

N-myc-amplifikáció vizsgálata neuroblastomában PCR-alapú módszerekkel

Melegh Zsombor, Bálint Ildikó, Nagy Kálmán¹, Magyarosy Edina², Galántai Ilona³, Szentirmay Zoltán

Országos Onkológiai Intézet, Molekuláris Pathológiai Osztály, Budapest, ¹Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház I. Gyermekhaematológiai- és Csontvelőtranszplantációs Osztály, Miskolc,

²Fővárosi Heim Pál Gyermekkorház-Rendelőintézet Haematológiai és Onkológiai Osztály, Budapest,

³Madarász Utcai Gyermekkorház-Rendelőintézet Belosztálya, Budapest

21 fagyasztott neuroblastomás tumorminta, valamint az IMR 32 neuroblastoma sejtvonal n-myc-génamplifikációját vizsgáltuk szemikvantitatív és valós idejű kvantitatív PCR eljárásokkal, a daganatok várható biológiai viselkedésének megítélése céljából. A szemikvantitatív meghatározás során a belső kontrollként használt β -globin gén 520 bp, valamint az n-myc gén 258 bp hosszú fragmentjeit egy csőben amplifikáltuk. 30 ciklus után a termékeket agaróz gélen futtattuk, majd géldenzitóméterrel egymáshoz viszonyítottuk az n-myc és a β -globin géntermék sávjának intenzitását. A valós idejű kvantitatív vizsgálatot LightCycler készülékkel végeztük. Az n-myc génre illeszkedő primerpárral 120 bp hosszú fragmentet amplifikáltunk, a termék detektálásához LC640-nel fluoreszcensen jelölt próbapárt használtunk. A kvantitatív analízis 1, 2, 10, 13, 25-szörös amplifikációt tartalmazó mintákból felállított kalibrációs görbe segítségével történt. A szemikvantitatív eljárással 10-szeresnél kisebb mértékű amplifikációt mutató és a nem amplifikált tumorokat nem lehetett biztonsággal elkülöníteni, míg valós idejű kvantitatív analízissel akár kétszeres amplifikációt is detektálni tudtunk. Két szövettanilag differenciált, de n-myc-amplifikációt mutató tumor esetében in situ PCR-vizsgálatot végeztünk a LightCyclernél használt primerpárokkal, biotinilált ATP jelöléssel. Mindkét esetben kimutatható volt a neuroblastokban az n-myc-génamplifikáció, míg a differenciált sejtalakok nem mutattak amplifikációt. *Magyar Onkológia* 46:43-48, 2002

We have used semiquantitative and real-time quantitative PCRs to detect n-myc gene-amplification in 21 frozen neuroblastoma biopsies and IMR 32 cell line in order to predict biological behaviour of the tumors. Two primer pairs were used in the semiquantitative method to co-amplify a 520-bp fragment of the β -globin gene – used as a single copy reference standard – and a 258-bp fragment of the n-myc gene. After 30 cycles the PCR products were electrophoresed through an agarose gel and were compared to each other with use of a gel-densitometer. Real-time quantitative analysis was performed in a LightCycler instrument. A single primer pair was used to amplify a 120-bp fragment of the n-myc oncogene and a LC640-labelled fluorescent probe pair to detect the product. Calibration curve, which was set up from a serial dilution including samples with 1, 2, 10, 13, 25-fold n-myc oncogene amplification, was employed for quantitative analysis. Semiquantitative method did not show distinct difference between tumor groups with no amplification and less than 10-fold amplification, while quantitative LightCycler analysis was able to detect even 2-fold amplification. In situ PCRs were performed in two cases of differentiated tumor samples which contained n-myc amplification. We used biotinylated ATP labelling and the same primer pair as for the LightCycler analysis. In both cases differentiated cell forms did not show n-myc gene amplification, while considerable amplification was detected in the neuroblasts. *Melegh Zs, Bálint I, Nagy K, Magyarosy E, Galántai I, Szentirmay Z: Detection of n-myc gene amplification in neuroblastoma using polymerase chain reaction based methods. Hungarian Oncology* 46:43-48, 2002

A munka a T30805 számú OTKA és 44/2000 számú ETT, valamint az NKFP 1/048 Széchenyi pályázat támogatásával készült.

Érkezett: 2002. január 31.

Elfogadva: 2002. február 15.

