérést kimutató, egyszínű i-FISH analízisnél a diagnosztikai határérték általában 1 - 15 % között változik. Egy második, eltérő színű

referencia szonda használata jelentősen növeli a specificitást, különösen deléciók vizsgálatánál [92].

Kiegyensúlyozott aberrációk értékelésekor az i-FISH szignáloknak nem csak a száma, hanem elrendeződése is rendkívül fontos. Az eltérő színű jelek random kolokalizációja itt komoly probléma, hiszen a véletlen jelfúziót nem lehet fluoreszcencia intenzitás alapján kiszűrni. A jelenség fúziós szondánál 1 - 18 %-os álpoztivitáshoz, disszociációs szondánál hasonló mértékű álnegativitáshoz vezet. A határértéket befolyásolja a sejtmag mérete, az értékelés kritériumrendszere és a transzlokációs töréspont egzakt helye is [93]. A 3.D,E ábrán bemutatott extraszignálos és dupla-fúziós szondák használatakor a pozitivitásnak az egyszerű jelfúzión túl további kritériumai is vannak. Általánosságban elmondható, hogy minél összetettebb jelmintázatot hoz létre a szonda pozitív sejtmagban, annál alacsonyabb álpozitivitással, ugyanakkor egyre növekvő álnegativitással kell számolni.

#### 1.4.6. Automatizált analízis

A manuális i-FISH analízis kapcsán - mely a hematopatológiai rutindiagnosztikában általában 200 db sejtmag értékelését jelenti - nem elhanyagolható korlátokkal kell számolni: (i) alacsony pozitivitás esetén a statisztikai megbízhatóság érdekében nagyszámú sejtmag vizsgálatára van szükség [94], mely azonban időigényes folyamat; (ii) az értékelő elfogultsága a pozitivitás alul- vagy felülbecsléséhez vezethet, különösen akkor, ha a pozitív sejtek aránya nagyon alacsony, vagy kiemelkedően magas [95]; (iii) transzlokációk vizsgálatakor döntő jelentőséggel bír a fúziós (kolokalizált) szignál jelenléte vagy hiánya, melynek azonban nincsen egyértelmű, objektív definíciója. Néhány munkacsoport csak azokat a magokat tartja pozitívnak, melyekben optikailag fuzionált jelpár látható (sárga jel) [93], mások az egybeolvadt, vagy érintkező jeleket is pozitívnak tekintik [96], míg megint mások még azt is kolokalizációnak tartják, ha a két szignál nincsen messzebb egymástól, mint egy jel átmérője [97,98]. A definíciónak nagy hatása van a vizsgálat álpozitivitására és álnegativitására, amit a talán legismertebb transzlokáció (BCR/ABL) kapcsán az irodalomban közölt heterogén értékek is bizonyítanak: álpozitivitás 1,1 - 17,6 %, álnegativitás 2,0 - 13,5 % [93,96,98-101].

A számítástechnika és a digitális képanalízis fejlődésének köszönhetően az i-FISH mintázat automatizált jellemzése mára már elérhető lehetőséggé vált, mellyel a manuális értékelés hátrányai kiküszöbölhetők [94,102-107]. Objektív kritériumrendszer bevezetésével a vizsgálat az értékelő koncentráltsági szintjétől, elfogultságától mentessé válik, a detektált sejtmagok száma pedig jelentős manuális munkatöbblet nélkül növelhető.

A legtöbb automatizált analízisről szóló közlemény génamplifikációk, vagy nagyméretű szignált kialakító centromer szondák értékeléséről számol be [102,108-115]. Lókusz-specifikus transzlokációs szondákkal vizsgálatunk időpontjáig jóval kevesebb munkacsoport foglalkozott [103,105,106,116]. Ennek lehetséges oka, hogy (*i*) ezek a szondák kis méretű jeleket alakítanak ki, így automatizált detektálásuk nagyobb kihívást jelent és (*ii*) ellentétben az összes többi szonda által létrehozott i-FISH mintázattal, értékelésükhöz nem elég csupán a jeldetektálás, a szignálok közötti térbeli távolságok meghatározása is szükséges.

Transzlokációs i-FISH mintázatok automatizált analízise követi a manuális értékelés lépéseit:

<u>Először</u> a sejtmagokat kell felismerni, mely a magfestést detektáló, digitális csatorna által felvett képek szegmentálásával történik. A sejttörmelékeket, az érintkező- vagy átfedő magok által alkotott klasztereket, illetve a nem-specifikus háttérfestődésű objektumokat ki kell zárni a későbbi analízisből még akkor is, ha ez a lépés néhány egyedülálló sejtmag kizárását eredményezi [95].

Hisztológiai környezetben végzett i-FISH analízisnél a sejtmagokat nem lehet hatékonyan szegmentálni azok érintkezése-, illetve átfedése miatt. Az automatizált vizsgálat számára így kis méretű, analizálandó területeket kell meghatározni. Ennek a mintavételi módnak alapvetően két típusa van:

A mozaikos mintavétel (tile sampling) egyedülálló sejtmagokat próbál azonosítani a szöveti környezetben [106]. Négyzeteket (mozaik) helyez el a háttérfestés által jelölődött objektumokhoz illeszkedően, a legmagasabb pixelintenzitástól kezdődően egészen egy előre meghatározott küszöbintenzitásig. A mozaikok méretét úgy érdemes megválasztani, hogy az körülbelül megegyezzen a sejtmagok átlagos átmérőjével [106]. A műszer a mozaikok i-FISH mintázatát vizsgálja úgy, mintha a négyzetek sejtmagok lennének. A módszer hátrányai: (*i*) a különböző látómezők átlagos intenzitás értékei és kontraszt tartományai heterogenitást mutatnak, így azon képek esetén, melyek nagyon magas háttérfestés intenzitást hordoznak, a sejtmagok jelentős része elvész; (*ii*) a vizsgált mintában a sejtmagok mérete variábilis lehet, különösen akkor, ha daganatos- és normál sejtek keverékéről van szó. A túl nagy, vagy túl kicsi mozaikok félrevezethetik az i-FISH mintázat értelmezését; (*iii*) a mozaikok átfedhetnek egymással, így egy adott szignál több mozaikban is megjelenhet.

A rácsos mintavétel (grid sampling) szintén a látómező kis területeit (cella) vizsgálja. A cellák szabályos távolságonként helyezkednek el egymástól, lefedik az egész látómezőt, függetlenül a háttérfestés intenzitásától. Az adott cellán belül a rendszer megvizsgálja egyenként az i-FISH szignáloknak tűnő objektumok helyét, hogy azok egy sejtmag határain belül-, vagy kívül esnek-e. A kontúron kívül elhelyezkedőket kizárja az analízisből. E módszer tehát nem sejt-, hanem terület alapú. A mozaikos mintavételhez képest a rácsos mintavétel kevésbé érzékeny a háttérfestés intenzitásában fellépő variabilitásra, mely egyrészt a szöveti metszetek vastagságának és a sejtmagok ebből adódó átfedésének köszönhető, másrészt a magas aspecifikus háttérzaj miatt alakul ki. A szöveti háttér okozta probléma még manapság is komoly kihívást jelent az értékelők számára [91].

<u>Másodszor</u> a jeleket kell helyesen detektálni. Az i-FISH szignálok műszeres felismerését alapvetően az teszi lehetővé, hogy azok térben és spektrálisan lokalizáltak. Mivel azonban alakjuk, méretük és intenzitásuk jelentősen eltérő lehet akár ugyanazon sejtmagon belül is [109], a műtermékektől, illetve a háttérzajtól való elkülönítésük nem minden esetben lehetséges. Ezen túlmenően jelentkezhetnek a már említett problémák: elégtelen hibridizáció, hasadt jel, azonos színű jelek random kolokalizációja [95].

<u>Harmadszor</u> az eltérő színű jelek közötti távolságokat kell meghatározni. Mivel a sejtmagok 3D objektumok, elengedhetetlen a 3D mérés annak érdekében, hogy a 2D vetületben összefekvő jelek által okozott álpozitivitás/álnegativitás lecsökkenjen. A pozitív- és negatív sejtek elkülönítéséhez egy határértéket kell meghatározni a jeltávolságot illetően. Az interfázis kromatin dekondenzáltságának változó mértéke és az i-FISH jelek véletlen átfedése miatt a pozitív- és negatív sejtmagokat nem lehet minden esetben elkülöníteni [116]. Így a határérték meghatározásakor pozitív- és negatív kontroll sejtmagokban mért jeltávolságok eloszlása alapján ki kell választani azt az értéket, melynél legkisebb a hiba valószínűsége.

Az automatizált mikroszkópos rendszerek eredményes használatához számos paramétert kell optimalizálni. Ez a folyamat interaktív betanítást jelent, melyet átlagos minőségű mintákról felvett nyers, digitális képeken szokás végezni. Az értékelő ezeken az úgynevezett tréning képeken manuálisan meghatározza, hogy a műszer mit ismerjen fel sejtmagként/i-FISH szignálként, majd az azonosítás alapjául szolgáló paraméterek fokozatos változtatása mellett figyeli a rendszer működésének hatékonyságát.

A tréning során lehetőség van a képek bizonyos részleteinek kizárására. Ez akkor szükséges, ha az adott képrészlet olyan objektumot tartalmaz, melyről az értékelő sem tudja eldönteni, hogy valós target-e, vagy műtermék. Nagyon fontos azonban, hogy nem szabad kizárni azokat az objektumokat, melyekről egyértelműen eldönthető, hogy aspecifikus jel, sejttörmelék, vagy esetleg néhány összetapadt sejtmag. A műszert valós környezethez idomítva úgy kell beállítani, hogy ezeket az objektumokat ne azonosítsa specifikus célpontként.

#### 2. Célkitűzés

Módszertani jellegű vizsgálataink során célként tűztük ki különböző, a patológiai diagnosztika szempontjából jelentőséggel bíró, automatizált transzlokációs i-FISH mintázat értékelési eljárások kidolgozását-standardizálását, illetve az ezekkel kapcsolatos lehetőségek és korlátok feltérképezését. Vizsgálatainkhoz egy kereskedelmi forgalomban elérhető pásztázó fluoreszcencia mikroszkópos (SFM) rendszert használtunk.

#### Diagnosztikus genotípus vizsgálat citológiai preparátumon

A hematológiai elváltozásokra jellemző reciprok transzlokációk klasszikus példája a t(9;22)(q34;q11), melynek eredménye a krónikus mieloid leukémiára (CML) patognomikus, úgynevezett 'Philadelphia-kromoszóma' (Ph) [117-119]. Mivel a leukémiás sejtpopuláció redukciójának mértéke fontos prognosztikai szereppel bír a terápia folyamán, e transzlokáció kvantitatív detektálása elengedhetetlen a betegség monitorozásakor. A csontvelői sejtek kariotipizálása és a kvantitatív PCR módszerek mellett, mint alternatív lehetőség, a perifériás leukociták i-FISH analízise is javasolt, a bevezetőben már említett előnyei miatt [120,121]. Interfázis sejtmagokban a transzlokációt gyakran kétszínű-, fúziós fluoreszcens szondával vizualizálják, mely a *BCR* (zöld)- és az *ABL* (piros) génekre specifikus.

Mikroszkópos rendszerünket először *BCR/ABL* transzlokáció, perifériás fehérvérsejtekben történő kimutatásához teszteltük. Jellemeztük az automatizált műszer képességét (*i*) citológiai preparátumon történő sejtmag szelekció, (*ii*) jelfelismerés és (*iii*) a jelek közötti távolságok meghatározásának tekintetében. Az automatizált módszer álpozitivitását és álnegativitását összevetettük a manuális vizsgálat hasonló értékeivel.

## Kombinált immunfenotipizálás és genotípus vizsgálat citológiai preparátumon minimális reziduális betegség kimutatásához

Az utóbbi években egyre inkább növekszik az igény a minimális reziduális betegség (MRD) pontos meghatározása iránt, többek között a gyermekkori akut limfoblasztos leukémia (pALL) esetében is. Ebből következően az MRD kimutatáshoz alkalmas módszerek kutatására manapság nemzetközi szinten is egyre nagyobb figyelmet fordítanak. Az MRD módszerek - szenzitivitásuknak köszönhetően - alkalmasak az első indukciós kezelésre adott válasz sebességének-, illetve dinamikájának meghatározására, mely fontos prognosztikai szereppel bír [122-124]. Ezen felül az MRD vizsgálatok képesek elkülöníteni a pALL különböző biológiai viselkedésű alcsoportjait, lehetővé téve ezáltal a terápia későbbi stratifikációját.

A molekuláris genetikai módszerek, mint a real-time kvantitatív polimeráz láncreakció (RQ-PCR) és a real-time kvantitatív reverz transzkripciós polimeráz láncreakció (RQ-RT-PCR) magas szenzitivitással bírnak [125-127], de a tumortömeg mennyiségéről csak közvetett, referencia génhez viszonyított információt szolgáltatnak. Ennek különösen az expresszió alapú PCR módszereknél fontos tudatában lenni, mivel a transzkripció mértéke kezeletlen mintában és a terápia folyamán is több nagyságrend különbséget mutathat egységnyi kóros sejtre vonatkoztatva a különböző betegekben. A specifikus transzkripciós target mennyisége tehát nem szükségszerűen mutat párhuzamot a tényleges tumorsejt mennyiséggel [128,129].

A sejt alapú technikák szenzitivitása nem éri el a PCR alapú eljárásokét, de ezek a módszerek közvetlenül a leukémiás sejtek számát adják meg. Az áramlási citometria rendkívül nagy sebességgel képes azonosítani aberráns sejteket kombinált fényszórási és immunfluoreszcenciás tulajdonságok alapján. Probléma lehet azonban, hogy a patológiai fenotípus nem minden esetben különbözik a normál hematogóniumokétól [130]. A citogenetika egyedi sejt szinten szolgáltat genetikai információt, de a konvencionális citogenetikai analízis a már korábban említett hátrányain túl alacsony feloldása- és szenzitivitása miatt is alkalmatlan MRD vizsgálatra [7,96,131,132]. Az i-FISH önmagában alkalmazva - számos előnye mellett - még mindig túl magas álpozitivitással rendelkezik MRD kimutatáshoz [98,132,133]. Ha azonban az immunfenotipizálást és az i-FISH-t szimultán, vagy konszekutív módon végezzük egy relokalizációra alkalmas rendszerrel, akkor magas specificitással bíró, kombinált feno- és genotípusos jellemzéshez juthatunk, akár egyedi sejt szinten [134-136].

Második vizsgálatunk során az automatizált módszer továbbfejlesztéseként előzetes - szintén automatizált - immunfenotipizálással kombináltuk az i-FISH analízist. Az álpozitivitás csökkenésével így lehetővé vált alacsony arányban jelenlévő kóros sejtek azonosítása is. Az eljárást CD10 pozitív és *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó prekurzor B-sejtes pALL-ben szenvedő betegek reziduális tumortömegének nyomon követéséhez standardizáltuk. Meghatároztuk e sejtalapú MRD módszer szenzitivitását, specificitását, minimális detektálási szintjét és kvantitatív megbízhatóságát.

#### Hisztológiai preparátumok genotípusos jellemzése

Malignus hemopoetikus betegségek vizsgálatához gyakran csak formalinfixált, paraffinba ágyazott (FP) anyag áll rendelkezésre. Jónéhány közelmúltban megjelent közlemény mutat rá arra, hogy az i-FISH a legmegbízhatóbb, legalkalmasabb módszer transzlokációk FP anyagokon történő kimutatásához [91,137-140]. Ezt egyes munkacsoportok izolált sejtmagokon [72,82,141,142], mások szöveti környezetben végzik [143-147]. Mindkét módszer előnye és hátránya említésre került a bevezetőben.

FP anyagok metszeteinek automatizált i-FISH analíziséről először Reichard és mtsai. számoltak be a közelmúltban. Kísérleteik során B-sejtes limfómákat vizsgáltak dupla-fúziós szondákkal [106]. Közleményük felhívta a figyelmet az automatizáció néhány olyan hasznos tulajdonságára, mint a kiváló szenzitivitás és precizitás, valamint a manuális értékelés során fellépő nehézségek enyhítése.

A transzlokációk detektálásához használatos, ellentétes alapelven működő szonda típusok (fúziós és disszociációs) előnyeit és hátrányait részletesen bemutatja egy összefoglaló cikk, melyet Ventura és mtsai. közöltek [91]. Vizsgálataink kezdetéig azonban még sem olyan közlemény nem jelent meg, mely disszociációs szonda használatáról számolt volna be FP anyagokon történő automatizált i-FISH analízis kapcsán, sem olyan, mely összehasonlította volna a két szonda hatékonyságát etekintetben.

Az említett tények miatt munkánk harmadik fázisában az automatizált eljárást kiterjesztettük formalin-fixált, paraffinba ágyazott hisztológiai preparátumok vizsgálatára. Ezen felül összehasonlítottuk a kereskedelmi forgalomban elérhető, fúziós- és disszociációs elven működő szondák hatékonyságát paraffinos metszetek automatizált értékelése tekintetében. A kísérleteket olyan köpenysejtes malignus limfómában-, valamint follikuláris limfómában szenvedő betegek archivált anyagain

végeztük, melyekben korábban kimutattuk a betegségre jellemző *CCND1/IGH*, illetve *IGH/BCL-2* transzlokációt.

#### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Minták

Citológiai preparátumon történő *BCR/ABL*, illetve kombinált CD10 és *ETV6/RUNX1* vizsgálatokhoz negatív kontrollként egészséges felnőttek perifériás vérmintáit (n = 3, ill. 5) használtuk. Kombinált feno- és genotípusos jellemzés esetén a mononukleáris (biztosan CD10<sup>-</sup>) frakciót sűrűséggrádiens centrifugálással (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) nyertük ki.

Pozitív kontrollnak (*i*) a *BCR/ABL* transzlokáció vizsgálatához az SD-1 sejtvonalat és akcelerációs fázisban lévő CML-es betegek mintáit (n = 3) használtuk, (*ii*) a CD10 immunfenotipizálással kombinált *ETV6/RUNX1* transzlokációs vizsgálathoz pedig a REH sejtvonalat (DSMZ, Braunschweig, Germany).

A *BCR/ABL* analízist további CML-es betegek perifériás vérmintáin (n = 18) is elvégeztük. Az MRD (CD10+*ETV6/RUNX1*) analízis kvantitatív megbízhatóságának ellenőrzéséhez párhuzamos, hét lépcsős (0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 5,0 - 10,0 %) hígítási sorokat (n = 3) készítettünk pozitív és negatív kontroll sejtek keverésével.

A hisztológiai minták analíziséhez nem-neoplasztikus nyirokcsomó biopsiából készült szöveti vékonymetszeteket (n = 10) használtunk negatív kontrollként. A vizsgálat beállítása köpenysejtes- ( $IGH/CCND1^+$ ) (n = 10), illetve follikuláris ( $IGH/BCL-2^+$ ) (n = 10) limfómában szenvedő betegek nyirokcsomóinak szöveti metszetein történt. Pozitív kontrollként itt nem alkalmazhattunk sejtvonalat, mivel különálló sejtek formalinos fixálása és paraffinba ágyazása nem tudja reprezentálni/szimulálni a szöveti környezetet. A standardizált módszer hatékonyságát további negatív- és pozitív mintákkal (n = 10 - 14) teszteltük.

#### 3.2. Immuncitokémia

A mononukleáris frakciót tartalmazó szuszpenziót mostuk 1xPBS oldattal, majd a sejteket fetal calf serum mentes RPMI 1640 oldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) reszuszpendáltuk és citospin preparátumokat készítettünk (citocentrifuga: Hettich, Tuttlingen, Germany). A szilanizált tárgylemezek 240 mm<sup>2</sup>es felületére 5 x  $10^5$  db sejtet rögzítettünk. Légszárítást (1 óra) követően fixáltuk a mintát 3,7 %-os formaldehiddel 20 percig, 4 °C-on. A feltárást 900 W-os, 2 x 5 perces mikrohullámú kezeléssel végeztük, melyhez a lemezeket citrát-pufferbe (0,01 mól/L, pH 6,0) helyeztük, majd öblítés következett 1xPBS oldatban. Az aspecifikus kötőhelyeket 1,3,5-trinitrobenzollal (Boehringer Mannheim, Vienna, Austria) blokkoltuk. A többlépcsős jelöléshez primer antitestként jelöletlen egér anti-CD10-et (Novocastra, Newcastle, UK) használtunk, melyet biotinilált anti-egér antitesttel (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) és avidin-FITC-cel (1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA) hívtunk elő. A posztfixálást, melyet 3,7 %-os formaldehiddel végeztünk 10 percig 4°C-on, detergenses mosás és etanolos szárítás követte. A lemezeket 0,005 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenil indolt (DAPI) tartalmazó Vectashield oldattal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fedtük le.

