

**Daganatsejtek genetikai és funkcionális vizsgálata  
cytometriai módszerekkel**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Méhes Gábor**

**PTE ÁOK, Pathológiai Intézet**

**2001**

## Bevezető

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

## Célkitűzések

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

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

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

## Eredmények

1. A riboszomális gének (rDNS) aktivitásának, valamint a sejt DNS-tartalmának párhuzamos vizsgálatára új áramlásos cytometriás eljárás került kidolgozásra. A sulfhydryl-csoportok kimutatására bevezetett kumarin alapú CPM fluoreszcens festés jól reprezentálja az ezüstözéssel láthatóvá tehető AgNOR-okat. Az eljárás lehetővé teszi a nucleoláris rDNS aktivitás és a nucleolaris DNS tartalom párhuzamos vizsgálatát. A módszer segítségével jelentős különbségek voltak észlelhetők nem transzformált normál növekedésű és daganatos sejtek között.
2. Specifikus monoclonalis antitestek és DNS-tartalom mérés alkalmazásával elsőként közlítettük meg a nucleolaris organizációs régió (NOR) lokalizációjú fehérjék dinamikáját stimuláció és differenciálódás során. A nucleolin (C23) és a fibrillarín fehérjék expresszióváltozása jelentősebb időbeli eltérést mutatott, általánosságban azonban valamennyi jelölés jól reprezentálta a fokozott avagy csökkent sejtaktivitást.
3. A daganatsejtek DNS-tartalmának, metafázis és interfázis cytogenetikai eltéréseinek összehasonlítása leukemiában az alkalmazott módszerekkel eltérő eredményekre, a technikák kiegészítő jellegére hívta fel a figyelmet. Az egyes daganatsejtek szintjén az elváltozások nagyonis különbözhetnek, ami a tumorsejtpopulációkban tapasztalt funkcionális heterogenitás molekuláris mechanizmusaira világít rá.
4. Ezen okokból érdeklődésünk középpontjába kerültek az olyan lehetőségek, amelyek nem a sejtpopuláció szintjén, hanem az egyes sejtekben kimutatható egyedi elváltozásokat reprezentálják. Többparaméteres immunológiai és molekuláris cytogenetikai vizsgálatok céljára kifejlesztésre került egy automatizált mikroszkópos képanalizáló rendszer, mely lehetővé teszi akár igen ritkán előforduló tumorsejtek érzékeny kimutatását és részletes funkcionális analízisét sorozatvizsgálatok formájában. A módszer elsőként neuroblastoma sejtek kvantitatív csontvelői kimutatására és cytogenetikai jellemzésére került alkalmazásra.
5. A ritka tumorsejtek mennyiségi meghatározása jelentős klinikai igény, mivel rajta keresztül lehetséges az alkalmazott terápiák hatékonyságának leérése. Automatizált képanalízis keretei erre is kiváló lehetőséget biztosítanak. Kísérleteinkben 1/10 millió sejt érzékenység mellett is ugyanolyan eredményességgel lehetett molekuláris és funkcionális vizsgálatokat végezni, jelentősen növelve ezzel a minimális reziduális betegség (MRD) kimutatásának hatékonyságát.