Levelezési cím: Melegh Zsombor, Országos Onkológiai Intézet, Molekuláris Pathológiai Osztály, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9, Tel.: 1-224-8600/1403, Fax: 1-224-8620, e-mail: melegh@oncol.hu

Bevezetés

A neuroblastoma a leggyakrabban előforduló szolid tumor gyermekkorban, a daganatos halálosek mintegy 15%-áért felelős. 80–95%-ban 5 évesnél fiatalabb életkorban jelentkeznek, a daganat felismerésekor az átlagéletkor 2 év. Az egyéb okból boncolt magzatok és újszülöttek 0,5%-ában lehet mikroszkopikus neuroblastomás sejtcsoportokat találni, ami arra utal, hogy a daganat néha spontán visszafejlődik.

A daganat velőléc-eredetű, így a szimpatikus idegrendszer bármely részén kialakulhat, de 75%-uk a hasüregben keletkezik. A hasi tumorok egyik fele a mellékveséből, a másik a paravertebrális autonóm szimpatikus ganglionokból indul ki. További 20% mellkasi, általában hátsó mediastinalis elhelyezkedésű. Többségük sporadikus, de előfordul autoszomális domináns öröklődés is, ilyenkor a daganat mindkét mellékvesét érinti, vagy egyidőben több sympathicus ganglionban is megjelenik.

A tumor secernálhat neurogén eredetű anyagokat, így katekolaminokat, neuronspecifikus enolázt és ferritint. A katekolamin metabolitok közül a vanillinmandulasavat (VMA) és a homovanillinsavat (HVA) használják a betegség diagnosztikájában. Ezek meghatározása szérumból és vizeletből történik. A katekolaminok termelése ellenére a hipertensio ritka. A diagnózis felállításakor a legtöbb betegnek már disszeminált áttétei vannak, gyengeség, fogyás alakul ki, a metastasok miatt csontfájdalom és ascites jelentkezhet.

A magas rizikójú neuroblastoma csoportba azokat az 1 évesnél idősebb betegeket sorolják, akik IV stádiumban vannak, valamint azokat a II illetve III stádiumú betegeket, akiknél *n-myc*-amplifikációt észlelnek. Az *n-myc* protoonkogén a 2-es kromoszóma p23-p24 helyén található (7). Neuroblastomás betegek 20%-ában találták a gén több mint 10-szeres, 16%-ában kevesebb mint 10-szeres amplifikációját (8). A progressziómentes 18 hónapos túlélés az amplifikációt nem mutató betegeknél ebben a tanulmányban 90% volt, 10 kópia alatt 30%, e felett 5%. A magas rizikójú csoportba tartozó gyermekeknél myeloablatív kezelés és autológ csontvelő-transzplantáció növeli az eseménymentes túlélés esélyét (5). További lehetőség még a 13-cisz-retinsav adása, ami elősegíti a tumor differenciálódását (6, 10), valamint monoklonális anti-GD₂ ch14.18 ellenanyaggal végzett immunterápia (11). Az önmagában kemoterápiával elérhető eseménymentes túlélés ebben a csoportban a legjobb eredményeket figyelembe véve is mindössze 29% (1).

A fentiek miatt rendkívül lényeges az *n-myc* gén amplifikációjának kimutatása neuroblastomás betegeknél. Ez lehetséges Southern blot módszerrel, PCR-alapú eljárásokkal és hibridizációs technikákkal. A legelterjedtebb gyakorlat az amplifikáció kimutatására a szemikvantitatív komparatív PCR eljárás (2).

Ebben a cikkben ismertetünk egy új, gyors, pontos és megbízható valós idejű kvantitatív PCR-alapú eljárást az *n-myc*-génamplifikáció ki-

mutatására. 20 neuroblastomás beteg mintáit vizsgáltuk LightCycler készülékkel, és a kapott eredményeket összevetettük a korábbi gyakorlat szerint használt szemikvantitatív eljárással. Két esetben *in situ* PCR-t is végeztünk a tumor heterogenitásának vizsgálatára.