#### 3.3. Áramlási citometria

A hígítási sorok mintáit FITC konjugált egér monoklonális anti-CD10 antitesttel (Dako Cytomation) jelöltük. A CD10<sup>+</sup> sejtek arányának meghatározásához a jelintenzitást FACSort áramlási citométerrel (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) detektáltuk és értékeltük.

#### 3.4. Pásztázó fluoreszcencia mikroszkópia (SFM)

Az automatizált tárgylemez-pásztázó és analizáló rendszer PC-ből (Pentium 4, 1,8 GHz, 768 MB RAM) és egy Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált epifluoreszcens elrendezésű mikroszkópból állt, mely motorizált tárgyasztallal, 100 W-os HBO lámpával, szűk tartományú band pass filterekkel (DAPI, SpectrumOrange, SpectrumGreen-FITC), nagy felbontású fekete-fehér CCD kamerával (CV-M1, JAI, Denmark), valamint Zeiss Fluar 10x/0,5 és Plan-Neofluar 40x/0,75 objektívekkel volt felszerelve. A digitális képfelvételhez és feldolgozáshoz, valamint a citometriai mérésekhez a Metafer 4.0 és az Isis - In situ imaging system (MetaSystems, Altlussheim, Germany) softwereket használtuk. Az irodalomban már elterjedt SFM elnevezésről fontos tudni, hogy a műszer nem hagyományos értelemben vett pásztázó mechanizmust alkalmaz, hanem illeszkedő, átfedésmentes képet rögzít a mintáról.

#### 3.5. Immunfenotipizálás SFM-mel

A sejtfelismerést és CD10 detektálást 10x-es objektívvel és a Metafer 4.0 software MetaCyte moduljával végeztük. Az autofókuszálás után a rendszer a citospin preparátum teljes területéről érintkező, átfedés-mentes képeket vett fel. A sejtek felismerése előzetesen optimalizált paraméterekkel történt: counterstain object threshold, 18 %; minimum object area, 20  $\mu$ m<sup>2</sup>; maximum object area, 350  $\mu$ m<sup>2</sup>; maximum relative concavity depth, 0,5; maximum aspect ratio, 3,5. A sejtek pontos helykoordinátáinak tárolásával lehetővé vált a későbbi relokalizáció.

Ezután a rendszer fix integrációs idővel (0,58 másodperc) megmérte a sejtek átlagos pixelintenzitását a jelcsatornában (CD10-FITC) és - az autofluoreszcens objektumok felismerésének és kizárásának érdekében - egy kontroll csatornában (SpectrumOrange) is. A sejtek DAPI, FITC és SpectrumOrange csatornákban felvett képei kombinált RGB (red-green-blue) formában, galériában is megjelentek. A CD10<sup>+</sup> és a CD10<sup>-</sup> sejteket, valamint az autofluoreszcens objektumokat a CD10-FITC, illetve a SpectrumOrange csatornában detektált intenzitások alapján különítettük el. Az interfázis citogenetikai analízist csak az egyedülálló-, autofluoreszcenciát nem mutató-, CD10<sup>+</sup> sejteken hajtottuk végre.

#### 3.6. i-FISH jelölés

A *BCR/ABL* transzlokáció vizsgálatánál eritrolízist követően a perifériás vérsejteket tenyésztés nélkül metanol/ecetsav oldatban fixáltuk, majd lemezre cseppentettük és légszárítottuk. A jelölést LSI *BCR/ABL* kétszínű, egyszerű-fúziós (SF) szonda kombinációval (Vysis, Downers Grove, IL) végeztük a cég által javasolt metodikához hasonlóan. A jelölés negatív sejtmagokban két piros- és két zöld szignált eredményez (2R2G), míg a *BCR/ABL* transzlokációt hordozó magokban egy

fúziós jel látható a folyamatban részt nem vett allélokat jelző egy-egy piros-, illetve zöld szignál mellett (1F1R1G) (3.C ábra).

Kombinált feno- és genotípusos analízis esetén a CD10 immunfenotipizálást követően a fedőlemezt 0,005 % Tween20-1xPBS oldatban óvatosan eltávolítottuk, majd mosás következett 1xPBS oldatban. A lemezeket éjszakára -20°C-os Carnoyoldatba helyeztük a citoplazma eltávolítása, illetve a kromatin lazítása és szétterítése érdekében. Légszárítást követően a mintát LSI *ETV6/RUNX1* kétszínű, fúziós extraszignálos (ES) szonda kombinációval (Vysis, Downers Grove, IL) jelöltük a cég által javasolt metodikához hasonlóan. A jelölés negatív sejtmagokban két piros- és két zöld szignált eredményez (2R2G), míg az *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó magokban egy fúziós- és egy extraszignál is látható a folyamatban részt nem vett allélokat jelző egy-egy piros-, illetve zöld jel mellett (1F2R1G) (3.D ábra).

A formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti blokkok 3 - 5 μm vastag metszetein deparaffinálást (xilol, 2 x 10 perc), rehidrálást, majd Zymed előkezelő oldattal (Invitrogen, Carlsbad, CA) 100 °C-on 15 perces feltárást végeztünk. A jelöléshez LSI *IGH/CCND1-XT* és LSI *IGH/BCL-2* kétszínű, dupla-fúziós (DF), valamint LSI *IGH* disszociációs (DI) szonda kombinációt (Vysis, Downers Grove, IL) használtunk. A DF szondával való jelölés negatív sejtmagokban két piros- és két zöld szignált eredményez (2R2G). A transzlokációt hordozó magok tipikus mintázatát két fúziós-, egy piros- és egy zöld jel adja (2F1R1G) (3.E ábra). Többszörös-, vagy kiegyensúlyozatlan átrendeződés esetén azonban más, de fúziós jelet biztosan tartalmazó jelmintázatok is megjelenhetnek. DI szonda használata mellett a normál sejtmagok két fúziós (nem disszociált) jelpárt tartalmaznak (2F), míg a pozitív sejtmagokban felhasad ez egyik jelpár egy-egy különálló piros- és zöld jelet eredményezve (1F1R1G) (3.B ábra).

A lemezeket mindhárom esetben 0,005 µg/ml DAPI-t tartalmazó Vectashield oldattal fedtük le.

#### 3.7. i-FISH analízis

#### 3.7.1. Manuális értékelés

A manuális i-FISH értékelést Zeiss Axioskop 50, vagy Nikon Microphot 3A mikroszkóppal végeztük, melyek 100x/1,3 immerziós objektívvel és a megfelelő kettős szűrővel (SpectrumOrange/SpectrumGreen) lettek felszerelve.

Citológiai preparátumokon minimum 200 db sejtmagot analizáltunk. SF szonda használata mellett csak a két piros- és két zöld jelet tartalmazó sejtmagokat vizsgálta a három független értékelő, míg ES szonda esetén a három piros- és két zöld jellel rendelkezőket is értékeltük.

Hisztológiai preparátumok értékelése során a limfoid infiltrátumot reprezentáló teljes mintaterületet megvizsgáltuk.

Fúziósnak (DI szondánál nem disszociáltnak) tekintettük a jelpárt akkor, ha a piros- és a zöld jel nem volt egy jelátmérőnél messzebb egymástól.

#### 3.7.2. Automatizált értékelés

#### 3.7.2.1. Citológiai preparátumok értékelése

#### <u>Sejtmag szelekció</u>

A 40x-es objektívvel történő mintavétel folyamán a rendszer a DAPI csatornát használta az i-FISH értékelésre alkalmas sejtmagok azonosításához. Egyszerű i-FISH analízisnél a vizsgálandó terület (search window) határait manuálisan adtuk meg, míg előzetes immunfenotipizálás esetén a rendszer - az elmentett koordináták alapján - csak az előszelektált sejtmagokat relokalizálta egyenként. Az autofókuszálás és a képfelvétel után a látómezők (image field) DAPI képeit szegmentálta egy kontúrkövető algoritmussal. Az eredményként kapott objektumok közül a nagy méretű, összetapadt sejtmagok által alkotott klasztereket, a kis méretű sejtmag törmelékeket és a látómező szélére való kerülésük miatt

inkomplett magokat kizárta. Az egyedül álló sejtmagok elkülönítését ezektől az objektum osztályoktól előzetesen - tréning képek alapján, interaktív módon - optimalizált paraméterekkel végezte: counterstain object threshold, 20 %; minimum object area, 50  $\mu$ m<sup>2</sup>; maximum object area, 500  $\mu$ m<sup>2</sup>; maximum relative concavity depth, 0,5; maximum aspect ratio, 3,5.

#### i-FISH szignál detektálás

Ha a DAPI objektum megfelelt az ép, egyedülálló sejtmag kritériumának, akkor a piros (SpectrumOrange)- és a zöld (SpectrumGreen) csatornában is készült róla felvétel. A háttérkorrekció és a képélesítés után a rendszer a jeleket kontrasztjuk, intenzitásuk, méretük és a többi azonos színű jeltől való távolságuk alapján ismerte fel. A jelek geometriai centrumának meghatározását a különböző fókuszsíkokban felvett és összegzett 3D képek tették lehetővé. A sejtmag szelekcióhoz hasonlóan a jeldetektálás paramétereit is optimalizáltuk a tréning képek segítségével: spot measurement area, 0,1  $\mu$ m<sup>2</sup>; minimum relative spot intensity, 40 %; minimum spot distance (azonos színű jelek között), 1  $\mu$ m; maximum relative spot area, 50/1000; minimum spot contrast, 20 %. A jel nélküli sejtmagokat törölte a rendszer.

#### Jelmintázat értékelés

Transzlokációs i-FISH mintázatok értékelésénél fontos a fúziós szignálnak, mint szelekciós paraméternek a pontos definiálása. SF és ES szondák esetén az eltérő színű jelek közötti legrövidebb távolság bír döntő jelentőséggel etekintetben. A piros- és zöld jelek geometriai középpontjai közötti 3D távolságot pixelben határozta meg a rendszer. 40x-es objektív használata mellett 1 pixel 0,168 µm-nek felelt meg. A transzlokációra nézve pozitív- és negatív magokat elkülönítő optimális határértéket e minimális távolság negatív- és pozitív kontroll sejtmagokban mért eloszlása alapján határoztuk meg.

A diagnosztikai határértéket a negatív kontroll minták átlagos álpozitivitásából és a standard deviáció értékéből számoltuk ki (átlagos álpozitivitás + 2SD).
## 3.7.2.2. Hisztológiai preparátumok értékelése

#### Rácsos mintavétel

A citológiai preparátumok analíziséhez hasonlóan itt is 40x-es objektívet és DAPI csatornát használt a rendszer a mintavételhez. Vizsgálandó területnek az FP metszetek limfoid szövetet tartalmazó, reprezentatív területeit jelöltük ki. Az autofókuszálást és 3D képfelvételt követően a nem-átfedő sejtmagokat azonosítani kívánó mozaikos mintavétel helyett, a felvett és elmentett képeken a szegmentálás rácsos mintavétellel történt. A rendszer minden látómezőt felosztott 15 x 12, azonos méretű (12 x 12  $\mu$ m) cellára. A cella volt minden további analízis alapja (4. ábra).

#### i-FISH szignál detektálás

A háttérkorrekció (SBMinGray algoritmus; counterstain object threshold, 10 %) után a rendszer a DAPI objektumokkal maszkolást végzett, így a jelcsatornákban felvett, de a DAPI kontúron kívül elhelyezkedő jelszerű műtermékeket kizárta az analízisből. A SpectrumOrange- és SpectrumGreen csatornákban felvett képeken az i-FISH jelek azonosítását a már említett paraméterek alapján végezte, melyeket ez esetben szintén optimalizáltunk: spot measurement area, 0,1  $\mu$ m<sup>2</sup>; minimum relative spot intensity, 38 %; minimum spot distance (azonos színű jelek között), 0,9  $\mu$ m; maximum relative spot area, 100/1000; minimum spot contrast, 15 %. A jelmentes cellákat töröltük.

### Jelmintázat értékelés

DF szonda használatakor csupán egy fúziós szignál, vagy egy-egy különálló piros- és zöld jel nem teszi lehetővé a sejtmag értékelését, ezért kizártuk a további analízisből azon cellákat, melyek nem tartalmaztak legalább két piros- és két zöld jelet. A jelfelismerési hibák- és a random kolokalizáció magas valószínűsége miatt szintén kizártuk azokat a cellákat, melyek több mint 8 db piros-, vagy zöld jellel rendelkeztek. Pozitívnak tekintettük a cellát, ha legalább két fúziós jelet tartalmazott.

DI szonda esetén még egy-egy különálló piros- és zöld jel is elegendő ahhoz, hogy az adott sejtmagot pozitívnak lehessen tekinteni szöveti vékonymetszet környezetben. A trunkációs hatásnak köszönhetően elveszhet a jelek egy része, de annak esélye, hogy a jelpár által hibridizált DNS szakaszt ketté hasítja a mikrotóm, elenyésző. Azért, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a hibridizáció sikeres volt az adott cellában, csak azokat vettük figyelembe, melyek legalább egy zöld- és egy piros jelet tartalmaztak. A jelfelismerési hibák magas valószínűsége miatt itt is kizártuk azokat a cellákat, melyek több mint 8 db piros-, vagy zöld jellel rendelkeztek. A cellát akkor tekintettük pozitívnak, ha a piros jelek száma meghaladta a fúziós jelek számát. Referenciaként azért a piros jeleket használtuk, mert ezek az általunk használt jelölés mellett, a zöld jelekhez képest sokkal megbízhatóbbak voltak, köszönhetően a háttérzaj zöld csatornában mutatott jóval magasabb intenzitásának.

A fúziós szignál optimális határértékének mindegyik szonda esetén azt a jeltávolságot választottuk, mellyel a legnagyobb különbséget tapasztaltuk a pozitívés negatív minták pozitivitása között. Minden szonda esetén tíz negatív- és tíz pozitív mintát vizsgáltunk.

A diagnosztikai határértéket a negatív- és pozitív minták pozitivitásának figyelembevételével, bináris lineáris logisztikus regresszióval határoztuk meg. Az automatizált módszer validálásához szondánként további 10 - 14 pozitív- és negatív mintát vizsgáltunk meg vakon.

# <u>A mintavételi módszerek összehasonlítása</u>

A rácsos- és a mozaikos mintavétel teljesítményét összehasonlítottuk azonos látómezők vizsgálata alapján, minden szonda esetén öt negatív- és öt pozitív mintán. Az értékelt mozaikok/cellák számát, valamint a vizsgált területek arányát vetettük össze. A mozaikos mintavételt az irodalomban leírt eljárás alapján végeztük [106].

## 4. Eredmények

### 4.1. A BCR/ABL transzlokáció automatizált i-FISH analízise

### 4.1.1. Eredmények

A vizsgálathoz használt LSI *BCR/ABL* SF szonda által kialakított jelmintázatot az 5. ábra szemlélteti.

### Sejtmag szelekció

A rendszer betanítása során beállított pásztázási paraméterekkel a sejtmag felismerés szenzitivitása 88,7 %-nak (375/423) adódott. A sejtmagként felismert DAPI objektumoknak átlagosan 10,4 ( $\pm$  8,3) %-a valójában kisebb sejtmagok csoportja volt. Ezek kizárását morfológiai paramétereken alapuló szóródási diagramok tették lehetővé, melyeken az aggregátumok külön populációként jelentek meg (6. ábra). Az interaktív manuális kapuzást követően, a fennmaradó objektumoknak csak 0,07 ( $\pm$  0,06) %-a volt érintkező/átfedő sejtmagok klasztere.

## i-FISH szignál detektálás

Az azonosított sejtmagok 86,7 %-a volt alkalmas jelszámlálásra az előzetesen optimalizált paraméterek alapján. A piros jelek 84,9 %-át, míg a zöld jelek 80,9 %-át ismerte fel helyesen a műszer. A téves jelszámolás leggyakoribb okai: (*i*) jelhasadás; (*ii*) két azonos színű jel random kolokalizációja; (*iii*) magas háttérfluoreszcencia; (*iv*) az adott sejtmagon belüli jelek intenzitása közötti jelentős különbség; (*v*) autofluoreszcens műtermékek jelenléte; (*vi*) a szonda aspecifikus kapcsolódása (7. ábra). Annak a feltételezésnek megfelelően, miszerint a piros- és zöld csatorna hibái egymástól függetlenek, optimalizálás után a műszer a sejtmagok 68,7 %-ában (84,9 x 80,9 %) detektálta helyesen a jeleket mindkét csatornában. A hibás módon egyedülálló sejtmagokként detektált sejtaggregátumoknak és azon magoknak, melyekben helytelen jeldetektálás történt 99,7 %-a mutatott - a normál és a Philadelphia-transzlokációt hordozó (Ph<sup>+</sup>) sejtmagoktól egyaránt elvárható - két piros- és két zöld szignáltól eltérő jelszámot. Az automatizált analízis a valójában két piros- és két zöld jellel rendelkező sejtmagok 0,4 %-ában detektált ettől eltérő mintázatot, mely gyakorlatilag elhanyagolhatónak tekinthető. Az 1. táblázat mutatja a Ph<sup>+</sup> és Ph<sup>-</sup> minták vizsgálatának eredményeit. Az SD-1 sejtvonaltól eltekintve, az analízisre alkalmatlan sejtmagok aránya nem különbözött jelentősen a kétféle minta típusban, így nem befolyásolta az analízis végső eredményét azon sejtmagok kizárása, melyekben a jelek nem kerültek helyes felismerésre.

### Jeltávolság mérés

A fúziós jel definiálásához egy határértéket határoztunk meg. Ha egy adott sejtmagban a piros- és zöld jelek közötti legrövidebb távolság nem haladta meg ezt értéket, a sejtmagot pozitívnak tekintettük. Az optimális határérték az meghatározásához megfigyeltük a legrövidebb távolságok eloszlását a transzlokáció negatív- és pozitív sejtmagokban. Utóbbihoz egy 100 %-ban transzlokációt hordozó populációra volt szükség. Az SD-1 sejtvonal sejtjei várhatóan 100 %-ban Ph<sup>+</sup>-ak. Sajnos a jelfelismerés ezekben a sejtmagokban - a magas szignál szám miatt kevésbé volt hatékony, mint a többi vizsgált mintában, így ebben az esetben kevesebb analizálható objektummal kellett számolnunk (1. táblázat). A CML-es betegek két Philadelphia-kromoszómát tartalmazó sejtmagjai három piros- és három zöld jelet hordoztak (mintázat: 2F1R1G), melynek normál sejtmagokban - a helytelen jelfelismerés következtében - való megjelenése nagyon alacsony volt (a Ph minták sejtmagjainak  $1.9 \pm 0.6$  %-a). A helytelenül számolt sejtmagok interaktív kizárása után egyetlen Ph<sup>-</sup> sejt sem mutatott ilyen jelszámot. Így a négy piros- és négy zöld jellel (tetraploid, duplikált Ph-kromoszóma) rendelkező SD-1 sejtmagok, továbbá a három piros- és három zöld jelet (duplikált Ph-kromoszóma) hordozó Ph<sup>+</sup> minták 100 %-os tisztaságú Ph<sup>+</sup> sejtpopulációként szolgáltak a piros- és zöld jelek közötti legrövidebb távolságok eloszlásának meghatározásához (8. ábra). A pozitívés negatív sejtmagok elkülönítése során a legkisebb mértékű hibát 5 pixeles (0,84 µm) határértéknél tapasztaltuk.