## Az értekezés benyújtásáig (2001 március) megjelent közlemények:

1. Gábor Méhes, Endre Kálmán, László Pajor: In situ fluorescent visualization of nucleolar organizer region-associated proteins with a thiol reagent  
*J Histochem Cytochem* 41(9): 1413-1417, 1993
2. Gábor Méhes, László Pajor: Nucleolin and fibrillarin expression in stimulated lymphocytes and differentiating HL-60 cells. A flow cytometric assay  
*Cell Prolif* 28: 329-336, 1995
3. György Csanaky, Zoltán Szereday, Tamás Magyarlaki, Gábor Méhes, Tamás Herbert, István Buzogány: Renal angiomyolipoma: a report of three cases with regional lymph node involvement and/or with renal cell carcinoma  
*Tumori* 81:469-474, 1995
4. Méhes Gábor, Pajor László, Kónya Tibor, Kajtár Pál, Méhes Károly: Csontvelői és perifériás vérsejtek vizsgálata áramlásos DNS cytometriával gyermekkori akut lymphoblastos leukaemiában  
*Gyermekgyógyászat* 46(1): 44-49, 1995
5. Gábor Méhes, András Tárnok, László Pajor, Károly Méhes: Objective analysis of centromere separation  
*Hum Genet* 97: 365-366, 1996
6. Éva Gömöri, István Mészáros, Gábor Méhes, Tamás Dóczi, László Pajor: Cell kinetic analysis in recurrent neuro-epithelial tumours  
*Acta Neurochir* 138: 1036-1041, 1996
7. Gömöri Éva, Mészáros István, Méhes Gábor, Dóczi Tamás, Pajor László: Neuroepithelialis daganatok prognózisának vizsgálata sejtproliferációs szempontból  
*Időgyógyászati Szemle* 9-10:315-320, 1996
8. Szuhai Károly, Méhes Gábor, Kosztolányi György, Kajtár Pál, Lendvai Gábor, Szanyi István, Pajor László: Interfázis cytogenetika alkalmazása a DNS-tartalom változásának megítélésére gyermekkori akut lymphoid leukemiában (ALL)  
*Orv Hetil* 138: 3111-3119, 1997
9. Vajda Péter, Farkas András, Vástyán Attila, Méhes Gábor, Pintér András: Ureterpótlás gyomorsegmentummal - állatkísérlezes modell kutyákban  
*Magyar Urológia* 10(2): 199-204, 1998
10. László Pajor, András Matolcsy, János A. Vass, Gábor Méhes, Éva Marton, Ferenc Szabó, János L. Iványi: Phenotypic and genotypic analyses of blastic cell population suggest that pure B-lymphoblastic leukemia may arise from myelodysplastic syndrome  
*Leuk Res* 22(1): 13-17, 1998

11. László Pajor, Károly Szuhai, Gábor Méhes, György Kosztolányi, Pál Jáksó, Gábor Lendvai, Istvány Szanyi, Pál Kajtár: Combined metaphase, interphase cytogenetic and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia  
*Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 34:87-94, 1998
12. Lacza Ágnes, Jáksó Pál, Kereskai László, Szuhai Károly, Méhes Gábor, Pajor László: A t(12;21) incidenciája és megoszlása a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia prognosztikai csoportjaiban  
*Orv Hetil* 141: 1495-1500, 2000
13. Gábor Méhes, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Sequential functional and cytogenetic analysis of single tumor cells in disseminated neuroblastoma, in J. Graham (ed): *Proceedings of the First Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics (QMC 2000)*, Bari, Italy, pp 216-218, 2000
14. Gábor Méhes, Armin Witt, Ernst Kubista, Peter F. Ambros: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis (letter)  
*Cancer* 89(3): 709-711, 2000
15. Gábor Méhes, Thomas Lörch, Peter F. Ambros: Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis  
*Cytometry (Comm Clin Cytometry)* 42: 357-362, 2000
16. Gábor Méhes, Andrea Luegmayr, Claudia M. Hattinger, Thomas Lörch, Inge M. Ambros, Helmut Gadner, Peter F. Ambros: Automatic detection and genetic profiling of disseminated neuroblastoma cells  
*Med Pediatr Oncology* 36: 205-209, 2001

### Kongresszusi előadások és poszterek jegyzéke :

1. Gábor Méhes : Fluorescent visualization of nucleolar region associated proteins with a thiol reagent. The Nucleolus Colloquium, Bécs, 1992. szeptember 23-25.
2. Méhes Gábor: A nucleolus működésének vizsgálati lehetőségei: ezüstözéses és áramlásos cytometriás eljárások. Tudományos Ülés, Pécs , 1993. február 8.
3. Méhes Gábor: AgNOR proteinek és nucleolin (C23 protein) lokalizációja a sejtmagban. Pathologus Találkozó, Székesfehérvár, 1994. szeptember 30.
4. Méhes Gábor: Klinikai és molekuláris cytogenetika myeloproliferatív betegségekben Hematopathologia Tutorial, Pécs, 1997. március 27.
5. Gábor Méhes, Margit König, Oskar A. Haas: Analysis of asynchronous replication pattern of ABL and BCR in normal and Ph chromosome positive cells with fluorescence in situ hybridisation. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Friedrichsdorf, 1997. május 22.

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

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