Anyagok és módszerek

A DNS-minták előkészítése

20 neuroblastomás beteg tumorában határoztuk meg az *n-myc*-kópiaszámot. Egy betegből két alkalommal, egy éves időközzel kaptunk tumormintát (10, 18-as minta). A friss, fagyasztott szövetszöveteket 200 µl/ml koncentrációjú proteináz-K enzimmel emésztettük, ezt követően a DNS-t standard fenol:kloroform:izoamil-alkohol (25:24:1) módszerrel izoláltuk, majd 1/10 térfogatú 7,5 M ammónium-acetát hozzáadása után izopropil-alkohollal csaptuk ki. A vákuummal kiszáritott csapadékot 50 ml TE pufferben (pH 8) vettük fel. Az izolált DNS mennyiségét és minőségét spektrofotométerrel ellenőriztük. A LightCycler analízis előtt a mintákat 15 ng/µl koncentrációra állítottuk be. Az *n-myc*-kópiaszám pontos meghatározására a készüléket kalibrálni kell. A kalibrációs sor felállítására egészséges mellékveséből a fenti módon izolált DNS-t, valamint IMR 32 sejtvonalat használtunk (DMSZ, Németország). A sejtvonal 25-szörös *n-myc*-amplifikációt tartalmazott.

N-myc-amplifikáció meghatározása szemikvantitatív PCR eljárással

Az *n-myc*-génamplifikáció vizsgálatára az egyik módszer a szemikvantitatív komparatív PCR eljárás volt. A használt PCR-primerek az 1. táblázatban láthatók (C3F2 és STR *n-myc*, valamint KM29 és RS42 β-globin primer 10 pmol koncentrációban). A primereket úgy választottuk meg, hogy az *n-myc* génről amplifikált szakasz hossza (258 bp) megközelítőleg a fele legyen a β-globin génről amplifikáltnak (520 bp). A reakciókhoz PCR Express Thermal Cycler-t (Hybaid, Anglia) használtunk. A reakció-térfogat 25 µl volt, a PCR kondíciói pedig a következők: kezdeti denaturáció 96°C-on 2 percig, ezután 30 ciklus, 95°C 55 mp, 58°C 1 perc és 72°C 90 mp lépésekkel, majd egy végső extenzió 72°C-on 6 percig. 10 µl mintát 3%-os NuSieve agaróz gélen futtatunk (BMA, USA). A géleket etidiumbromiddal festettük meg és Bio-Rad GelDoc2000 (BioRad, USA) gél dokumentációs rendszerrel elemeztük. A rendszerrel az *n-myc* és β-globin sáv egymáshoz viszonyított relatív intenzitását százalékban kaptuk meg. Minden egyes vizsgálatkor templátmentes negatív, és IMR32 sejtvonalból, valamint egészséges mellékveséből izolált DNS pozitív kontrollt is használtunk.

N-myc-kópiaszám meghatározása valós idejű PCR eljárással

Az *n-myc* gén kópiaszámának meghatározására a Roche (Németország) cég LightCycler rendszerét

használtuk, amely nagyon gyors lefutású, valós idejű kvantitatív PCR vizsgálatot tesz lehetővé.

A termékmennyiség detektálására fluoreszcens jelölést használtunk. A készülek három hullámhosszon képes detektálni: 530 nm, 640 nm és 710 nm. A jelölésre használt fluorofort egy LED 470 nm-es kék fényvel gerjeszti. A reakció 20 ml-es boroszilikát üvegapillárisban zajlik, a fénysugár a kapilláris csúcán át jut a reakcióelegybe, és az emittált fluoreszcens fény ugyanitt jut ki. A fluoreszcencia értékét a rendszerhez tartozó számítógép azonnal értékeli és kijelzi. Egyidejűleg 32 minta vizsgálatára van lehetőség.

A ciklusonkénti adatgyűjtést az a megfigyelés tette szükségessé, hogy a PCR-termék végső mennyisége nem mindig enged a kiindulási templát pontos mennyiségére következtetni. A PCR-termék mennyisége csak eleinte emelkedik logaritmikusan, majd elér egy platót. A minta mennyiségének meghatározására a kezdeti ciklusokat kell figyelembe venni. A valós idejű mérés pontossan lehet követni, hogy a termékmennyiség növekedése a logaritmus fázisban van-e. Ebben a fázisban a jel könnyen elkülöníthető a háttértől, és a különböző intenzitású jelek közti különbség jól meghatározható.