## <u>A manuális és az automatizált értékelés eredményeinek összehasonlítása</u>

A kontrollként használt hat mintát és a tizennyolc CML-es beteganyagot manuálisan is vizsgálta három független értékelő. A manuális analízis álpozitivitása Ph<sup>-</sup> minták eredményei alapján 5,8 ( $\pm$  1,5) % volt. Az automatizált analízis magasabb 7,0 (± 2,7) %-os álpozitivitással rendelkezett (diagnosztikai határérték: 12,4 %). Az SD-1 sejtek manuális analízise 2,7 ( $\pm$  7,3) % álnegativitást mutatott. Az automatizált analízis álnegativitása valamivel magasabbnak, 5,5 (± 8,0) %-osnak bizonyult a három piros- és három zöld jelet hordozó pozitív kontroll sejtmagok analízise alapján. Míg a manuális vizsgálatnál minden értékelő 200 db sejtmagot analizált mintánként, az automata rendszer átlagosan 1177 db (tartomány: 580 - 3520 db) sejtmagot értékelt. Az automata, illetve a manuális módon nyert eredmények szoros lineáris korrelációt mutattak ( $R^2 = 0.9892$ , 9. ábra). A két módszer közötti különbség átlagosan 3,7 (± 7,4) % volt. A jobb statisztikai összehasonlíthatóság érdekében az automatizált rendszer által vizsgált sejtmagokat három, egyenként 200 db sejtmagot tartalmazó csoportra szeparáltuk az eredeti detektálási sorrendet figyelembe véve. Ezeket a részpopulációkat külön-külön vizsgáltuk, majd az eredményeket összevetettük éppúgy, mint ahogy azt a három független vizsgáló eredményeivel tettük (2. táblázat). A részpopulációk eredményeinek átlagtól való átlagos eltérése 0,0 % volt. Az eltérések 8,3 %-os tartományban szórtak (tartomány: -3,5 - 4,8 %), mely érték mutatja, hogy a pozitív sejtmagok koncentrációja variabilitást mutat a random szelektált 200 db sejtmagtól függően. A független értékelők eredményeinek átlagos eltérése a manuális átlagtól 0,7 % volt, a tartomány 32,2 % (tartomány: -16,8 - 15,4 %), mely reprezentálja az értékelők közötti jelentős eltérést.

Az automatizált analízis sebessége erősen függött a tárgylemezen elhelyezkedő sejtmagok sűrűségétől és az i-FISH szignálok intenzitásától. A 200 db sejtmag analíziséhez átlagosan 36,5 percre volt szükség, mely körülbelül megegyezik azzal a mikroszkópos munkamennyiséggel, amit egy multicentrumos vizsgálati tanulmány közölt a *BCR/ABL* transzlokáció manuális i-FISH analízisével kapcsolatosan [148]. A manuális analízis sebessége a mi laborunkban kétszer ilyen gyors, eltekintve minden egyes kép felvételétől és elmentésétől, mely azonban igénybe venne jónéhány órát.

### 4.1.2. Az eredmények értékelése

Perifériás fehérvérsejtek interfázisos magjain elvégzett i-FISH analízis ajánlott, mint alternatív módszer CML-es betegek terápiája során, a *BCR/ABL* transzlokációt hordozó sejtek számának monitorozásához [120,121]. A manuális i-FISH analízis specificitása limitált. A jelek random kolokalizációja SF szonda használatakor elkerülhetetlen álpozitivitást okoz, melynek mértéke függ a pozitivitás kritériumától, a preparálási körülményektől és az értékelő gyakorlottságától. Az alacsony koncentrációban jelenlévő pozitív sejtek pontos detektálásához nagyszámú sejt analízisére van szükség [94,116], mely fáradságos és időigényes. Munkánk során egy automatizált i-FISH analízisre alkalmas rendszer lehetőségeit és korlátait térképeztük fel és hasonlítottuk össze a manuális értékeléssel. Meghatároztuk a sejtmag szelekció-, az i-FISH szignál detektálás- és a jeltávolság mérés hatékonyságát.

Az automatizált analízis a tárgylemezen lévő egyedülálló sejtmagok ~11 %át nem detektálta egyrészt a látómező határára való kerülésük, másrészt az alacsony DAPI intenzitásuk miatt. Bár az elvesztett sejtmagok aránya egyértelműen nagyobb, mint a manuális értékelésnél, ez nincs hatással az analízis eredményére, mivel a pozitivitás független a magvesztéstől [95]. A sejtmagokként detektált DAPI objektumok egy része valójában két-, vagy több sejtmag klasztere volt. A sejtaggregátumok és az egyedülálló sejtmagok elkülönítése nem volt tökéletes az előzetesen optimalizált paraméterek alapján. Kétparaméteres (objektum terület, excentricitás) szóródási diagrammal azonban szeparálni tudtuk a két populációt, így a klaszterek gyors- és hatékony kizárása lehetségessé vált.

Az i-FISH szignálok helyes detektálása az automatizált analízis számára a legnagyobb kihívás, mivel a jelek nagy variabilitást mutatnak alak-, méret- és intenzitás tekintetében [109]. Az automatizált analízis az i-FISH szignálokat a sejtmagok ~69 %-ában számolta helyesen. A hibás távolság mérés elkerülése végett minden olyan sejtmag ki lett zárva a későbbi analízisből, mely a két piros- és két zöld jeltől eltérő jelszámot mutatott. A jelszám önmagában is alkalmas volt ehhez a kizáráshoz, mivel a hibás jeldetektálás az esetek 99,7 %-ában a két piros- két zöldtől eltérő jelszámot eredményezett.

A megfelelő sejtmag szelekció és i-FISH szignál detektálás után a transzlokációra nézve negatív- és pozitív magokat el lehetett különíteni a jelek közötti legrövidebb távolság mérésével. Ahhoz, hogy ennek a távolságnak a transzlokációt hordozó magokban való eloszlását meghatározzuk, egy 100 %-ban Ph<sup>+</sup> sejtpopulációra volt szükségünk. A Ph<sup>+</sup> sejtvonalak mintái elvileg 100 %-ban pozitívak, de általában más eltéréseket is mutatnak, számos komplex jelmintázatot hordozva. Ezek a másodlagos eltérések a helyes jelfelismerést nagyon megnehezítik, melynek jó példája, hogy az SD-1 sejtvonal mintája csak alacsony százalékban tartalmazott vizsgálatra alkalmas sejteket. A duplikált Ph-kromoszómát hordozó sejtek magjai tipikusan három piros- és három zöld jelet hordoznak. Ezek a sejtmagok könnyen felismerhetőek jelszámuk alapján, mert annak az esélye, hogy negatív sejtmagokban a véletlenszerű jeldetektálási hibák ehhez a jelszámhoz vezessenek, nagyon alacsony. Ebből következően a három piros- és három zöld jellel rendelkező sejtmagok tiszta transzlokáció pozitív kontrollt szolgáltatnak.

Az automatizált analízis álpozitivitás értéke (7,0 %) összemérhető volt a manuális analízis irodalomból ismert értékeivel [93,96-101]. Manuális vizsgálat esetén hasonló átlagos álpozitivitást tapasztaltunk (5,8 %). Az automatizált- és a manuális analízis álnegativitás értéke 5,5 %-nak, illetve 2,7 %-nak adódott. Az automatizált analízis - manuális értékeléshez képest - magasabb álpozitivitás- és álnegativitás értékei köszönhetőek lehetnek a manuális vizsgálat negatív-, vagy pozitív irányban történő elfogultságának nagyon sok negatív-, illetve pozitív sejtet tartalmazó minták esetén [95].

E munkánkhoz hasonló, automatizált i-FISH analízist részletesen tárgyaló közleményt kettőt találtunk az irodalomban. Lukasova és mtsai. *BCR* és *ABL* géneket vizualizáló szondák közötti 3D távolságokat mértek [149]. Tanulmányukban a fúziós jeltávolság határértékeként 0,5 µm-t használtak, mely kisebb a mi értékünknél. Ez annak tulajdonítható, hogy a Lukasova és mtsai. által analizált sejtmagok kisebbek voltak, mint a mi általunk vizsgáltak (átlagos sejtmag sugár: 4,7 µm vs. 8,0 µm). Az álnegativitást és a hibás jelfelismerést nem közölték. Az álpozitivitás értéke náluk 17,6 % volt. Kozubek és mtsai. a t(9;22)(q34;q11) 2D automatizált i-FISH analíziséről számoltak be [116]. Határértékként 0,5 µm-es távolságot használtak, mely mellett 5,0 %-os álpozitivitást tapasztaltak. A sejtmag- és jeldetektálásról, valamint az álnegativitásról nem közöltek adatot. Az automatizált analízist egyik tanulmányban sem hasonlították össze manuális értékeléssel.

Munkánk során az automatizált analízist t(9;22)(q34;q11) - LSI *BCR/ABL* SF szondával való - detektálásához dolgoztuk ki. A kritériumok ehhez hasonlóan beállíthatók más genetikai aberrációkhoz és más, különböző jelmintázatot létrehozó szonda típusokhoz. Diagnóziskor, mikor az aberráns klón nagy mennyiségben van jelen, a monitorozandó jelmintázat könnyen meghatározható és utána ez felhasználható a rendszer tréningezéséhez. Összetettebb jelmintázat esetén azonban a jeldetektálás hibája nagyobb mértéket is ölthet.

Összességében bemutattuk, hogy lehet pontos interfázis i-FISH analíziseket végezni automatizált módon. Bár az álnegativitás és az álpozitivitás egyedi sejtek alapján nem alacsonyabb a manuális analízis értékeinél, az értékelők közötti variabilitás elkerülhető automatizált analízissel, így nagyobb statisztikai megbízhatósághoz juthatunk akkor is, ha csak 200 db sejtmagot vizsgálunk. Az automatizáció (i) lehetővé teszi nagy számú sejt analízisét anélkül, hogy a manuális értékeléshez szükséges munkamennyiségnél többet kellene befektetni; (ii) csökkenti a mintavételi hibát és (iii) növeli a nagyon alacsony koncentrációban jelenlévő pozitivitás detektálásának valószínűségét. A vizsgált minta méretének csak az automatizált rendszer hardware specifikációi szabnak határt, melyekkel jelenleg 10<sup>4</sup> nagyságrendű sejtmag analízise lehetséges. Ez igen jelentős eredménynek tekinthető a rutin diagnosztikában vizsgált 200 db sejtmaghoz képest. Automatizált analízissel az értékelők közötti variabilitás elkerülhető, a sejtmagokról elmentett képeknek köszönhetően pedig az analízis jól dokumentálható. Ezen túlmenően minden sejt pontos koordinátájának rögzítésével lehetővé válik a későbbi relokalizáció, így megvalósíthatók immunfenotipizálást követő i-FISH vizsgálatok is, melyekkel kombinált feno- és genotípusos jellemzéshez juthatunk egyedi sejt szinten.

4.2. Reziduális leukémiás sejtek automatizált detektálása egymást követő CD10 immunfenotipizálással és *ETV6/RUNX1* i-FISH analízissel gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában

### 4.2.1. Eredmények

A CD10 immunjelölést és az LSI *ETV6/RUNX1* ES szonda által kialakított jelmintázatot a 10. ábra szemlélteti.

#### Sejtfelismerés és CD10 detektálás

A minta sűrűségétől függően a sejtek körülbelül 4 - 5 %-a veszett el a látómező szélének érintése, vagy átlépése miatt. A digitalizált látómezők manuális ellenőrzésével megállapítottuk, hogy az automatizált rendszer a - teljes egészében a látómezőn belül elhelyezkedő - sejtek 99,38 %-át felismerte az előre meghatározott kritériumok alapján.

Az automatizált módszer az összetapadt sejteket nem tudta tökéletesen szeparálni az egyedülállóktól a beállított morfometriai indexek (objektum terület, konkavitás, excentricitás) alapján. A detektált objektumok átlagosan 7,22 ( $\pm$  5,64) %- a volt sejtaggregátum. Az összetapadt sejteket az előzőekben már említett módon, kétparaméteres (objektum terület, excentricitás) szóródási diagram alapján, interaktív kapuzással zártuk ki a további analízisből (11. ábra).

Mintánként 2000 db galéria kép manuális értékelése alapján a sejtfelismerés specificitása 99,71 %-nak bizonyult.

A képek felvételekor fix integrációs időt (0,58 másodperc) alkalmaztunk mind a jel- mind a kontroll csatornában. Így egyrészt megakadályoztuk, hogy a látómezőben esetlegesen jelenlévő magas fluoreszcencia intenzitású műtermék a képet alulexponálttá tegye, másrészt a különböző látómezőkben detektált sejtek jelintenzitása összehasonlíthatóvá vált. A több mint 260000 db pozitív kontroll sejt átlagos jelintenzitása (CD10-FITC) 0,49 ( $\pm$  0,19) afu (arbitrary fluorescence unit), míg a több mint 195000 db negatív kontroll sejt hasonló értéke 0,19 ( $\pm$  0,07) afu volt. A különbség statisztikailag szignifikánsnak (p < 0,001, Student-próba) tekinthető. Annak ellenére, hogy a pozitív- és negatív kontroll sejtpopulációk között jelentős fluoreszcencia intenzitásbeli különbség mutatkozott, tapasztaltunk némi átfedést közöttük. Mivel MRD-t akartunk meghatározni, meg akartunk szabadulni ettől az első látásra jelentéktelennek tűnő, de az MRD szempontjából nem megengedhető mértékű átfedéstől. A zöld jelcsatornában magas fluoreszcenciával bíró negatív sejtek magas intenzitást mutattak a kontroll SpectrumOrange csatornában is. Ez alapján lehetővé vált ezeknek az autofluoreszcens objektumoknak a kizárása, melyek átlagosan az összes egyedülálló sejt 1,07 %-át (tartomány: 0,44 - 3,77 %) tették ki (12. ábra). E populáció szóródási diagram alapján történő kiszelektálása után, a negatív kontroll sejtek jelcsatornában mért átlagos fluoreszcencia intenzitása több mint egyharmadával csökkent (0,19 vs. 0,12 afu), így biztosabban el tudtuk különíteni őket a CD10<sup>+</sup> sejtektől.

A pozitív- és negatív sejtek elkülönítéséhez - az előző vizsgálatainknál bemutatott elvhez hasonlóan - meghatároztuk azt a küszöbértéket, melynek használata mellett az álpozitivitás és álnegativitás összege minimumot mutat. Ez a határérték a kontrollokon végzett mérések eloszlása alapján 0,18 afu-nak bizonyult (13. ábra). Ezt használva a CD10<sup>+</sup> sejtek detektálásának szenzitivitása 99,78 %-nak, specificitása 99,79 %-nak adódott (3. táblázat). A kimutathatóság alsó szintjét 0,51 %-nál (átlagos álpozitivitás + 2SD) határoztuk meg.

A CD10 immunfenotipizálás megbízhatóságát három párhuzamos hígítási sorral ellenőriztük. Átlagosan több mint 49000 db sejtet vizsgáltunk mintánként. A mérési eredmények és a teoretikus értékek erős korrelációt mutattak ( $R^2 = 0.9831$ ). Az átlagos különbség csupán 0,74 % volt (3. táblázat). A hígítási sor mintáit áramlási citometriával is megvizsgáltuk, az eredmények szorosan korreláltak az automatizált mikroszkópiával nyert adatokkal ( $R^2 = 0.9895$ ). Pásztázó fluoreszcencia mikroszkópiával a CD10 pozitivitás vizsgálatának sebessége - sejtdenzitástól függően - mintánként változó volt. A rendszer átlagosan 33 db sejtet detektált, analizált és rögzített másodpercenként.

### <u>i-FISH mintázat értékelés</u>

A transzlokációra nézve pozitív-, illetve negatív sejtmagok i-FISH mintázatainak elkülönítéséhez szintén a már ismertetett módszert használtuk, tehát

minimalizáltuk az álpozitivitás és álnegativitás összegét. Határértéknek az 1,18 µmes (7 pixel) távolságot választottuk.

Ezt használva a rendszer a pozitív kontroll magoknak 98,00 %-át látta pozitívnak (szenzitivitás), míg a negatív magoknak 82,70 %-át látta negatívnak (specificitás) (14. ábra). A relatív alacsony specificitás annak volt köszönhető, hogy kizártuk a pozitivitás kritériumából az extraszignál jelenlétét. Erre a jel változó mérete és rendkívül variábilis fluoreszcencia intenzitása miatt volt szükség, melyek a megbízható detektálást gyakran akadályozták. Az analízis specificitása így csökkent, viszont szenzitivitása nőtt.

### Kombinált immunfenotipizálás és i-FISH (CIF)

A mintavétel során rögzített koordináták alapján a rendszer relokalizálta a  $CD10^+$  sejteket és vizsgálta azok i-FISH mintázatát pozitív- és negatív kontrollokban, valamint a hígítási sor mintáiban. Azáltal, hogy az i-FISH analízist csak a  $CD10^+$  sejteken hajtottuk végre, lehetővé vált a sejtfelszíni markerre nézve pozitív és transzlokációt hordozó leukémiás típusú sejtek elkülönítése a normál hematogónium típusú (sejtfelszíni marker pozitív, transzlokáció negatív) sejtektől. A kombinált immunofenotipizálás és i-FISH analízis 98,67 %-os szenzitivitása 99,97 %-os specificitással párosult (3. táblázat). A diagnosztikai határértéket az átlagos álpozitivitás + 2 SD alapján határoztuk meg: 0,03 % + 0,06 % = 0,09 %.

A hígítási sor teoretikus értékei szorosabb korrelációt mutattak a CIF eredményeivel, mint a kizárólag immunfenotipizálással nyert adatokkal (0,9983 vs. 0,9831). A teoretikus és a CIF során kapott értékek átlagosan 0,26 %-os eltérést mutattak, de az MRD szempontjából fontos, legalsó tartományban (0,1 - 0,5 %-os hígítás) ez csupán 0,01 %-nak bizonyult (15. ábra).

Egy immunfluoreszcenciára nézve pozitív objektum relokalizációja, i-FISH mintázatának rögzítése és értékelése átlagosan 15 másodpercet vett igénybe.

#### 4.2.2. Az eredmények értékelése

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia esetén alkalmazott terápia hatékonysága az utóbbi időben jelentősen javult, így a komplett remisszió és a teljes gyógyulás aránya mára már eléri a 80 %-ot [150-152]. Néhány tanulmány alapján azonban úgy tűnik, hogy a betegek egy része túlzott mértékű kezelést kap, míg más részük alul-, vagy helytelenül kezelt. Mivel ezek a jelenségek terápiás hibákhoz vezetnek [153-157], szükséges a terápiás stratégiák új prognosztikai faktorok alapján történő, további stratifikációja.

Az egyik ilyen új prognosztikai faktor a reziduális tumortömeg (minimális reziduális betegség - MRD) pontos meghatározása. A leukémiás sejtek nagyon alacsony mennyiségben való (10<sup>-6</sup> szint) kimutatásának klinikai jelentősége nem egyértelmű. Máig nem ismert, hogy ekkora mértékű reziduumnak van-e egyáltalán jelentős biológiai következménye. Az azonban már bizonyos, hogy a tumorsejtek 10<sup>-3</sup> szintre történő redukciója és a leukémiás sejtek tisztulási (clearance) dinamikája fontos prognosztikai értékkel bír [158].

A legelterjedtebb MRD vizsgálati módszerek említett hátrányai miatt kidolgoztunk egy olyan sejt- és mikroszkóp alapú eljárást, mellyel az adott leukémia jellemző fenotípusa és genotípusa egymást követő, automatizált immunfenotipizálással és i-FISH analízissel vizsgálható.

Kombinált morfológiai- és klasszikus citogenetikai értékelésről először Teerenhovi és mtsai. számoltak be 1984-ben [159]. Ezt követően olyan technikák születtek, melyek kombinált immunfenotipizálást és genotipizálást tettek lehetővé egyedi sejt szinten [134,160]. A kilencvenes évek elején, a FICTION elnevezésű módszer használatával csak numerikus kromoszóma aberrációk fenotípussal kombinált vizsgálatát végezték [161]. Később, a fluoreszcens jelölési technikák- és a detektálási eljárások fejlődésének köszönhetően többszínű fluoreszcens mintázatok, így összetett genetikai aberrációk kimutatása is lehetővé vált [88,89,162-164). Ezek a lépések mind elősegítették azt, hogy a minimális reziduális betegség nyomon követése elérhetővé váljon [90,165]. Az összes említett eljárás folyamán azonban az automatizációt csak a sejtek morfológia-, vagy immunfenotípus alapján történő felismeréséhez használták. A relokalizáció érdekében létrehoztak egy galériát, de ezt követően az i-FISH mintázat jellemzését manuálisan hajtották végre az előszelektált sejtpopuláción.

Vizsgálataink során beállítottunk egy olyan kombinált módszert, mellyel lehetővé vált a pALL-ben leggyakoribb geno- és fenotípusos elváltozást mutató [166,167], CD10<sup>+</sup> és t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó sejtek kimutatása (16. ábra). Nem csak az immunfluoreszcens markerre nézve pozitív sejtek szelektálása történt automatizáltan, hanem korábbi tanulmányunk alapján, egy 3D automatizált mintavételi eljárást alkalmaztunk az i-FISH mintázat jellemzésére. Hozzá kell azonban tenni, hogy a target sejtek az i-FISH procedúrának köszönhetően kismértékben elmozdulhatnak a tárgylemezen, ezért relokalizáció során néhány esetben manuális kontrollra volt szükség. Ekkor ellenőriztük a célsejtnek az első mintavételi folyamat eredményeképpen nyert galériaképét és a sejtes környezetet összehasonlítottuk az aktuális képen látottakkal. Ezt az eljárást használva 98,67 %-os szenzitivitást értünk el, tehát a reziduális leukémiás sejteknek csupán 1,33 %-a veszett el. A kombinált módszer álpozitivitása 0,03 %-nak (specificitás: 99,97 %), diagnosztikus határértéke 0,09 %-nak adódott. E határérték lehetővé teszi leukémiás sejtek nagy pontosságú azonosítását (15. ábra), valamivel a 10<sup>-3</sup> szint alatt is, mely küszöbértéket meghatározónak tekintenek a klinikai döntések meghozatala során [168,169]. 4.3. Dupla-fúziós és disszociációs i-FISH szondák mintázatainak automatizált értékelése formalin-fixált, paraffinba ágyazott szöveti metszeteken

#### 4.3.1. Eredmények

A vizsgálathoz használt dupla-fúziós (LSI *IGH/CCND1* DF, LSI *IGH/BCL-2* DF) és disszociációs (LSI *IGH* DI) szondák által kialakított jelmintázatokat a 17. ábra szemlélteti.

#### <u>A hibridizáció hatékonysága, a szöveti metszetek vastagsága és az analízis sebessége</u>

A hibridizáció minden esetben sikeres volt, igaz az i-FISH szignálok minősége variabilitást mutatott, leginkább a szöveti metszetek vastagságának köszönhetően. A vastagabb metszetek magasabb fluoreszcens háttérzajt és nagyobb jelsűrűséget mutattak, melynek köszönhetően a hibás jelfelismerés aránya is növekedett. Huszonhat esetben meghatároztuk a metszet átlagos vastagságát a minta négy különböző pontján végzett mérések alapján: 4,42 µm (3,03 - 8,03 µm). A 3,6 µm és 5,0 µm közötti vastagság bizonyult az automatizált értékelés számára optimálisnak. Ebben a tartományban a kizárt cellák aránya nem érte el a 35 %-ot. Ennél vékonyabb, illetve vastagabb metszetek esetén a cellák átlagosan 54 %-át el kellett távolítani. A kizárt cellák aránya természetesen nem csak a metszet vastagságától, hanem a sejtmagok denzitásától, valamint az i-FISH szignálok minőségétől is függött.

Minden minta esetén legalább 1000 cellát vizsgáltunk. A mintavétel átlagos sebessége 7,2 cella / másodperc volt. Egy minta komplett analízise, beleértve az értékelést is, átlagosan 9 percet vett igénybe.

# <u>A fúziós szignál meghatározása</u>

A pozitív cellák különböző fúziós jeltávolságok mellett mért arányát a 18.A,B,C ábra mutatja külön-külön a három szonda esetén. Az optimális határérték

az LSI *IGH/CCND1* DF, az *IGH/BCL-2* DF és az *IGH* DI szonda tekintetében 0,5-, 1,0- és 1,2 μm-nek adódott.

### A diagnosztikai határérték megállapítása

Az *IGH/CCND1* szonda esetén a kettő, vagy több fúziós jelet tartalmazó cellák átlagos aránya 5,3 % (tartomány: 1,5 - 10,2 %) volt a módszer beállításához használt tíz negatív mintában. Ugyanez az érték a tíz köpenysejtes limfómás minta esetén 36,7 %-nak (tartomány: 26,6 - 52,0 %) bizonyult. Az *IGH/BCL-2* szonda esetén a negatív minták 11,4 %-ban (tartomány: 4,0 - 17,3 %) tartalmaztak két, vagy több fúziós jellel rendelkező cellát, míg a follikuláris limfómás esetekben 65,2 % (39,9 - 79,6 %) volt e cellák aránya.

Az említett eloszlásokat figyelembe véve, a diagnosztikai határértéket bináris lineáris logisztikus regresszió alapján - *IGH/CCND1* esetén 18,5 %-os pozitív cella aránynál határoztuk meg, míg az *IGH/BCL-2* esetében ugyanez az érték 28,8 %-nak adódott.

Ha az *IGH* szonda használata esetén minden olyan cellát megvizsgáltunk, mely legalább egy piros- és egy zöld jelet tartalmazott, a negatív minták átlagosan 48,2 %-ban (tartomány: 26,8 - 69,1 %), míg a pozitív minták 77,7 %-ban (tartomány: 67,8 - 93,6 %) tartalmaztak pozitív cellákat. Ez a pozitív- és negatív minták megbízható szeparálását lehetetlenné tette. A jelfelismerési hibák gyakran vezettek hibás jeltöbblethez, vagy jelvesztéshez, eltérő számú piros- és zöld jelet eredményezve a cellákban. Ha csak azokat a cellákat vizsgáltuk, melyekben a pirosés zöld jelek száma megegyezett, lehetővé vált a negatív- és pozitív minták helyes elkülönítése. A negatív minták így 28,1 %-ban (tartomány: 7,0 - 41,7 %), míg a pozitív minták 74,2 %-ban (tartomány: 64,5 - 93,9 %) tartalmaztak pozitív cellákat. A szigorított kritériumrendszert használva a diagnosztikai határérték 52,9 % lett.

## Diagnosztikus szenzitivitás

A módszer beállítása után egy teszt csoporton, vakon vizsgáltuk az automatizált analízis hatékonyságát. Az eredmények minden esetben megegyeztek a manuális értékeléssel. A rendszer a tizenkilenc transzlokáció pozitív esetet (*IGH/CCND1*: 5, *IGH/BCL-2*: 5, *IGH*: 9) egyértelműen elkülönítette a tizennyolc (*IGH/CCND1*: 5, *IGH/BCL-2*: 8, *IGH*: 5), transzlokációt nem hordozó esettől.

A negatív minták pozitív celláinak aránya a 0,8 - 10,2 %-os, a 4,0 - 17,3 %-os és a 7,0 - 41,7 %-os tartományba esett az *IGH/CCND1*, az *IGH/BCL-2*, illetve az *IGH* szonda esetén. A pozitív minták hasonló értékei a 23,5 - 52,0 %-os, a 38,3 -79,6 %-os, illetve a 64,5 - 93,9 %-os tartományba estek.

A kontroll- és a teszt csoport mintáinak együttes eredményeit a 4. táblázat mutatja.

#### <u>A cellánkénti jelszám hatása az álpozitivitásra</u>

A cellánkénti jelszám hatását az álpozitivitásra három negatív kontroll mintán vizsgáltuk. A különböző kizárási kritériumoknak köszönhetően DF szondák használatakor a cellák átlagosan több jelet tartalmaztak (*IGH/CCND1*: 8,6 ± 3,6, *IGH/BCL-2*: 7,1 ± 2,1), mint DI szonda mellett (*IGH*: 6,2 ± 3,4). Ha DI szonda esetén csak azokat a cellákat vizsgáltuk, melyekben a piros- és zöld jelek száma megegyezett, az átlagos jelszám még alacsonyabb (4,9 ± 3,0) lett. Az i-FISH szignálok számának cellánkénti növekedésével a cellák álpozitivitása nőtt (19. ábra). Átlagos jelszám mellett az álpozitivitás 3,4 % és 7,5 % volt az *IGH/CCND1*, illetve az *IGH/BCL-2* szondák esetén, míg a DI szondánál 56,5 %-nak adódott. Ez az érték 38,5 %-ra redukálódott, ha csak az egyenlő számú piros- és zöld jeleket tartalmazó cellákat vettük figyelembe.

A DF szondákhoz képest a DI szonda teljesítményét erőteljesebben befolyásolta a jelek számának emelkedése. DF szondák esetén az átlag  $\pm$  SD számú jelet tartalmazó cellák álpoztivitása 2,5 - 11,6 %, illetve 1,5 - 9,9 % közötti tartományba esett. Ez az érték 42,7 - 77,1 % volt DI szonda esetén és 10,2 - 60,8 %os értéket vett fel abban az esetben, ha csak a megegyező számú piros- és zöld jelet tartalmazó cellákat vizsgáltuk.

## A mintavételi módszerek összehasonlítása

Az SFM rendszer a mozaikos mintavétellel átlagosan 16,2 (2,8 - 73,0) mozaikot (átlagos értékek: *IGH/CCND1* 13,4, *IGH/BCL-2* 10,1, *IGH* 26,8), míg rácsos mintavétellel 61,0 (22,4 - 122,0) cellát értékelt ugyanazokon a látómezőkön (átlagos értékek: *IGH/CCND1* 71,0, *IGH/BCL-2* 75,1, *IGH* 37,2). Figyelembe véve egy átlagos mozaik (91,6  $\mu$ m<sup>2</sup>), illetve egy cella (146,3  $\mu$ m<sup>2</sup>) méretét, a digitálisan rögzített teljes terület (átlag: 264200  $\mu$ m<sup>2</sup>) 33,8 %-át vizsgálta a rendszer rácsos mintavétellel, míg csupán 5,8 %-át mozaikos mintavétellel.

## 4.3.2. Az eredmények értékelése

Az i-FISH hatékony módszer citogenetikai aberrációk detektálásához formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákon. Mivel a legtöbb szöveti metszetben a sejtmagokat nem lehet hatékonyan szegmentálni, az automatizált i-FISH analízis kis területeket használ a vizsgálathoz. Ezeket a kis minta területeket lehet illeszteni a különálló sejtek kontúrjaihoz (mozaikos mintavétel), de a magok átfedése és a trunkációs hatás limitálja az egyedülálló, ép sejtek azonosítását hisztológiai környezetben. A rácsos mintavétel az egész látómezőt átalakítja mintává - cellákká [170]. Minden celláról eldönti, hogy az pozitív, negatív, vagy kizárandó az analízisből a jeldetektálási hiba magas valószínűsége miatt, függetlenül attól, hogy hány sejtet tartalmaz.

Munkánk során megvizsgáltuk a hatékonyságát egy olyan automatizált értékelési módszernek, mely rácsos mintavételt használ a limfómás- és normál nyirokcsomókból készült szövettani metszetek analíziséhez. Ezen kívül összehasonlítottuk az *IGH* disszociációs, illetve az *IGH/CCND1* és *IGH/BCL-2* dupla-fúziós szondák teljesítményét.

Transzlokációk i-FISH analízisekor a fúziós (kolokalizált) jelek száma a legfontosabb paraméter, függetlenül a használt szonda típusától. A fúziós jel definiálásához szükséges piros- és zöld jelek közötti távolságok optimális határértékét minden egyes szonda esetén meghatároztuk. Az érték 0,5 μm-nek, 1,0 μm-nek, és 1,2 μm-nek adódott *IGH/CCND1*, *IGH/BCL-2*, illetve *IGH* szonda esetén. Ezek az értékek nagyon hasonlóak a Reichard és mtsai. által közölt eredményekhez (0,8 - 1,2 μm). A szondák közötti különbség magyarázható a fúziós szignálokat alkotó DNS szondák különböző fizikai távolságával. Ez az érték a nemátrendeződött 14-es kromoszómán elhelyezkedő *IGH* szondánál a legnagyobb, mivel az egész J, D és C-régió a piros- és zöld színnel jelölt DNS szakaszok között helyezkedik el. A dupla-fúziós szondák átfedik a töréspontokat, így virtuálisan nincs

távolság az átrendeződött kromoszómán elhelyezkedő DNS szondák között. Mivel azonban a két érintett kromoszómán a töréspont pontos helye változhat, a piros- és zöld i-FISH szignálok optikai centruma közötti távolság variabilitást mutat.

Következő lépésként meghatároztuk mindegyik szonda diagnosztikai határértékét. Ez 2 - 3x nagyobb volt DI szonda esetén (52,9 %), mint a DF szondáknál (18,5 % és 28,8 %). Az érték számolásához jelen esetben nem a megszokott eljárást (átlagos álpozitivitás + 2SD), hanem bináris lineáris logisztikus regressziót alkalmaztunk. Ez egy szigorúbb statisztika, mely a negatív minták álpozitivitását és a pozitív minták álnegativitását egyaránt figyelembe veszi. Egyrészt azért használtuk ezt az eljárást, mert a rácsos mintavétel egy újszerű-, szokatlan-, nem sejtalapú technika, másrészt a módszer beállítása során nem állt módunkban kizárólag pozitív sejteket tartalmazó mintán vizsgálatokat végezni.

A cellánkénti jelszám növekedése nagymértékben befolyásolta a DI szonda álpozitivitását (tartomány: 10,2 - 60,8 %), míg a DF szondák teljesítményére ez kisebb hatást gyakorolt (tartomány: 1,5 - 9,9 % és 2,5 - 11,6 %). A DI szonda szerény teljesítménye meglepőnek tűnhet. Többen ezt a szonda típust hatékonyabbnak tartják transzlokációk szöveti környezetben való kimutatására, mivel akár egy piros-, vagy egy zöld jel is elegendő a pozitivitás megállapításához. Az automatizált analízis szempontjából azonban éppen ez az, ami miatt a DI szonda hajlamosabb a magasabb álpozitivitásra, hiszen akár egyetlen jel hibás felismerése is közvetlenül álpozitivitáshoz vezet, míg DF szonda esetén a hibás jelfelismerés ritkán okoz két fúziós szignált.

A teszt csoportként használt további harminchét mintát a rendszer hiba nélkül diagnosztizálta. A negatív- és pozitív mintákban a pozitív cellák arányának tartománya különbözött a Reichard és mtsai. által bemutatott értékektől (4. táblázat). Az általuk közölt (két fúziós jeles) tartományok: 1 - 5 % és 2 - 7 % a negatív mintákban, 12 - 31 % és 8 - 30 % a pozitív mintákban *IGH/BCL-2*, illetve *IGH/CCND1* DF szondák esetén. A jelen közleményben szereplő értékek magasabbak negatív- és pozitív mintáknál is, de a két populáció közötti különbségek nagyobb mértékűek.

Egy minta komplett kiértékelése körülbelül kilenc percet vett igénybe, mely magában foglalta a vizsgált régió digitális formában történő archiválását is.

Az automatizált vizsgálathoz 3,6- és 5,0 µm közötti metszetvastagság bizonyult optimálisnak. Az ennél vékonyabb, illetve vastagabb minta az analizált cellák számának jelentős csökkenéséhez vezetett.

A mintavételi módszer megválasztása nagymértékben befolyásolta az értékelt cellák/mozaikok számát, ebből következően az analizált terület relatív méretét. Ugyanazon digitális látómezők vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a rácsos mintavétel körülbelül ötször annyi területet értékelt, mint a mozaikos mintavétel. Korábban említésre került, hogy a minta egy bizonyos részének elvesztése nem befolyásolja szignifikáns mértékben a végső eredményt, hiszen ugyanakkora az esélye a pozitív- és negatív sejtmagok analízisből történő kizáródásának. Ötszörös különbség azonban már jelentősnek tekinthető, ezenkívül - citológiai preparátumokkal ellentétben - hisztológiai környezetben a pozitív sejtmagok topográfiai eloszlása rendkívül változó lehet. Ezen szempontok ellenére jelenlegi vizsgálataink során nem tapasztaltunk zavaróan kiugró eltérést a két mintavétel által meghatározott pozitivitás értékek között egyik minta esetén sem, a negatív- és pozitív esetek elkülönítése mindkét módszerrel lehetséges volt.

Összességében elmondható, hogy sikerült beállítanunk egy gyors és megbízható i-FISH mintázat értékelő eljárást transzlokációk szöveti metszeteken történő automatizált kimutatásához. A módszer DF és DI szondával is alkalmazható, de utóbbi használatához szigorúbb analitikai körülményekre van szükség és így is magasabb álpozitivitással kell számolni. Az irodalomban eddig még nem találkoztunk olyan közleménnyel, mely rácsos mintavétel alkalmazásáról számolt volna be transzlokációs i-FISH mintázatok automatizált értékelése kapcsán és legjobb tudomásunk szerint szintén elsőként számoltunk be DI szonda automatizált körülmények között történő használatáról is.

# 5. Megbeszélés

Az onkohematológiai betegségek korszerű diagnosztikája egyaránt megkívánja a szövetek és sejtek morfológiai-, fenotípusos- és genotípusos vizsgálatát. A genotípusban mutatkozó eltérések kimutatására több módszer is alkalmas, melyek közül a leggyakrabban használt eljárások a konvencionális citogenetika, a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció és a különböző polimeráz láncreakción alapuló technikák.

A FISH alkalmas interfázisban lévő sejtek genetikai rendellenességeinek kimutatására. Az abnormalitások detektálását a sejtmagban *in situ* denaturált DNS/RNS molekulákhoz kötődő, fluoreszcens festékekkel jelölt szondák (komplementer nukleinsav-szekvenciák) teszik lehetővé. A humán genom és az onkohematológiai betegségek feltérképezésével a mindennapi diagnosztikában hatékonyan használható, specifikus szondákat fejlesztettek ki, melyekkel célzott genetikai vizsgálatok végezhetők. Mivel a módszer nem igényel sejttenyésztést, a patológiai diagnosztika során előforduló bármely citológiai mintatípus (citospin preparátum, kenet, lenyomati készítmény) alkalmas i-FISH analízisre. Az eljárás formalin-fixált, paraffinba ágyazott anyagokon is kivitelezhető. Ez történhet blokkból izolált magokon vagy metszet körülmények között, de utóbbi esetben az eredmény értelmezésekor nem szabad figyelmen kívül hagyni a trunkációs hatást.

Az eljárás a hematológiai tumorok diagnosztikai protokolljának ma már nélkülözhetetlen eszköze, hiszen a WHO-osztályozás az egyes leukémia és limfóma altípusokat gyakran egy kromoszóma átrendeződés megléte, vagy hiánya alapján differenciálja. A szoros értelemben vett diagnosztikán túl a módszer prognosztikai markerek meghatározásához, klonális evolúció kimutatásához és - automata analizáló rendszerek segítségével - minimális reziduális betegség nyomon követéséhez is használható.

Fluoreszcencia *in situ* hibridizációval numerikus- és strukturális kromoszóma anomáliák is detektálhatók. A számbeli eltérések kimutatása alfa-szatellita DNS-hez kötődő centromer-specifikus szondákkal történik, míg a szubkromoszómális aberrációk (deléció, amplifikáció, transzlokáció, stb.) vizualizálásához lókuszspecifikus szondák használatosak. A gyakorlatban a centromer- és lókusz-specifikus szondákat együtt is alkalmazzák, így összetett kérdések megválaszolása is lehetővé válik. A malignus hemopoetikus betegségekre jellemzőek a reciprok transzlokációk, melyek vizsgálatához - eltérő stratégiával működő - leggyakrabban kétszínű (piros, zöld) szondákat használnak.

A jelmintázat manuális értékelése számos nehézséget rejt magában. Ha a pozitív sejtek aránya nagyon alacsony, a statisztikai megbízhatóság érdekében nagyszámú sejt vizsgálatára van szükség, mely azonban időigényes folyamat. Az értékelő elfogultsága a pozitivitás alul- vagy felülbecsléséhez vezethet, különösen akkor, ha az nagyon alacsony, vagy kiemelkedően magas. Az onkohematológiai diagnosztika számára kiemelkedően fontos transzlokációs i-FISH mintázatok vizsgálatakor döntő jelentőséggel bíró fúziós (kolokalizált) szignálnak nincsen mindenki által elfogadott definíciója.

A számítástechnika és a digitális képanalízis fejlődésének köszönhetően az automatizált i-FISH analízis mára már elérhető lehetőséggé vált, mely mentes a manuális értékelés hátrányaitól.

Vizsgálataink során ezért célként tűztük ki néhány, a patológiai diagnosztika szempontjából jelentőséggel bíró, automatizált transzlokációs i-FISH mintázat értékelő eljárás kidolgozását-standardizálását. Konkrét applikációk: (*i*) *BCR/ABL* analízis - diagnosztikus genotípus vizsgálat citológiai preparátumon; (*ii*) CD10-*ETV6/RUNX1* analízis - kombinált immunfenotipizálás és genotípus vizsgálat citológiai preparátumon minimális reziduális betegség kimutatásához; (*iii*) *CCND1/IGH* és *IGH/BCL-2* analízis - hisztológiai preparátumok genotípusos jellemzése.

Transzlokációs i-FISH mintázatok automatizált analízise követi a manuális értékelés lépéseit: 1. sejtmag szelekciója-objektum felismerése 2. i-FISH szignálok detektálása 3. jeltávolság meghatározása-jelmintázat értékelése.

1. Citológiai preparátumok vizsgálata során a sejtmagok/sejtek felismerése előzetesen optimalizált morfometriai paraméterek (terület, konkavitás, excentricitás) segítségével történt. Az egyedülálló sejtmagok/sejtek sejtaggregátumoktól történő elkülönitése kétparaméteres (terület, excentricitás) szóródási diagramon végzett interaktív kapuzással hatékonyan megvalósítható volt. A sejtfelismerés szenzitivitása ~89 %-os (*BCR/ABL* analízis) és ~95 %-os (CD10-*ETV6/RUNX1* analízis) volt. Ez az eltérés a négyszeres nagyításbeli különbségnek (objektív: 40x vs. 10x) tudható be. Kisebb mértékű nagyítás esetén sokkal több objektumot tartalmaznak a látómezők, így a digitális képek szélére kerülő (inkomplett) sejtek aránya alacsonyabb. A látómező szélével nem érintkező sejteket az automatizált rendszer ~99,4 %-os szenzitivitással ismerte fel. Az egyedülálló sejtmagként/sejtként detektált objektumok 10,4 %-a (*BCR/ABL* analízis), illetve 7,2 %-a (CD10-*ETV6/RUNX1* analízis) valójában aggregátum volt. Az egyedülálló sejtmagok/sejtek felismerésének specificitása 99,3 %-nak (*BCR/ABL* analízis), illetve 99,7 %-nak (CD10-*ETV6/RUNX1* analízis) adódott. Utóbbi két paraméter (aggregátumok aránya, specificitás) vizsgálata során tapasztalt különbség nem szignifikáns, főleg ha figyelembe vesszük, hogy a két analízis által értékelt objektumok száma több mint egy nagyságrenddel eltért.

Hisztológiai preparátumokról felvett képeken a sejtmagokat nem lehet tökéletesen szegmentálni, így kis méretű, analizálandó területeket kell meghatározni az automatizált vizsgálat számára. Az egyik lehetséges megoldás a mozaikos mintavétel, melynek hatékonyságát hátrányosan befolyásolja a háttérfestés heterogenitása és a sejtmagok méretének variabilitása. Ezen felül a mozaikok átfedéséből adódóan többszörös jeldetektálás is előfordulhat. E problémák miatt vizsgálataink során rácsos mintavételt alkalmaztunk, mely az egész látómezőt átalakítja mintává-cellákká, majd minden celláról eldönti, hogy az pozitív, negatív, vagy kizárandó az analízisből a jeldetektálási hiba magas valószínűsége miatt, függetlenül attól, hogy hány sejtmagot tartalmaz. A rácsos mintavétel tehát nem sejt, hanem terület alapú módszer, mely a sejtalapú eljárásoknál megszokotthoz képest egészen más gondolkodásmódot kíván. A sejtfelismeréssel kapcsolatos szenzitivitás és specificitás paraméterek ebben az esetben nem értelmezhetőek, hiszen a mintaterület egyetlen pontja sem vész el kizárólag a DAPI objektumok lokalizációja miatt. A háttérfestés itt a precíz autofókuszáláson kívül azt biztosítja, hogy az i-FISH szignálnak megfelelő paraméterekkel rendelkező objektumok közül a rendszer csak azokat detektálja jelként, melyek sejtmagon belül helyezkednek el.

2. Az i-FISH szignálok helyes felismerése az automatizált analízis számára a legnagyobb kihívás, mivel a jelek nagy variabilitást mutatnak alak-, méret- és intenzitás tekintetében. A jelfelismerés szintén előzetesen optimalizált paraméterek (méret, intenzitás, kontraszt, azonos színű jelek közötti minimális távolság) alapján történt. *BCR/ABL* analízis során a rendszer a piros jeleket 84,9 %-ban, a zöld jeleket 80,9 %-ban ismerte fel helyesen. A két jelcsatorna egymástól független hibáját jelzi, hogy optimalizálás után a sejtmagok ~69 %-ában tapasztaltunk helyes jelfelismerést mindkét csatornában. A helytelen jeldetektálás miatti kizárások mértéke pozitív- és negatív kontroll sejtmagok esetén közelítőleg megegyezett, tehát e procedúra nem befolyásolta jelentősen az analízis végső eredményét. Az *ETV6/RUNX1* vizsgálat esetén hasonló jelfelismerési értékeket tapasztaltunk (R: 85,6 %, G: 78,6 %), a piros extraszignál figyelembe vételétől azonban el kellett tekintenünk, mivel annak mérete és intenzitása rendkívül változó volt. A zöld csatornában tapasztalt kevésbé hatékony jeldetektálás az immunjelölés eltávolítása nyomán visszamaradó, emelkedett háttérfluoreszcenciának volt köszönhető.

Paraffinos metszeteken a szignálok felismerését nehezíti, hogy bizonyos szöveti alkotók (pl.: kollagén rostok, pigmentek) jelentős autofluoreszcenciával rendelkeznek, így a fluoreszcens jelek azonosítása - a metszet vastagságától is függően - problémássá válhat. Az általunk használt hatékony feltárásnak köszönhetően a hibridizáció minden minta esetén sikeres volt, igaz a szignálok minősége, így a helyes jelfelismerés is variabilitást mutatott (74,9 - 90,3 %). A cellák átlagosan 46,1 %-át zártuk ki hibás jelmintázat, vagy túlzott jelsűrűség miatt.

3. Kétszínű transzlokációs szondák használatánál az eltérő színű jelek közötti távolságok alapján különíthetők el a pozitív- és negatív sejtmagok. A fúziós jel, mint paraméter definiálásához minden szonda esetén egy határértéket határoztunk meg. Ha egy piros- és egy zöld jel közötti távolság nem haladta meg ezt az értéket, a jelpárt fúziós (kolokalizált) jelnek tekintettük. Citológiai preparátumok esetén a határérték optimalizálását az átlagos álpozitivitás és az átlagos álnegativitás összegének minimalizálásával végeztük. 100 %-ban pozitív hisztológiai preparátum nem állt rendelkezésünkre, ezért ebben az esetben az álnegativitás értékét nem tudtuk meghatározni. Az optimális jeltávolságot itt a negatív- és pozitív minták pozitivitásai közötti különbségek alapján határoztuk meg, melynek során fontosnak tartottuk a szórások figyelembe vételét is. Optimalizál IdH/CCND1 DF 0,5 μm, LSI IGH/BCL-2 DF 1,0 μm, LSI IGH DI 1,2 μm. Az értékek közötti különbség a fúziós szignálokat alkotó DNS szondák különböző fizikai távolságával, az eltérő minta típusokkal

(citológiai/hisztológiai), illetve a különböző preparálási technikákkal (centrifugálás vs. kicseppentés) magyarázható.

BCR/ABL vizsgálat során az automatizált analízis átlagos álpozitivitása 7,0 %-nak (diagnosztikai határérték: 12,4 %), átlagos álnegativitása 5,5 %-nak adódott. Ezek az értékek valamivel magasabbak a manuális értékelés eredményeinél (álpozitivitás: 5,8 %, álnegativitás: 2,7 %), ami köszönhető lehet a manuális vizsgálat negatív-, vagy pozitív irányban történő elfogultságának nagyon sok negatív-, illetve pozitív sejtet tartalmazó minták esetén. Az ugyanazokon a mintákon manuális- és automatizált módon végzett értékelések eredményei szorosan korreláltak ( $\mathbf{R}^2$  = 0,9892), de a párhuzamos vizsgálatok eredményei manuális analízisnél négyszer akkora tartományban szórtak, mint automatizáció során (32,2 % vs. 8,3 %). ETV6/RUNX1 vizsgálat esetén az álnegativitás 2,0 %, az álpozitivitás 17,3 % volt. Ez az extraszignálos szondáknál nem megszokott, alacsony specificitás az extraszignál már említett okokból - történő mellőzésének, illetve a sejtmagok kis méretének volt köszönhető. Mivel e transzlokáció analízisével gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában szenvedő betegek minimális reziduális betegségét akartuk nyomon követni, az interfázis citogenetikai vizsgálatot kiegészítettük egy előzetes, automatizált immunfenotipizálással. CD10 analízis szenzitivitása А az autofluoreszcens objektumok kizárása után 99,78 %, specificitása 99,79 % volt. Az MRD meghatározásánál fontos a kvantitatív megbízhatóság, melyet három párhuzamos hígítási sorral ellenőriztünk. Az automatizált rendszer által mért CD10 pozitivitások szorosan korreláltak az elvárt elméleti értékekkel ( $R^2 = 0.9831$ ) és az áramlási citometriás mérésekkel is ( $R^2 = 0.9895$ ). A kombinált CD10-*ETV6/RUNX1* módszer szenzitivitása 98,67 %, specificitása 99,97 % volt. Az MRD analízis diagnosztikai határértékét így valamivel a klinikai döntések szempontjából fontos 10<sup>-3</sup> szint alatt, 0,09 %-os pozitivitásnál tudtuk megállapítani. A hígítási sorok mintáinak várt pozitivitás értékeivel a kombinált módszer eredményei szorosabban korreláltak ( $R^2 = 0.9983$ ), mint azt az egyszerű immunfenotipizálásnál tapasztaltuk. Az MRD szempontjából fontos legalsó (0,1 - 0,5 %) tartományban az elvárt értéktől való átlagos eltérés csupán 0,01 % volt.

Hisztológiai preparátumok rácsos mintavétellel történő vizsgálatakor a sejtmag szelekcióhoz - objektum felismeréshez hasonlóan, a jelmintázat értékelése során nyert eredmények interpretálása is eltér a sejtalapú módszereknél megszokottaktól. A minták pozitivitás értékei közvetve, csak arányaiban

hasonlíthatók a sejtalapú módszerek hasonló értékeihez. Rácsos mintavételnél az objektumok relokalizációja egyedi sejt szinten problémás lehet, de hematológiai malignómák szöveti környezetben történő vizsgálatakor az i-FISH analízis célja általában nem annyira az egyedülálló, transzlokáció pozitív sejtmag azonosítása, mint inkább a neoplázia gyanús limfoid infiltrátum pozitivitásának meghatározása. A módszer álpozitivitása 5,3 % és 11,4 % volt IGH/CCND1, illetve IGH/BCL-2 duplafúziós szondák esetén, valamint 28,1 % az IGH disszociációs szondánál. A diagnosztikai határérték DI szonda esetén 2 - 3x magasabb volt, mint a DF szondáknál (52,9 % vs. 18,5 % és 28,8 %). Az álnegativitást nem tudtuk vizsgálni, mivel 100 %-ban pozitív szöveti környezet nem állt rendelkezésünkre. A manuális értékelés alapján pozitív minták átlagos pozitivitása 36,7 %, 65,2 % és 74,2 % volt IGH/CCND1 és IGH/BCL-2 DF, valamint IGH DI szondák esetén. A negatív- és pozitív nyirokcsomó mintákat el tudtuk különíteni egymástól, igaz a DI szonda használata során szigorúbb szelekciós kritériumokat kellett bevezetnünk. A diagnosztikus szenzitivitás 100 %-os volt, melyet a módszer beállítása után teszt csoporton ellenőriztünk. Negatív kontrollokon végzett vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a cellánkénti jelszám növekedésével az álpozitivitás nő és ez a jelenség - a DF szondákhoz képest - a DI szonda teljesítményét sokkal jobban befolyásolja. Ennek oka az lehet, hogy DI szonda használatakor akár egyetlen jel hibás felismerése is közvetlenül álpozitivitáshoz vezet, míg DF szonda esetén a hibás jelfelismerés ritkán okoz két fúziós szignált. A szöveti metszeten végzett automatizált i-FISH analízis tehát DF és DI szondával is elvégezhető, de utóbbi használatához szigorúbb analitikai körülményekre van szükség és így is magasabb álpozitivitással kell számolnunk.

Egy sejtmag automatizált i-FISH analízise - beleértve a fókuszálást, a sejtmag szelekciót, a három csatornában történő képfelvételt és a citometriai paraméterek rögzítését - citológiai preparátumok esetén 11 másodpercet vett igénybe 40x-es objektív használata mellett. Ez az érték valamivel megnőtt (15 másodperc) abban az esetben, ha a jelmintázatot immunfenotipizálást követően vizsgáltuk, mivel ekkor a relokalizációt is el kellett végeznie a műszernek.

Immunfenotipizálásnál a rendszer 33 db sejtet detektált és értékelt másodpercenként. Ez a nagy sebesség annak köszönhető, hogy itt elegendő volt a

10x-es objektív használata is, hiszen a jel mérete gyakorlatilag a sejtmag méretének nagyságrendjébe esett.

Szövetek i-FISH mintázatának jellemzésénél ~7 cellát rögzített a rendszer másodpercenként. Rácsos mintavételnél a műszer ugyan rögzíti a DAPI csatornában a fluoreszcencia intenzitást, mely fontos az i-FISH szignálok detektálása során a maszkoláshoz, de a sejtmagok szegmentálását nem kell elvégeznie, és ez jelentősen gyorsítja a mintavétel sebességét.

Az automatizált i-FISH analízis sebessége tehát nem haladja meg a manuális értékelés sebességét, de a rendszer nem csak értékeli a sejtmagokat, hanem archiválja is a róluk felvett képeket. Ehhez manuális értékelés során több órára lenne szükség. Az immunfenotipizálást nagy sebességgel hajtja végre, ráadásul a koordináták rögzítésével lehetővé teszi a későbbi relokalizációt, a korrelált paramétergyűjtést.

Összességében elmondható, hogy munkánk során sikerült beállítanunk olyan - különböző típusú kérdések megválaszolására alkalmas - automatizált i-FISH mintázat értékelési eljárásokat, melyek hozzájárulhatnak a hematológiai tumorok hatékony, korszerű patológiai diagnosztikájához. A módszerek standardizált specifikációit megadtuk, így a megfelelő eszközök beszerzése után bármely laboratórium könnyedén reprodukálhatja az eredményeket és alkalmazhatja a technikát. Ezen felül a bemutatott logikai lépcsők elősegítik más, hasonló elven működő applikációk beállítását.

# 6. Az új eredmények összefoglalása

1. Citológiai preparátumokon végzett i-FISH vizsgálataink során kidolgoztuk a t(9;22)(q34;q11) LSI *BCR/ABL* SF szondával való automatizált értékelését. Elsőként írtuk le a módszer teljes specifikációját, mely nem csak a már más munkacsoportok által is ismertetett specificitást és a kimutathatóság alsó szintjét foglalja magában, hanem a szenzitivitást, valamint a sejtmag azonosítással és a szignál detektálással kapcsolatos paramétereket is.

2. A beállított automatizált eljárást összehasonlítottuk a manuális értékeléssel. Megállapítottuk, hogy a manuális vizsgálatnál az értékelők között tapasztalt nagymértékű variabilitás elkerülhető automatizált analízissel, így nagyobb statisztikai megbízhatósághoz juthatunk akkor is, ha csak 200 db sejtmagot vizsgálunk mintánként.

3. Az automatizált i-FISH módszer továbbfejlesztéseként előzetes - szintén automatizált - immunfenotipizálással kombináltuk az i-FISH analízist, így beállítottunk egy olyan módszert, mellyel lehetővé vált a pALL-ben leggyakoribb geno- és fenotípusos elváltozást mutató CD10<sup>+</sup> és t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó sejtek kimutatása, valamivel a klinikai döntések szempontjából fontos 10<sup>-3</sup> szint alatt is. Nem csak az immunfluoreszcens markerre nézve pozitív sejtek szelektálása történt automatizáltan, hanem - csupán minimális interaktivitással terhelt - 3D automatizált mintavételi eljárást alkalmaztunk az i-FISH mintázat jellemzéséhez is. A módszer teljes specifikációját megadtuk, kvantitatív megbízhatóságát ellenőriztük.

4. Elsőként használtunk rácsos mintavételt transzlokációs i-FISH mintázatok paraffinos metszeteken történő - automatizált értékeléséhez, mely eljárás mentes a mozaikos mintavétel következő hátrányaitól: (*i*) háttérfestés heterogenitása; (*ii*) sejtmagok méretének variabilitása; (*iii*) többszörös jeldetektálás.

5. Elsőként számoltunk be disszociációs szonda alkalmazásáról hisztológiai környezetben történő, automatizált i-FISH analízis kapcsán.

6. Összehasonlítottuk a disszociációs (*IGH*), valamint a dupla-fúziós (*CCND1/IGH*, *IGH/BCL-2*) szondák hatékonyságát szöveti metszeten történő, automatizált i-FISH analízis tekintetében. Megállapítottuk, hogy mindkét szondatípus alkalmas a pozitív- és negatív minták helyes szeparálására, de a disszociációs szonda esetén szigorúbb analitikai körülményekre van szükség és mindenképpen magasabb álpozitivitással kell számolnunk.

# 7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Pajor László professzor úrnak, aki diákkörös korom óta támogat, aki bevezetett a tudományos kutatómunka minden egyes fázisába a problémafelvetéstől kezdve egészen a publikálásig és aki mindemellett intézeten belül teljes mértékben megteremtette a munkám számára elengedhetetlen infrastrukturális hátteret.

Köszönöm Dr. Kajtár Béla segítségét, akihez minden nap fordulhattam kérdéseimmel és aki rendkívül sokat segített az egész munka során. Értékes tanácsai és a publikálás során nyújtott közreműködése nagymértékben hozzájárult e disszertáció megszületéséhez.

Köszönettel tartozom a Pathológiai Intézet összes munkatársának, kiemelten Kalász Veronikának a sejttenyésztésben, Kneif Máriának, Hermesz Juditnak és Sepsei Ivettnek a preparátumok készítése során nyújtott segítségért, Jáksó Pálnak az áramlási citometriai mérésekért és a publikálás során nyújtott technikai segítségért valamint Pinczés Zoltánné Dr. László Renátának és Lacza Ágnesnek az értékes tudományos beszélgetésekért.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm Családom sok éves támogatását, türelmét és megértését, mellyel lehetővé vált számomra e munka elkészítése.

# 8. Irodalomjegyzék

- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. Chromosoma 1970;30(2):215-27.
- [2] Unakul W, Hsu TC. The C- and G-banding patterns of Rattus norvegicus chromosomes. J Natl Cancer Inst. 1972 Nov;49(5):1425-31.
- [3] Shaffer LG, Tommerup N. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). S. Karger AG, Basel 2005 pp 6-7.
- [4] Oxford JM, Harnden DG, Parrington JM, Delhanty JD. Specific chromosome aberrations in ataxia telangiectasia. J Med Genet. 1975 Sep;12(3):251-62.
- [5] Centerwall WR, Merrell PR. Familial D/D translocation t(13q;14q). Eight members in four generations. Clin Genet. 1975 Feb;7(2):91-7.
- [6] Raap AK. Advances in fluorescence in situ hybridization. Mutat Res. 1998 May 25;400(1-2):287-98.
- [7] Pajor L, Szuhai K, Mehes G, Kosztolányi G, Jáksó P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtár P. Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cytometry. 1998 Apr 15;34(2):87-94.
- [8] Pajor L. Interphase cytogenetics in oncologic diagnosis. Orv Hetil. 1998 Dec 6;139(49):2939-46.
- [9] Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 Oct;64(2):600-4.

- [10] John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. 1969 Aug 9;223(5206):582-7.
- [11] Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. Exp Cell Res. 1980 Aug;128(2):485-90.
- Hougaard DM, Hansen H, Larsson LI. Non-radioactive in situ hybridization for mRNA with emphasis on the use of oligodeoxynucleotide probes. Histochem Cell Biol. 1997 Oct-Nov;108(4-5):335-44.
- [13] Puvion-Dutilleul F, Puvion E. Non-isotopic electron microscope in situ hybridization for studying the functional sub-compartmentalization of the cell nucleus. Histochem Cell Biol. 1996 Jul;106(1):59-78.
- [14] Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. Nucleic Acids Res. 1991 Jun 25;19(12):3237-41.
- [15] Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):6633-7.
- [16] Manuelidis L, Langer-Safer PR, Ward DC. High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. J Cell Biol. 1982 Nov;95(2 Pt 1):619-25.
- [17] Singer RH, Ward DC. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinated nucleotide analog. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Dec;79(23):7331-5.
- [18] Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, Taneja KL. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to

different cytoplasmic compartments. J Cell Biol. 1993 Oct;123(1):165-72. Erratum in: J Cell Biol 1993 Dec;123(6 Pt 2):following 1907.

- [19] PubMed. www.nlm.nih.gov
- [20] Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. Curr Issues Mol Biol. 1999;1(1-2):89-104.
- [21] Corey DR. Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition. Trends Biotechnol. 1997 Jun;15(6):224-9.
- [22] Sápi Z, Bodó M. FISH diagnostics. Magy Onkol. 2002;46(1):25-32.
- [23] Sain B, Erdei S. Génsebészet. Gondolat Könyvkiadó, Budapest 1985 pp 186-97.
- [24] Tibiletti MG. Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. Cytogenet Genome Res. 2007;118(2-4):229-36.
- [25] Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J Mol Biol. 1977 Jun 15;113(1):237-51.
- [26] Tamme R, Mills K, Rainbird B, Nornes S, Lardelli M. Simple, directional cDNA cloning for in situ transcript hybridization screens. Biotechniques. 2001 Oct;31(4):938-42, 944, 946.
- [27] Berr A, Schubert I. Direct labelling of BAC-DNA by rolling-circle amplification. Plant J. 2006 Mar;45(5):857-62.
- [28] Hopman AH, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, van der Ploeg M, van Duijn P. Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. Histochemistry. 1986;85(1):1-4.

- [29] Dirks RW, van Gijlswijk RP, Tullis RH, Smit AB, van Minnen J, van der Ploeg M, Raap AK. Simultaneous detection of different mRNA sequences coding for neuropeptide hormones by double in situ hybridization using FITC- and biotin-labeled oligonucleotides. J Histochem Cytochem. 1990 Apr;38(4):467-73.
- [30] Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry. 1989 Jan;10(1):20-7.
- [31] Dirks RW, Van Gijlswijk RP, Vooijs MA, Smit AB, Bogerd J, van Minnen J, Raap AK, Van der Ploeg M. 3'-end fluorochromized and haptenized oligonucleotides as in situ hybridization probes for multiple, simultaneous RNA detection. Exp Cell Res. 1991 Jun;194(2):310-5.
- [32] Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M. Multiple fluorescence in situ hybridization. Cytometry. 1990;11(1):126-31.
- [33] Nederlof PM, van der Flier S, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK. Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. Cytometry. 1992;13(8):839-45.
- [34] Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J. New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. Eur J Hum Genet. 1999 Jan;7(1):2-11.
- [35] Brandriff B, Gordon L, Trask B. A new system for high-resolution DNA sequence mapping interphase pronuclei. Genomics. 1991 May;10(1):75-82.
- [36] Seong DC, Kantarjian HM, Ro JY, Talpaz M, Xu J, Robinson JR, Deisseroth AB, Champlin RE, Siciliano MJ. Hypermetaphase fluorescence in situ

hybridization for quantitative monitoring of Philadelphia chromosomepositive cells in patients with chronic myelogenous leukemia during treatment. Blood. 1995 Sep 15;86(6):2343-9.

- [37] El-Rifai W, Ruutu T, Elonen E, Volin L, Knuutila S. Prognostic value of metaphase-fluorescence in situ hybridization in follow-up of patients with acute myeloid leukemia in remission. Blood. 1997 May 1;89(9):3330-4.
- [38] Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet. 1996 Apr;12(4):368-75.
- [39] Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.
- [40] Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen M, Müller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. Am J Hum Genet. 1999 Aug;65(2):448-62.
- [41] Brown J, Horsley SW, Jung C, Saracoglu K, Janssen B, Brough M, Daschner M, Beedgen B, Kerkhoffs G, Eils R, Harris PC, Jauch A, Kearney L. Identification of a subtle t(16;19)(p13.3;p13.3) in an infant with multiple congenital abnormalities using a 12-colour multiplex FISH telomere assay, M-TEL. Eur J Hum Genet. 2000 Dec;8(12):903-10.
- [42] Szuhai K, Tanke HJ. COBRA: combined binary ratio labeling of nucleic-acid probes for multi-color fluorescence in situ hybridization karyotyping. Nat Protoc. 2006;1(1):264-75.
- [43] Wiegant J, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, Meltzer P. Differentially painting human chromosome

arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. Genome Res. 2000 Jun;10(6):861-5.

- [44] Lengauer C, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D. Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. Hum Mol Genet. 1993 May;2(5):505-12.
- [45] Teixeira MR, Micci F, Dietrich CU, Heim S. Cross-species color banding characterization of chromosomal rearrangements in leukemias with incomplete G-band karyotypes. Genes Chromosomes Cancer. 1999 Sep;26(1):13-9.
- [46] Harrison CJ, Yang F, Butler T, Cheung KL, O'Brien PC, Hennessy BJ, Prentice HG, Ferguson-Smith M. Cross-species color banding in ten cases of myeloid malignancies with complex karyotypes. Genes Chromosomes Cancer. 2001 Jan;30(1):15-24.
- [47] Jaju RJ, Haas OA, Neat M, Harbott J, Saha V, Boultwood J, Brown JM, Pirc-Danoewinata H, Krings BW, Müller U, Morris SW, Wainscoat JS, Kearney L. A new recurrent translocation, t(5;11)(q35;p15.5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. The UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). Blood. 1999 Jul 15;94(2):773-80.
- [48] Tosi S, Harbott J, Haas OA, Douglas A, Hughes DM, Ross FM, Biondi A, Scherer SW, Kearney L. Classification of deletions and identification of cryptic translocations involving 7q by fluorescence in situ hybridization (FISH). Leukemia. 1996 Apr;10(4):644-9.
- [49] Brown J, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L. Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). Nat Med. 2001 Apr;7(4):497-501.

- [50] Selig S, Okumura K, Ward DC, Cedar H. Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization. EMBO J. 1992 Mar;11(3):1217-25.
- [51] Smith ZE, Higgs DR. The pattern of replication at a human telomeric region (16p13.3): its relationship to chromosome structure and gene expression. Hum Mol Genet. 1999 Aug;8(8):1373-86.
- [52] Szentirmay Z, Ishizaka Y, Ohgaki H, Tahira T, Nagao M, Esumi H. Demonstration by in situ hybridization of ret proto-oncogene mRNA in developing placenta during mid-term of rat gestation. Oncogene. 1990 May;5(5):701-5.
- [53] Dirks RW, van de Rijke FM, Fujishita S, van der Ploeg M, Raap AK. Methodologies for specific intron and exon RNA localization in cultured cells by haptenized and fluorochromized probes. J Cell Sci. 1993 Apr;104 (Pt 4):1187-97.
- [54] Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum Mol Genet. 1996 May;5(5):685-91.
- [55] Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM. Short telomeres on human chromosome 17p. Nat Genet. 1998 Jan;18(1):76-80.
- [56] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
- [57] Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. Semin Hematol. 2000 Oct;37(4):348-57.
- [58] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
- [59] Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. Nat Genet. 1999 Sep;23(1):41-6.
- [60] Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet. 1988 Nov;80(3):224-34.
- [61] Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec;85(23):9138-42.
- [62] Visser AE, Aten JA. Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. J Cell Sci. 1999 Oct;112 (Pt 19):3353-60.
- [63] Heiskanen M, Peltonen L, Palotif A. Visual mapping by high resolution FISH. Trends Genet. 1996 Oct;12(10):379-82.
- [64] Haaf T, Ward DC. High resolution ordering of YAC contigs using extended chromatin and chromosomes. Hum Mol Genet. 1994 Apr;3(4):629-33.
- [65] Heiskanen M, Karhu R, Hellsten E, Peltonen L, Kallioniemi OP, Palotie A. High resolution mapping using fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. Biotechniques. 1994 Nov;17(5):928-9, 932-3.

- [66] Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. Science. 1997 Sep 5;277(5331):1518-23.
- [67] Senger G, Jones TA, Fidlerová H, Sanséau P, Trowsdale J, Duff M, Sheer D. Released chromatin: linearized DNA for high resolution fluorescence in situ hybridization. Hum Mol Genet. 1994 Aug;3(8):1275-80.
- [68] Florijn RJ, Bonden LA, Vrolijk H, Wiegant J, Vaandrager JW, Baas F, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. Hum Mol Genet. 1995 May;4(5):831-6.
- [69] Florijn RJ, van de Rijke FM, Vrolijk H, Blonden LA, Hofker MH, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK. Exon mapping by fiber-FISH or LR-PCR. Genomics. 1996 Dec 15;38(3):277-82.
- [70] Vaandrager JW, Schuuring E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. Blood. 1996 Aug 15;88(4):1177-82.
- [71] Emmerich P, Jauch A, Hofmann MC, Cremer T, Walt H. Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells. Lab Invest. 1989 Aug;61(2):235-42.
- [72] Paternoster SF, Brockman SR, McClure RF, Remstein ED, Kurtin PJ, Dewald GW. A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 2002;160(6):1967-72.

- [73] Bayer JA, Bauman JG. Flow cytometric detection of beta-globin mRNA in murine haemopoietic tissues using fluorescent in situ hybridization. Cytometry. 1990;11(1):132-43.
- [74] Pajor L, Bauman JG. Flow cytometric measurement of rRNA levels detected by fluorescent in situ hybridization in differentiating K-562 cells. Histochemistry. 1991;96(1):73-81.
- [75] Pajor L, Honeyman TW. Combined light and fluorescent microscopical imaging of nucleolar organizer regions and cellular rRNA as detected by fluorescent in situ hybridization. Cytometry. 1995 Feb 1;19(2):171-6.
- [76] Ortyn WE, Perry DJ, Venkatachalam V, Liang L, Hall BE, Frost K, Basiji DA. Extended depth of field imaging for high speed cell analysis. Cytometry A. 2007 Apr;71(4):215-31.
- [77] Tarkkanen M, Nordling S, Böhling T, Kivioja A, Karaharju E Szymanska J, Elomaa I, Knuutila S. Comparison of cytogenetics, interphase cytogenetics, and DNA flow cytometry in bone tumors. Cytometry. 1996 Sep 15;26(3):185-91.
- [78] Méhes K, Kosztolányi G. Current interpretation of mosaicism. Orv Hetil. 1990 Aug 19;131(33):1815-9.
- [79] Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Pajor L, Oláh E. Biclonal chromosomal aberrations in a child with myelodysplastic syndrome. Cancer Genet Cytogenet. 1999 Jan 1;108(1):13-8.
- [80] Dhingra K, Sneige N, Pandita TK, Johnston DA, Lee JS, Emami K, Hortobagyi GN, Hittelman WN. Quantitative analysis of chromosome in situ hybridization signal in paraffin-embedded tissue sections. Cytometry. 1994 Jun 1;16(2):100-12.

- [81] Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW. Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. Am J Pathol. 1994 Feb;144(2):237-43.
- [82] Schurter MJ, LeBrun DP, Harrison KJ. Improved technique for fluorescence in situ hybridisation analysis of isolated nuclei from archival, B5 or formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. Mol Pathol 2002;55:121-4.
- [83] Mitelman Database. http://bmc.ub.uni-potsdam.de/1476-4598-3-25/Mitelman. htm
- [84] Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher MR, Ganser A, Lichter P, Döhner H. Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. Blood. 1994 Apr 1;83(7):1922-8.
- [85] Coignet LJ, Schuuring E, Kibbelaar RE, Raap TK, Kleiverda KK, Bertheas MF, Wiegant J, Beverstock G, Kluin PM. Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. Blood. 1996 Feb 15;87(4):1512-9.
- [86] Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. Anticancer Res. 2003 Mar-Apr;23(2A):1139-48.
- [87] Knuutila S. Lineage specificity in haematological neoplasms. Br J Haematol. 1997 Jan;96(1):2-11.
- [88] Weber-Matthiesen K, Müller-Hermelink A, Deerberg J, Scherthan H, Schlegelberger B, Grote W. Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. J Histochem Cytochem. 1993 Nov;41(11):1641-4.

- [89] Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R. Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. Am J Pathol. 2002 Aug;161(2):413-20.
- [90] Méhes G, Luegmayr A, Kornmüller 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. Am J Pathol. 2003 Aug;163(2):393-9.
- [91] Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. J Mol Diagn 2006;8(2):141-51.
- [92] Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgay-Mörschel M, Weitz S, Bentz M, Lichter P. High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. Blood. 1993 Apr 15;81(8):2118-24.
- [93] Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M. Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. Genes Chromosomes Cancer. 1997 Apr;18(4):246-53.
- [94] Carothers AD. Counting, measuring, and mapping in FISH-labelled cells: sample size considerations and implications for automation. Cytometry. 1994 Aug 1;16(4):298-304.
- [95] Vrolijk H, Sloos WCR, van de Rijke FM, Mesker WE, Netten H, Young IT, Raap AK, Tanke HJ. Automation of Spot Counting in Interphase Cytogenetics Using Brightfield Microscopy. Cytometry 1996;24:158-166.

- [96] Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. Cancer Genet Cytogenet. 2001;131(2):125-134.
- [97] Cohen N, Novikov I, Hardan I, Esa A, Brok-Simoni F, Amariglio N, Rechavi G, Ben-Bassat I, Trakhtenbrot L. Standardization criteria for the detection of BCR/ABL fusion in interphase nuclei of chronic myelogenous leukemia patients by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 2000;123(2):102-8.
- [98] Kowalczyk JR, Gaworczyk A, Winnicka D, Lejman M, Babicz M. Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate. Cancer Genet Cytogenet. 2003;142(1):51-55.
- [99] Grand FH, Chase A, Iqbal S, Nguyen DX, Lewis JL, Marley SB, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. A two-color BCR-ABL probe that greatly reduces the false positive and false negative rates for fluorescence in situ hybridization in chronic myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 1998;23(2):109-15.
- [100] Lazaridou A, Chase A, Melo J, Garicochea B, Diamond J, Goldman J. Lack of reciprocal translocation in BCR-ABL positive Ph-negative chronic myeloid leukaemia. Leukemia. 1994;8(3):454-7.
- [101] Mohr B, Bornhauser M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Naumann R, Prange-Krex G, Mohm J, Kroschinsky F, Ehninger G, Thiede C. Problems with interphase fluorescence in situ hybridization in detecting BCR/ABLpositive cells in some patients using a novel technique with extra signals. Cancer Genet Cytogenet 2001;127(2):111-7.

- [102] Netten H, Young IT, van Vliet LJ, Tanke HJ, Vroljik H, Sloos WC. FISH and chips: automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. Cytometry. 1997 May 1;28(1):1-10.
- [103] Ortiz de Solorzano C, Santos A, Vallcorba I, Garcia-Sagredo, del Pozo F. Automated FISH spot counting in interphase nuclei: statistical validation and data correction. Cytometry 1998;31:93-9.
- [104] Lerner B, Clocksin WF, Dhanjal S, Hultén MA, Bishop CM. Automatic signal classification in fluorescence in situ hybridization images. Cytometry. 2001 Feb 1;43(2):87-93.
- [105] Gué M, Messaoudi C, Sun JS, Boudier T. Smart 3D-FISH: automation of distance analysis in nuclei of interphase cells by image processing. Cytometry A. 2005 Sep;67(1):18-26.
- [106] Reichard KK, Hall BK, Corn A, Foucar MK, Hozier J. Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffin-embedded whole tissue sections in B-cell lymphoma. Mod Pathol 2006;19(8):1027-33. Epub 2006 May 5.
- [107] Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Livanos G, Zervakis M, Pitas I, Lyroudia K. Automated analysis of FISH and immunohistochemistry images: a review. Cytometry A 2007;71(7):439-50.
- [108] Fernández JL, Goyanes V, López-Fernández C, Buño I, Gosálvez J. Quantification of C-ERB-B2 gene amplification in breast cancer cells using fluorescence in situ hybridization and digital image analysis. Cancer Genet Cytogenet. 1996 Jan;86(1):18-21.
- [109] Truong K, Boenders J, Maciorowski Z, Vielh P, Dutrillaux B, Malfoy B, Bourgeois CA. Signal amplification of FISH for automated detection using image cytometry. Anal Cell Pathol. 1997 May;13(3):137-46.

- [110] Klijanienko J, Couturier J, Galut M, El-Naggar AK, Maciorowski Z, Padoy E, Mosseri V, Vielh P. Detection and quantitation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplification in breast cancer fine-needle samples. Cancer. 1999 Oct 25;87(5):312-8.
- [111] Huber R, Kulka U, Lörch T, Braselmann H, Engert D, Figel M, Bauchinger M. Technical report: application of the Metafer2 fluorescence scanning system for the analysis of radiation-induced chromosome aberrations measured by FISH-chromosome painting. Mutat Res. 2001 May 31;492(1-2):51-7.
- [112] Raimondo F, Gavrielides MA, Karayannopoulou G, Lyroudia K, Pitas I, Kostopoulos I. Automated evaluation of Her-2/neu status in breast tissue from fluorescent in situ hybridization images. IEEE Trans Image Process. 2005 Sep;14(9):1288-99.
- [113] Lindsay AB, David H. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. J Mol Hist 2007;38:151-7.
- [114] Johnson KL, Stroh H, Khosrotehrani K, Bianchi DW. Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: a comparison of manual and automated microscopy. Microsc Res Tech. 2007 Jul;70(7):585-8.
- [115] Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Karayannopoulou G, Kostopoulos I, Bobos M, Bevilacqua G, Aretini P, Starita A, Lyroudia K, Pitas I. Evaluation of FISH image analysis system on assessing HER2 amplification in breast carcinoma cases. Breast. 2008 Feb;17(1):80-4.
- [116] Kozubek M, Kozubek S, Lukasova E, Mareckova E, Bartova E, Skalnikova M, Jergova A. High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. Cytometry 1999;36:279-293.
- [117] Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960;132:1197.

- [118] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243:290-3.
- [119] Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. The Oncologist 2000;5:405-415.
- [120] Paschka P, Muller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, Weisser A, Petzold A, Konig H, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interpheron alpha. Low levels of residual disease are associated with continous remission. Leukemia 2003;17:1687-94.
- [121] Reinhold U, Hennig E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MW. FISH for BCR-ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib. Leukemia 2003;17:1925-1929.
- [122] Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, Mateos G, Caballero MD, Hernandez J, Moro MJ, Mateos MV, Orfao A. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1998;16:3774-81.
- [123] Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000;96:2691-6.
- [124] Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry

in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;100:52-8.

- [125] Bruggemann M, Droese J, Bolz I, Luth P, Pott C, von Neuhoff N, Scheuering U, Kneba M. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. Leukemia 2000;14:1419-25.
- [126] Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000;14:1426-35.
- [127] van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2001;15:1485-7.
- [128] de Haas V, Breunis WB, Dee R, Verhagen OJ, Kroes W, van Wering ER, van Dongen JJ, van den Berg H, van der Schoot CE. The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2002;116:87-93.
- [129] Kereskai L, Vass JA, Kneif M, Pajor L. Correlation between BCR-ABL expression and tumor burden is restricted to the transition from minor to major cytogenetic response in interferon treated CML patients. Pathol Oncol Res 2003;9:174-9.
- [130] Ryan DH, Chapple CW, Kossover SA, Sandberg AA, Cohen HJ. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. Blood 1987;70:814-21.

- [131] Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. Blood 1992;79:3245-52.
- [132] Cuneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Scapoli G, Castoldi G, Van Den Berghe H, Hagemeijer A. Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Phpositive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. Leukemia 1998;12:1718-23.
- [133] Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. Blood 1992;79:1796-801.
- [134] Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterisation of tumour cells. J Histochem Cytochem 1992;40:171-5.
- [135] Mehes G, Luegmayr A, Ambros IM, Ladenstein R, Ambros PF. Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumour cells in the bone marrow. Clin Cancer Res 2001;7:1969-75.
- [136] Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R. Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. Am J Pathol. 2002 Aug;161(2):413-20.
- [137] Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisse C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 1999;154(5):1449-52.

- [138] Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. J Mol Diagn 2003;5(3):168-75.
- [139] Sun T, Nordberg ML, Cotelingam JD, Veillon DM, Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. Am J Hematol 2003;74(1):78-84.
- [140] Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. Diagn Mol Pathol 2004;13(4):197-206.
- [141] Godon A, Genevieve F, Valo I, Josselin N, Talmant P, Foussard C, Avet-Loiseau H, Ifrah N, Zandecki M, Rousselet MC. Formalin-fixed and paraffinembedded nodal non-Hodgkin's lymphomas demonstrate the same chromosome changes as those found in frozen samples: a comparative study using interphase fluorescence in situ hybridization. Diagn Mol Pathol 2004;13:97-104.
- [142] Schreuder MI, Hoefnagel JJ, Jansen PM, van Krieken JH, Willemze R, Hebeda KM. FISH analysis of MALT lymphoma-specific translocations and aneuploidy in primary cutaneous marginal zone lymphoma. J Pathol 2005;205:302-10.
- [143] Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, Bailey RJ, Proffitt J, Wyatt WA, Hanson CA, Dewald GW. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. Br J Haematol 2000;110:856-62.
- [144] Nomura K, Yoshino T, Nakamura S, Akano Y, Tagawa H, Nishida K, Seto M, Nakamura S, Ueda R, Yamagishi H, Taniwaki M. Detection of t(11;18)(q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue sections by using

fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 2003;140(1):49-54.

- [145] Matsumoto Y, Nomura K, Matsumoto S, Ueda K, Nakao M, Nishida K, Sakabe H, Yokota S, Horiike S, Nakamine H, Nakamura S, Taniwaki M. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. Cancer Genet Cytogenet 2004;150(1):22-6.
- [146] Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004;12:259-65.
- [147] Hirose Y, Masaki Y, Karasawa H, Shimoyama K, Fukushima T, Kawabata H, Ogawa N, Wano Y, Ozaki M. Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using t(14;18) compared with immunohistochemistry. Int J Hematol 2005;81(1):48-57.
- [148] Dewald G, Stallard R, Alsaadi A, Arnold S, Blough R, Ceperich TM, Rafael Elejalde B, Fink J, Higgins JV, Higgins RR, Hoeltge GA, Hsu WT, Johnson EB, Kronberger D, McCorquodale DJ, Meisner LF, Micale MA, Oseth L, Payne JS, Schwartz S, Sheldon S, Sophian A, Storto P, Van Tuinen P, Wenger GD, Wiktor A, Willis LA, Yung JF, Zenger-Hain J. A multicenter investigation with D-FISH BCR/ABL1 probes. Cancer Genet Cytogenet. 2000;116:97-104.
- [149] Lukasova E, Kozubek S, Kozubek M, Kjeronska J, Ryznar L, Horakova J, Krahulcova E, Horneck G. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukemia. Hum Genet 1997;100:525-535.
- [150] Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Arkin S, Declerck L,

Cohen HJ, Sallan SE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. Blood 2001;97:1211-8.

- [151] Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998;339:605-15.
- [152] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. CA Cancer J Clin. 2004;54:8-29.
- [153] Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. J Clin Oncol 1993;11:209-17.
- [154] Stubberfield TG, Byrne GC, Jones TW. Growth and growth hormone secretion after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood. 18-Gy versus 24-Gy cranial irradiation. J Pediatr Hematol Oncol 1995;17:167-71.
- [155] Pui CH, Behm FG, Raimondi SC, Dodge RK, George SL, Rivera GK, Mirro J Jr, Kalwinsky DK, Dahl GV, Murphy SB. Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med 1989;321:136-42.
- [156] Iuvone L, Mariotti P, Colosimo C, Guzzetta F, Ruggiero A, Riccardi R. Long-term cognitive outcome, brain computed tomography scan, and magnetic resonance imaging in children cured for acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2002;95:2562-70.
- [157] Lipshultz SE, Lipsitz SR, Sallan SE, Simbre VC 2nd, Shaikh SL, Mone SM, Gelber RD, Colan SD. Long-term enalapril therapy for left ventricular

dysfunction in doxorubicin-treated survivors of childhood cancer. J Clin Oncol 2002;20:4517-22.

- [158] Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, Hutchinson RJ, Lange BJ, Nachman JB, Reaman GH, Sather HN, Steinherz PG, Trigg ME, Tubergen DG, Uckun FM. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1997;80:1717-26.
- [159] Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, Rossi L, Borgstrom GH, Tallman JK, Andersson L, de la Chapelle A. A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. Blood 1984;64:1116-22.
- [160] Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, de Groot-Swings G, Kluin-Nelemans JC, Beverstock GC, Fibbe WE, Kluin PM. Combined immunophenotyping and DNA in situ hybridization to study lineage involvement in patients with myelodysplastic syndromes. Blood 1992;79:1823-8.
- [161] Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Rapid immunophenotypic characterization of chromosomally aberrant cells by the new FICTION method. Cytogenet Cell Genet 1993;63:123-5.
- [162] Zhang Y, Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Rohde K, Winkemann M, Haferlach T, Gassmann W, Ludwig WD, Grote W, Loffler H, Schlegelberger B. Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. Br J Haematol 1996;92:673-80.
- [163] Callet-Bauchu E, Renard N, Gazzo S, Poncet C, Morel D, Pages J, Salles G, Coeur P, Felman P. Distribution of the cytogenetic abnormality +i(3)(q10) in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a FICTION study in three cases. Br J Haematol 1997;99:531-6.

- [164] Martinez-Ramirez A, Cigudosa JC, Maestre L, Rodriguez-Perales S, Haralambieva E, Benitez J, Roncador G. Simultaneous detection of the immunophenotypic markers and genetic aberrations on routinely processed paraffin sections of lymphoma samples by means of the FICTION technique. Leukemia 2004;18:348-53.
- [165] Bielorai B, Golan H, Trakhtenbrot L, Reichart M, Toren A, Daniely M, Zilberstein Y, Amariglio N, Rechavi G, Kaplinsky C. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization in follow-up of minimal residual disease in a child with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2002;138:64-8.
- [166] Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ. TEL/AML-1 fusion gene. its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2000;122:73-8.
- [167] Lacza A, Jakso P, Kereskai L, Szuhai K, Mehes G, Pajor L. Incidence and distribution of t(12;21) in prognostic groups of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Orv Hetil 2000;141:1495-500.
- [168] Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med 1998;339:591-8.
- [169] Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2000;14:783-5.
- [170] Metafer 4.0 manual. http://www.metasystems.de/.

# 9. A disszertáció alapját képező publikációk

### Eredeti közlemények

Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneif M, **Alpár D**, Pajor L. Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis of t(9;22)(q34;q11) in Interphase Nuclei. Cytometry Part A, 2006 Jun;69(6):506-14. IF.: 3,293.

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai R, Pajor L. Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and FISH for *ETV6/RUNX1* rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2007 Feb;173(1):23-30. IF.: 1,559.

**Alpár D**, Hermesz J, Pótó L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, Kajtár B. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffinembedded tissue sections. Cytometry Part A, 2008 Jul;73(A):651-57. IF.: 2,978.

### Idézhető absztraktok

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor L. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia alkalmazása minimális reziduális betegség nyomonkövetéséhez. Hematológia Transzfuziológia, 2006, 1. Suppl., 39:7.

László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Pajor L. Sejt-, gén- és expresszió alapú technikák alkalmazása a minimális reziduális betegség nyomonkövetésére. Hematológia Transzfuziológia, 2006, 1. Suppl., 39:35.

**Alpár D**, Kajtár B, Tóth J, Nagy Zs, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffinembedded tissue sections. Blood reviews, 2007, Suppl. 1., 21:124. IF: 5,922.

#### Kongresszusi előadások/poszterbemutatók

László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. DNA, expression and cell based, complex analysis of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukaemia. XII. Meeting European Association for Haematopathology, Thessaloniki, Greece, 2004. szept. 26 - okt. 1.

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor L. Reziduális leukaemiás sejtek automatizált virtuális-szimultán feno- és genotípusos analízise citológiai preparátumokon. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája, Szeged, 2004. nov. 11-13.

László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. A minimális reziduális betegség DNS, RNS és sejt alapú komplex analízise gyermekkori acut lymphoblastos leukaemiában. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája, Szeged, 2004. nov. 11-13.

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor L. Az automatizált FICTION analízis alkalmazási lehetősége gyermekkori ALL-es betegek reziduális tumortömegének nyomonkövetéséhez. VII. PhD Tudományos Napok, Budapest, 2005. ápr. 14-15.

László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. Acut lymphoblastos leukaemiás gyermekek monitorizálása különböző vizsgálati módszerekkel. VII. PhD Tudományos Napok, Budapest, 2005. ápr. 14-15.

Kajtár B, László R, Pajor G, **Alpár D**. Cytológiai minták virtuális-szimultán phenoés genotypus vizsgálata pásztázó fluoreszcens mikroszkópiával. 64. Pathologus Kongresszus, Pécs, 2005. szept. 22-24.

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor L. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia alkalmazása minimális reziduális betegség nyomonkövetéséhez Malignus Lymphoma Konferencia, Győr, 2006. ápr. 6-8.

László R, **Alpár D**, Kajtár B, Lacza Á, Pajor L. Sejt-, gén- és expresszió alapú technikák alkalmazása a minimális reziduális betegség nyomonkövetésére. Malignus Lymphoma Konferencia, Győr, 2006. ápr. 6-8.

**Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Pajor G, Pajor L. Reziduális leukémiás tumortömeg meghatározása pásztázó fluoreszcens mikroszkópiával. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006. máj. 4-6.

**Alpár D**, Kajtár B, Tóth J, Nagy Zs, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffinembedded tissue sections. International Society of Hematology – European and African Division, Budapest, 2007. aug. 29 - szept. 2.

**Alpár D**, Kajtár B, Tóth J, László R, Pajor L. Dupla fúziós és disszociációs FISH szondák automatizált értékelése paraffinos metszeteken. 66. Pathologus Kongresszus, Balatonfüred, 2007. okt. 4-6.

**Alpár D**, Kajtár B, Hermesz J, Pajor G, Nagy Zs, Pajor L. Transzlokációs FISH mintázatok automatizált grid analízise paraffinos metszeteken. XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium: Sejtanalitika – Molekuláris Gasztroenterológia, Budapest, 2007. nov. 15-17.

**Alpár D**, Kajtár B, Hermesz J, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Nagy Zs, László R, Pajor L. Automated mapping of translocation i-FISH patterns on paraffin-embedded samples. XXIV. International Congress of International Society for Analitical Cytology. 2008. máj. 17-21.

**Alpár D**, Kajtár B, Pajor L. Haemopoetikus tumorokra jellemző transzlokációk automatizált i-FISH analízise. Magyar Mikroszkópos Társaság konferenciája 2008, Balatonalmádi, 2008. máj. 15-17.

**Alpár D**, Kajtár B, Hermesz J, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Nagy Zs, László R, Pajor L. Automated mapping of translocation i-FISH patterns on paraffin-embedded

samples. XXIV International Congress of International Society for Analytical Cytology, Budapest, 2008. máj. 17-21.

**Alpár D**, Kajtár B, Hermesz J, Pajor G, Jáksó P, Nagy Zs, Kereskai L, László R, Pajor L. Transzlokációs i-FISH mintázatok automatizált értékelése szöveti környezetben. Magyar Humángenetikai Társaság 2008. évi Konferenciája, Pécs, 2008. júl. 11-13.

# 10. Egyéb publikációk

## Eredeti közlemények

Pajor G, Süle N, **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, Pajor L. Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. Cytometry Part A, 2008 Mar;73A(3):259-65. IF.: 2,978.

## Idézhető absztraktok

Kajtár B, Alpár D, Pajor L. Reciprok transzlokációk 3D vizsgálata interfázis magokon. Magyar Belorvosi Archívum, 2003, 1. Suppl., LVI:19.

Kajtár B, **Alpár D**, Frick Á, Pajor L. Klonális evolúció vizsgálata chronicus lymphocytás leukaemiában. Hematológia Transzfuziológia, 2006, 1. Suppl., 39:24

Kajtár B, Tóth J, **Alpár D**, Jáksó P, Kereskai L, László R, Nagy Zs, Pajor L. Simultaneous appearance of +8 in Ph+ and Ph- cells during imatinib treatment of CML: a report of two cases. Blood reviews, 2007, Suppl. 1., 21:123. IF: 5,922.

Jáksó P, Nagy Zs, Kereskai L, **Alpár D**, Kajtár B, Pajor L. Analysis of polycythemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay. Blood reviews, 2007, Suppl. 1., 21:123. IF: 5,922.

Kajtár B, **Alpár D**, Tóth J, László R, Jáksó P, Kereskai L, Nagy Zs, Pajor L: Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. Blood reviews, 2007, Suppl. 1., 21:78. IF: 5,922.

### Kongresszusi előadások/poszterbemutatók

Pajor L, Alpár D, Kneif M. 3D investigation of the 11q13 locus dissociation by confocal laser scanning microscopy in mantle cell lymphoma. The Third Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics, Rosenön, Stockholm, Sweden, 2002. júl. 4-6.

**Alpár D.** Disszociációs FISH szignálok 3D vizsgálata AML-M<sub>3</sub> sejtek interfázis magjaiban. PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, 2003. feb. 13-15. (I. hely)

**Alpár D.** Disszociációs FISH szignálok 3D vizsgálata AML-M<sub>3</sub> sejtek interfázis magjaiban. XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Orvostudományi szekció, Debrecen, 2003. ápr. 2-5.

Kajtár B, **Alpár D**, Pajor L. Reciprok transzlokációk 3D vizsgálata interfázis magokon. Magyar Haematológiai és Transzfuziológiai Társaság XIX. Kongresszusa, Debrecen, 2003. máj. 22-25.

Kajtár B, Alpár D, Frick Á, Pajor L. Klonális evolúció vizsgálata chronicus lymphocytás leukaemiában. Malignus Lymphoma Konferencia, Győr, 2006. ápr. 6-8.

Pajor G, Alpár D, Kneif M, Süle N. Uroepitheliális sejtek szelektív vizsgálata egymást követő, kromogén immunfenotipizálás és fluoreszcens–ISH segítségével – egy automatizált módszer. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006. máj. 4-6.

Kajtár B, Tóth J, **Alpár D**, Jáksó P, Kereskai L, László R, Nagy Zs, Pajor L. Simultaneous appearance of +8 in Ph+ and Ph- cells during imatinib treatment of CML: a report of two cases. International Society of Hematology - European and African Division, Budapest, 2007. aug. 29 - szept. 2.

Jáksó P, Nagy Zs, Kereskai L, **Alpár D**, Kajtár B, Pajor L. Analysis of polycythemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay. International Society of Hematology - European and African Division, Budapest, 2007. aug. 29 - szept. 2.

Kajtár B, **Alpár D**, Tóth J, László R, Jáksó P, Kereskai L, Nagy Zs, Pajor L. Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. International Society of Hematology – European and African Division, Budapest, 2007. aug. 29 - szept. 2.

Pajor G, Süle N, **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Somogyi L, Pajor L. Uroepitheliális sejtek célirányos vizsgálata egymást követő Kromogén Immunfenotipizálásés Fluoreszcens-ISH segítségével – egy kombinált módszer a Urovysion eredmények pontosabb értelmezéséért. 66. Pathologus Kongresszus, Balatonfüred, 2007. okt. 4-6.

Pajor G, Süle N, **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, Pajor L: A possible way to increase efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. XXIV International Congress of International Society for Analytical Cytology, Budapest, 2008. máj. 17-21.

Kajtár B, Hermesz J, **Alpár D**, Jáksó P, Kereskai L, László R, Kiss R, Pajor L. 8-as triszómia szimultán megjelenése Ph+ és Ph- sejtekben imatinib kezelés mellett. Magyar Humángenetikai Társaság 2008. évi Konferenciája, Pécs, 2008. júl. 11-13.

Pajor G, Süle N, **Alpár D**, Kajtár B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, Pajor L. A Possible way to Increase the Efficiency of Detecting Genetically Aberrant Cells by UroVysion Test on Voided Urine Specimens, by Using Automated Immunophenotypical Pre-selection of Uroepithelial Cells. Magyar Humángenetikai Társaság 2008. évi Konferenciája, Pécs, 2008. júl. 11-13. Ábrák és táblázatok



1. ábra Konvencionális citogenetikai analízis. A módszer, feloldásának határain belül lehetővé teszi a teljes kariotípus ellenőrzését. A képen egy krónikus mieloid leukémiában (CML) szenvedő, kezelt beteg csontvelő mintájának vizsgálata látható. Az entitás szempontjából diagnosztikai jelentőséggel bíró t(9;22)(q34;q11) transzlokáció mellett egy 17-es izokromoszóma is látható, mely a betegség progressziójára utal. (A minta a PTE ÁOK Pathológiai Intézet, Citogenetikai laboratóriumának anyaga.)



2. ábra FISH szonda típusok. A hatékony vizsgálat első lépése a célkérdés megválaszolásához leginkább alkalmas szonda kiválasztása. A. Számbeli kromoszóma eltérések kimutatásához centromer-specifikus szondák (chromosome enumeration probe - CEP) használatosak. A kép egy krónikus limfoid leukémiában (CLL) szenvedő beteg perifériás vérmintájáról készült. A sejtmagban látható jelmintázat 12-es triszómiára utal. B. Strukturális aberrációk interfázis sejtmagokban történő detektálásához lókusz-specifikus (locus specific identifier - LSI) szondákat érdemes használni. A képen a 6-os kromoszómát érintő deléciót az egy piros (6q21) és a két zöld (CEP6) jel együttes jelenléte igazolja. Az aberrációnak prognosztikai jelentőséget tulajdonítanak CLL-es betegek

esetében. C. A 16-os kromoszómát érintő inv(16)(p13q22) átrendeződés önálló szubtípust határoz meg akut mieloid leukémiában. A szonda a hosszú kar töréspontjának két oldalát jelöli különböző színnel. A piros- és zöld jelek egymástól való eltávolodása inverzió jelenlétére utal. D. A Her-2 gén (17q12) amplifikációjának terápiás vonzata van emlő karcinómában. Az említett lókuszt jelző (piros) szignálok felsokszorozódása amplifikációra utal abban az esetben, ha közben a 17-es kromoszóma numerikus aberrációja nem, vagy sokkal kisebb mértékben igazolható (CEP17-zöld jelek). E. Metafázis preparátumokon, komplex átrendeződések kimutatásához hatékonyan alkalmazhatók a teljes kromoszómát festő szondák (whole chromosome painting - WCP). A képen látható minta egy mikózis fungoideszben szenvedő beteg nyirokcsomójából származik. A jelentős számbeli eltérést mutató metafázisban az 1-es kromoszómához tartozó DNS anyag - a két normális 1-es kromoszómán kívül - négy különböző összetételű, aberráns kromoszómán is megtalálható.

(Az ábra összes képe 100x-os objektívvel készült, egymáshoz viszonyítva nem méretarányosak. A sejtmagok- és kromoszómák kék háttere 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI) festés eredménye. A minták a PTE ÁOK Pathológiai Intézet, Citogenetikai laboratóriumának anyagai.)



**3. ábra Transzlokációk i-FISH technikával történő detektálásának gyakorlati lehetőségei. A.** Különösen hosszú töréspont régió esetén alkalmazhatók az egy Mb nagyságrendet képviselő, a töréspont régió tátfedő szondák. A kromoszóma törése esetén az egy kromoszómát reprezentáló egyetlen szignál kettőre hasad. **B.** Disszociációs (DI) szonda kombináció használatakor a piros- és a zöld szondák a transzlokációban résztvevő két kromoszóma egyikén, a töréspont régió két oldalán elhelyezkedő szakaszokkal hibridizálnak. 200 kb-nál hosszabb törésponti régió esetén - a szignálok térbeli orientációjának függvényében - vagy fúziós szignál (sárga), vagy szeparált, de kolokalizált szignálok jelzik a normális kromoszómát. A szignálok térbeli eltávolodása a kromoszóma törésére utal. **C.** Egyszerű-fúziós (SF) szonda kombináció alkalmazásakor a piros- és zöld színű szondák a transzlokáció eredményeképpen egymás mellé kerülő régiókkal hibridizálnak. Ha a törésponti régió 200 kb-nál nem hosszabb, akkor a transzlokáció következtében fúziós (sárga) szignál keletkezik az optikai feloldás határa miatt. **D.** A fúziós extraszignálos (ES) szonda kombináció működési mechanizmusa hasonló az SF szonda kombinációnál látottakkal, de itt a transzlokációban résztvevő egyik kromoszóma töréspontját átfedi a szonda, így a fúziós (sárga) szignál mellett egy kisebb méretű extraszignál is keletkezik. **E.** Dupla fúziós (DF) szonda kombináció esetén az átrendeződésben résztvevő mindkét kromoszóma törésponti régió tátfedő szondával van jelölve. A transzlokáció eredményeképpen két fúziós szignál jelenik meg a sejtmagban a folyamatban részt nem vett allélokat jelző piros- és zöld jelek mellett.

n<sub>1</sub>, n<sub>2</sub>: normál kromoszómák; t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>: transzlokációban részt vett, átrendeződött kromoszómák. A kék körök a sejtmagokat, a bennük lévő kisebb piros- és zöld körök pedig az i-FISH szignálokat szimbolizálják. Alul az adott szondára jellemző, tipikus jelmintázat látható, többszörös átrendeződés esetén azonban ettől eltérő mintázat is tapasztalható. F,R,G: fúziós-, piros- és zöld jelek száma.



**4. ábra Rácsos mintavétel.** Miután az automatizált rendszer rögzítette a látómezőről öt különböző fókuszsíkban felvett képeket, egy 15 x 12 cellából álló ráccsal fedte le a teljes képet. Ezután minden cellában meghatározta a jelek, illetve a kolokalizációk számát. A galériában a piros- és zöld jelek száma, valamint fehérrel a fúziós jelek száma van feltüntetve. A kép egy LSI *IGH/BCL-2* DF próbával jelölt, negatív mintáról készült. (Objektív: 40x)



**5. ábra Az LSI BCR/ABL egyszerű-fúziós szonda jelmintázata.** A SpectrumOrange jelek az 'Abelson murine leukemia viral' (*ABL*) onkogének (9q34)-, míg a SpectrumGreen jelek a 'breakpoint cluster region' (*BCR*) gének (22q11.2) pozícióit mutatják. **A.** Normál sejtmagokban a homológ pároknak megfelelően két-két egyedülálló piros- és zöld jel látható (2R2G). **B.** Transzlokációt hordozó sejtmagokban a *BCR/ABL* fúziós gén jelenlétére egy fúziós (gyakran sárga) jelpár utal (1F1R1G). (Objektív: 100x)



6. ábra A DAPI objektumok (sejtmagok) területen- és excentricitáson alapuló szóródási diagramja BCR/ABL vizsgálat kapcsán. Szaggatott vonal: egyedülálló, nem átfedő sejtmagok; folytonos vonal: kisméretű átfedő-, vagy összetapadt sejtmagok csoportja; excentricitás:  $(1-B/A)^{1/2}$ . A rendszer az objektumot ellipszisként kezelte, melynek hosszú *A* és rövid *B* sugara alapján számolt.



7. ábra BCR/ABL vizsgálatok során tapasztalt normális- és - sejtmag-, vagy jelfelismerési hibáknak köszönhetően - abnormális jelmintázatok. Az automatizált analízis által meghatározott piros- és zöld jelek száma a bal alsó sarokban látható. A rendszer által helytelenül értékelt képeken fel vannak tüntetve a jeleken keresztül húzott intenzitás profilok is. A. Normál sejtmag. B. Transzlokációt hordozó sejtmag (mintázat: 1F1R1G). C. Klasztert formáló kisméretű, helytelenül szegmentált sejtmagok. D. Megnövekedett háttér-autofluoreszcencia és a szonda aspecifikus kapcsolódása; a zöld jeleket nem lehet elkülöníteni a műtermékektől. E. Random jelfúzió; két piros jel kolokalizálódott. F. Jelhasadás; a nem transzlokálódott piros- és zöld jelek mindegyike két szignálként jelenik meg. Míg a zöld jel helyesen lett detektálva, a piros szignál két pontját szeparált jelekként érzékelte a műszer. (Objektív: 40x)

Minták	Detektált sejtmagok száma (db)	Analizált	sejtmagok*	A piros- és zöld jelek közötti legrövidebb távolság**		
		száma (db)	aránya (%)	átlag (µm)	tartomány (µm)	
Negatív						
Neg 1	2708	1085	40,1	3,24	0,17 - 12,26	
Neg 2	1930	865	44,8	3,19	0,17 - 11,42	
Neg 3	2781	1276	45,9	3,34	0,17 - 13,27	
átlag	2473	1075	43,6	3,26		
Pozitív						
Poz 1	2263	966	42,7	0,67	0,00 - 1,51	
Poz 2	2805	1346	48,0	0,50	0,00 - 1,51	
Poz 3	4377	1797	41,1	0,66	0,00 - 1,68	
SD-1	344	81	24,0	0,62	0,17 - 1,51	
átlag	2447***	1048***	43,9***	0,61		

<u>1. táblázat</u> Az automatizált analízis eredményei BCR/ABL transzlokációra nézve negatív- és pozitív mintákban.

\* Csak meghatározott jelszámokkal rendelkező sejtmagokat értékeltünk. Negatív minták: két piros- és két zöld jel; pozitív minták: két piros- és két zöld, valamint három piros- és három zöld jel, SD-1 sejtvonal esetén négy piros - és négy zöld jel.

\*\* A piros- és zöld jelek közötti legrövidebb távolságon alapult a pozitív- és negatív sejtmagok elkülönítése. Ezeket az értékeket a két piros- és két zöld jellel rendelkező negatív sejtmagokban, a három piros- és három zöld jelet hordozó pozitív sejtmagokban és a négy piros- és négy zöld jelet tartalmazó SD-1 sejtmagokban határoztuk meg.

\*\*\* Az SD-1 sejtvonal eredményét nem foglalja magában.



8. ábra BCR/ABL pozitív (pk) (n = 4) és negatív (nk) (n = 3) kontroll minták sejtmagjainak elkülönítése, az eltérő színű jelek közötti legrövidebb távolság eloszlása alapján. Az y-tengely mutatja a vizsgálat alapján pozitívnak vett sejtmagok százalékos arányát adott határérték használata mellett (1 pixel =  $0,168 \mu$ m). Az elkülönítés kombinált (álpozitivitás + álnegativitás) hibája szaggatott vonallal látható. A legjobb differenciálás 5 pixeles határérték mellett érhető el (12,5 % hiba).



9. ábra A manuális- és automatizált értékelés eredményeinek összehasonlítása BCR/ABL vizsgálat kapcsán. A diagram a kontrollok (n = 6) és a tesztcsoport (n = 18) mintáit is magában foglalja. A manuális- és automatizált analízis eredményei szoros korrelációt mutattak ( $R^2 = 0,9892$ ).

Minták	Manuális eredmények (%)				Automatizált eredmények (%)				
	Α	В	С	átlag	1	2	3	átlag	total
Negatív									
Neg 1	6,3	3,6	7,9	5,9	9,0	6,5	8,0	7,8	7,5
Neg 2	7,3	3,5	8,0	6,3	6,0	9,0	7,0	7,3	7,6
Neg 3	3,8	3,8	8,4	5,3	3,5	5,5	5,5	4,8	6,0
Pozitív									
Poz 1	66,5	50,0	49,0	55,2	47,5	54,0	55,5	52,3	52,5
Poz 2	96,1	94,2	91,9	94,1	95,5	91,5	89,5	92,2	92,7
Poz 3	89,2	84,8	93,2	89,1	82,0	84,0	84,5	83,5	84,2
SD-1	94,6	98,0	99,3	97,3	-	-	-	-	95,6
Teszt									
1	5,5	2,5	10,6	6,2	9,0	10,5	14,0	11,2	10,6
2	20,5	13,9	11,1	15,2	22,5	21,0	21,5	21,7	21,4
3	9,6	11,6	5,5	8,9	11,0	8,5	10,6	10,0	10,0
4	6,9	4,0	4,3	5,1	8,5	15,5	14,5	12,8	11,9
5	6,3	1,8	19,4	9,2	12,0	10,5	11,0	11,2	11,0
6	4,3	2,8	8,6	5,2	14,5	9,5	11,0	11,7	11,8
7	5,0	5,7	9,3	6,7	10,0	10,5	10,0	10,2	10,2
8	10,4	24,4	42,5	25,8	37,5	36,5	30,0	34,7	33,2
9	3,9	3,4	9,3	5,5	14,0	16,5	16,0	15,5	15,1
10	5,7	3,4	5,4	4,8	9,5	9,5	10,0	9,7	8,6
11	13,5	11,0	9,0	11,2	8,5	11,0	11,5	10,3	11,6
12	4,9	2,5	11,1	6,1	13,5	11,0	17,5	14,0	13,2
13	6,5	10,1	14,6	10,4	19,5	22,0	15,5	19,0	18,8
14	4,5	10,1	3,5	6,1	13,5	12,5	17,5	14,5	13,6
15	6,7	5,6	9,7	7,4	13,0	14,0	11,5	12,8	12,6
16	12,5	2,9	7,2	7,5	10,0	14,5	14,5	13,0	13,3
17	3,6	4,8	11,5	6,6	9,5	9,0	6,0	8,2	8,7
18	6,4	5,9	11,5	7,9	20,5	15,5	15,0	17,0	14,3
átlagos elté	érések								
átlag	1,5	1,9	-1,2		0,2	-0,1	-0,1		
tartomány*	20,7	11,4	22,9		8,3	6,0	8,2		

<u>2. táblázat</u> A BCR/ABL pozitív sejtmagok aránya negatív- és pozitív kontrollokban, valamint a teszt csoport mintáiban, manuális- és automatizált analízis alapján.

A, B és C a három független értékelő eredményeit mutatja, míg 1, 2 és 3 az automatizált analízis három, egyenként 200 db sejtmagot tartalmazó szegmensét.

\* Az átlagtól való eltérések tartományának számítási módja: maximum eltérés - minimum eltérés.


**10. ábra A CD10 jelölés- és az LSI ETV6/RUNX1 extraszignálos szonda jelmintázata. A.** A CD10 negatív sejtek csupán a sejtmag háttérfestést (DAPI) mutatják. **B.** A CD10 egy sejtfelszíni marker, ezért fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) való kimutatása pozitív sejteken zöld színű, a sejt körvonala mentén fokozottan intenzív jelet eredményez. **C.** A SpectrumGreen jelek az "ETS variant 6" (*ETV6*, korábban *TEL*) gének (12p13)-, míg a SpectrumOrange jelek a "runt-related transcription factor 1" (*RUNX1*, korábban *AML1*) gének (21q22.3) pozícióit mutatják. Normál sejtmagokban a homológ pároknak megfelelően két-két egyedülálló piros- és zöld jel látható (2R2G). **D.** Transzlokációt hordozó sejtmagokban az *ETV6/RUNX1* fúziós gén jelenlétére egy fúziós (gyakran sárga) jelpár, valamint egy kisebb méretű piros extraszignál utal (1F2R1G). Az extraszignál (ES) mérete kisebb, intenzitása alacsonyabb a többi jel hasonló értékeihez képest. (Objektív: 100x)



11. ábra A DAPI objektumok területen és excentricitáson alapuló szóródási diagramja CD10+ETV6/RUNX1 vizsgálat kapcsán. Az x-tengelyen az objektum DAPI csatornában mért területe látható. Az y-tengelyen egy excentricitásból származtatott paraméter van feltüntetve:  $(1-B/A)^{1/2}$ , ahol A a hosszú-, B a rövid tengely. A kétparaméteres szóródási diagram lehetővé teszi az egyedülálló (kapuzott) objektumok hatékony szeparálását.



**12. ábra Az autofluoreszcens objektumok kizárása CD10 immunfenotipizálás során.** Az előző szóródási diagram alapján szelektált, egyedülálló objektumok jelcsatornában (FITC) és kontroll csatornában (SpectrumOrange) detektált átlagos pixelintenzitásának együttes ábrázolása lehetővé teszi a magas autofluoreszcenciával rendelkező műtermékek elkülönítését a CD10<sup>+</sup> sejtektől. (A diagram egy CD10<sup>+</sup> minta értékelését mutatja.)



13. ábra A CD10-függő átlagos fluoreszcencia pixelintenzitás eloszlása negatív (nk) (n = 5) és pozitív (pk) kontroll (n = 3) mintákban. Az adatok önkényes fluoreszcencia egységben (arbitrary fluorescence unit - afu), reverz kumulatív hisztogram formájában vannak feltüntetve. A legkisebb mértékű kombinált (álpozitivitás + álnegativitás) hibát (0,43%) 0,18 afu határérték mellett tapasztaltuk.

Minták	IF pozitivitás (%)	CIF pozitivitás (%)	Analizált sejtek száma
Negatív	•	<b>.</b>	
Neg 1	0,20	0,02	29347
Neg 2	0,09	0,01	61203
Neg 3	0,24	0,06	30336
Neg 4	0,46	0,07	17307
Neg 5	0,10	0,01	57772
$\acute{a}tlag \pm SD$	$0,\!21 \pm 0,\!15$	$0,03 \pm 0,03$	$39193 \pm 19261$
Pozitív <sup>*</sup>	99,78	98,67	88326
Hígítási sor			
Hígítás 10,0% <sup>*+</sup>	14,36	9,48	49187
Hígítás $5,0\%$ *+	4,58	4,37	38345
Hígítás $2,0\%$ *+	2,01	1,43	49395
Hígítás $1,0\%$ *+	1,08	0,89	38023
Hígítás $0,5\%^{*+}$	0,67	0,46	50700
Hígítás $0,2\%^{*+}$	0,28	0,21	68049
Hígítás 0,1% <sup>*+</sup>	0,15	0,10	50089

<u>3. táblázat</u> A pozitív sejtek aránya önálló CD10 immunfluoreszcencia (IF) vizsgálat, illetve kombinált IF és ETV6/RUNX1-specifikus i-FISH (CIF) analízis esetén.

\* az érték három mérés átlaga.
\* a hígítás a negatív kontroll sejtekben hígított pozitív kontroll sejtek arányát jelzi.



14. ábra ETV6/RUNX1 pozitív (pk) (n = 3) és negatív (nk) (n = 3) kontroll minták sejtmagjainak elkülönítése az eltérő színű jelek közötti legrövidebb távolság eloszlása alapján. Az y-tengely mutatja a vizsgálat alapján pozitívnak vett sejtmagok százalékos arányát adott határérték használata mellett (1 pixel =  $0,168 \mu$ m). Az elkülönítés kombinált (álpozitivitás + álnegativitás) hibája szaggatott vonallal látható. A legjobb differenciálás 7 pixeles határérték mellett érhető el (19,3 % hiba).



15. ábra A hígítási sor (n = 3) mintáiban lévő CD10+ kontroll sejtek teoretikus koncentráció értékeinek összehasonlítása az önálló immunfluoreszcencia detektálás (IF), illetve a kombinált IF és i-FISH módszer eredményeivel. Az elvárt és a mért adatok közötti korrelációs koefficiens érték IF esetén  $R^2 = 0.9831$  -nek, míg CIF esetén  $R^2 = 0.9983$  -nak adódott.



**16. ábra A kombinált immunfluoreszcencia - i-FISH (CIF) módszer által detektált sejttípusok. A.** CD10<sup>+</sup> és *ETV6/RUNX1*<sup>+</sup> (sárga fúziós jel) leukémiás sejt. **B.** CD10<sup>+</sup> ETV6/RUNX1<sup>-</sup> normál hematogónium (két *ETV6* SpectrumGreen és két *RUNX1* SpectrumOrange jel). **C.** Sejtfelszíni markerre és transzlokációra nézve is negatív, érett normál sejt. A képek egy CD10<sup>+</sup> és *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó, pre-B sejtes gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában (pALL) szenvedő, indukciós periódusban lévő beteg csontvelői mintájáról készültek. (Objektív: 63x)



**17. ábra Az LSI IGH/CCND1 és LSI IGH/BCL-2 dupla-fúziós-, valamint az LSI IGH disszociációs szondák jelmintázatai. A.** A SpectrumGreen jelek *IGH/CCND1* szonda esetén a 'cyclin D1' gének- (11q13), míg *IGH/BCL-2* szonda esetén a "B-cell leukemia/lymphoma" gének (18q21) pozícióit mutatják. A SpectrumOrange jelek mindkét szonda használatakor az immunglobulin nehézlánc ("immunglobulin heavy") géneket (14q32) vizualizálják. Dupla-fúziós szonda használatakor normál sejtmagokban a homológ pároknak megfelelően két-két egyedülálló piros- és zöld jel látható (2R2G). **B.** Transzlokációt hordozó sejtmagokban az átrendeződésre két fúziós (gyakran sárga) jelpár jelenléte utal (2F1R1G). **C.** Az *IGH* disszociációs szonda esetén a SpectrumGreen- és a SpectrumOrange jelek az immunglobulin nehézlánc gént érintő törésponti szakasz két oldalát mutatják. Normál sejtmagokban a homológ pároknak megfelelően két fúziós jelpár látható (2F). **D.** Transzlokációt hordozó sejtmagokban az egyik jelpár disszociál (1F1R1G). (Objektív: 63x)



**18.A ábra Negatív- (n = 10) és pozitív (n = 10) minták átlagos pozitivitásának eloszlása a fúziós jeltávolság különböző határértékei mellett, LSI IGH/CCND1 DF szonda esetén.** 0,5 μm-es határérték mellett tapasztaltuk a legnagyobb különbséget (8,6 %) a negatív minták átlagos pozitivitása + 2SD, illetve a pozitív minták átlagos pozitivitása - 2SD között. (a hibasávok a 2SD-t mutatják)



**18.B ábra Negatív (n = 10) és pozitív (n = 10) minták átlagos pozitivitásának eloszlása a fúziós jeltávolság különböző határértékei mellett, LSI IGH/BCL-2 DF szonda esetén.** 1,0  $\mu$ m-es határérték mellett tapasztaltuk a legnagyobb különbséget (12,9 %) a negatív minták átlagos pozitivitása + 2SD, illetve a pozitív minták átlagos pozitivitása - 2SD között. (a hibasávok a 2SD-t mutatják)



**18.C ábra Negatív (n = 10) és pozitív (n = 10) minták átlagos pozitivitásának eloszlása a fúziós jeltávolság különböző határértékei mellett, LSI IGH DI szonda esetén.** 1,2  $\mu$ m-es határérték mellett tapasztaltuk a legnagyobb különbséget (9,1 %) a negatív minták átlagos pozitivitása + 2SD, illetve a pozitív minták átlagos pozitivitása - 2SD között. (a hibasávok a 2SD-t mutatják)

Minták	IGH/CCND1	IGH/BCL-2	IGH
Negatív			
n = 15	4,5 % (0,8 - 10,2 %)		
n = 18		9,7 % (4,0 - 17,3 %)	
n = 15			29,6 % (7,0 - 41,7 %)
Pozitív			
n = 15	35,6 % (23,5 - 52,0 %)		
n = 15		60,8 % (38,3 - 79,6 %)	
n = 19			77,5 % (64,5 - 93,9%)

4. táblázat A pozitív cellák aránya az összes hisztológiai minta vizsgálata alapján.

A táblázat magában foglalja a módszer beállításához használt minták- és a teszt csoport eredményeit is.



19. ábra Negatív kontroll minták (n = 3) álpozitív celláinak aránya a cellánkénti jelszám függvényében, rácsos mintavétel során. Az IGH1 mutatja azt az esetet, mikor a DI szonda használatakor nem zártuk ki a nem egyenlő számú piros- és zöld jeleket tartalmazó cellákat. Jól látszik, hogy a nem azonos számú piros- és zöld jelet tartalmazó (azaz páratlan jelszámú) cellák magasabb arányban mutatnak pozitivitást, mint a többi cella. Az IGH2 mutatja az eredményét annak, ha csak az azonos számú piros- és zöld jeleket tartalmazó cellákat vizsgáltuk. A vízszintes vonalak a cellánkénti átlagos ( $\pm$  SD) jelszámot mutatják minden egyes szonda esetén. A középen elhelyezkedő jelek mutatják az átlag értéket.

## Hivatkozások a szövegben

1. ábra	6. oldal
2. ábra	10., 11., 12. oldal
3. ábra	21., 23., 34. oldal
4. ábra	37. oldal
5. ábra	39. oldal
6. ábra	39. oldal
7. ábra	39. oldal
8. ábra	40. oldal
9. ábra	41. oldal
10. ábra	45. oldal
11. ábra	45. oldal
12. ábra	46. oldal
13. ábra	46. oldal
14. ábra	47. oldal
15. ábra	47., 49. oldal
16. ábra	48. oldal
17. ábra	50. oldal
18.A ábra	50. oldal
18.B ábra	50. oldal
18.C ábra	50. oldal
19. ábra	52. oldal
1. táblázat	40. oldal
2. táblázat	41. oldal
3. táblázat	46., 47. oldal

4. táblázat 52., 54. oldal