Az n-myc gén detektálására két, szekvencia-specifikus, különböző festékekkel jelölt hibridizációs próbát használtunk. A próbák szekvenciáját úgy választottuk meg, hogy azok a célszekvenciához hibridizálva az amplifikált DNS-szakaszban egymás mellett helyezkedjenek el, így a festékmolekulák szorosan egymás közelébe kerülnek. A donor festékmolekulát (fluorescein) a LED kék fényével gerjesztve az annál valamivel magasabb hullámhosszú, zöld fényt emittál. Ha a két festékmolekula elég közel van egymáshoz, az emittált energia gerjeszti a másik hibridizációs próbához kötött akceptor festékmolekulát, amely fluoreszcens fényt bocsát ki egy eltérő frekvencián. Ezt a jelenséget fluoreszcens rezonanciaenergia-transzfernek nevezik (FRET) és erősen függ a két festékmolekula távolságától. Az energia csak akkor jut át hatékonyan, ha a két molekula legalább 5 bázis közelségben van. A fluoreszcencia mértéke közvetlenül összefügg a PCR-reakció során keletkezett termék mennyiségével. Ha a fluoreszcencia mértéke nagyobb lesz, mint a háttér-fluoreszcencia, a detektor érzékeli azt, és azonnal grafikusan meg is jeleníti. Azt a ciklusszámot, ahol a fluoreszcencia értéke eléri a detektor érzékenységet és a fényintenzitás emelkedése már mérhető, átörési pontnak (crossing point) nevezzük.

Az optimalizálás után a reakcióelegyek végtérfogata 20 μ l volt. Minden reakcióelegy tartalmazott 10 pmol mindkét primerből, a próbákból egyenként 3 pmol (1. táblázat), 90 ng templát DNS-t. A Mg^{2+} -koncentráció 3 mM, minden dNTP koncentrációja 200 μ M volt. Sigma Taq polimeráz enzimet használtunk, reakciónként 1 egységet Mg^{2+} -mentes gyári Taq pufferral (Sigma-Aldrich, Németország). A primereket úgy választottuk meg, hogy egy viszonylag rövid génszakaszt (120 bp) amplifikálódjon. A reakció egyes ciklusait a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Az akceptor festékmolekula, jelen esetben N-hidroxi-szukcinimid-észter, az LC1 próbához volt kötve. Az emittált fényt 640 nm-en detektáltuk, háttérként az 530 nm-en mért fényintenzitást használtuk. A tényleges fluoreszcencia értékét a 640 és 530 nm-en mért fluoreszcencia hányadosa adta.

A minták kópiaszámát a kalibrációs sorhoz viszonyítva határoztuk meg. A kalibrációs sort 25-szörösen amplifikált IMR 32 sejtvonalból és egészséges mellékveséből izolált DNS, valamint a kettő hígításából kialakított 2-, 10-, és 13-szoros amplifikációt tartalmazó DNS alkotta. A kalibrációs sor adatai: lejtés = -1,719, közbeavatkozás = 21,84, hiba = 0,0576.

In situ PCR

A 4%-os formalinban fixált minták standard technikával készült blokkjából 4 μ m-es metszeteket készítettünk. A deparaffinált anyagokat 2 mg/ml pepszinnel emésztettük, kiválasztva a fixálási időnek megfelelő optimális emésztési időt. Az emésztés után helyeztük a tárgylemezre a reakcióelegyet, amely metszetenként a következőket tartalmazta: Sigma Taq polimeráz 0,5 egység, Sigma gyári Mg^{2+} -mentes puffer (Sigma-Aldrich, Németország), 24 μ M biotinnal jelölt dATP, 200–200 μ M minden dNTP-ből, 2,5% formamid, 5 mM $MgCl_2$, 0,07% BSA, 10 μ M NMYCSFFm és NYR50G primer. A reakciókat OmniGene (Hybaid, Anglia) készülékkel végeztük. A reakció 4 perces 94 °C-on történő kezdeti denaturálás után 20 ciklusból állt. A ciklus lépései: 94 °C 50 mp, 58 °C 55 mp, 72 °C 55 mp. Az in situ PCR-reakciók elvégzésekor a termék láthatóvá tételéhez biotinnal jelölt dATP-t használtunk, amit standard biotin-avidin módszerrel hívtunk elő. A daganatok differenciált elemeinek azonosítása indirekt immunhisztokémiai reakcióval, S100 poliklonális ellenanyaggal történt (DAKO, Dánia).

1. táblázat.
PCR-primerek és próbák az n-myc gén 3. exonjára (1^{LightCycler}, 2^{szemi-kvantitatív PCR})

Név	Primer/próba	Szekvencia(5'-3')
NMYCSFFm ¹	Primer	GAT GAA GAT GAT GAA GAG GAA GAT
NYR50G ¹	Primer	CAT CGT TTG AGG ATC AGC TC
NMYCFL1 ¹	Próba	CAA CAC CAA GGC TGT CAC CAC ATT
NMYCLC1 ¹	Próba	ACC ATC ACT GTG TGC GTC CCA AGA A
C3F02 ²	Primer	GCG AGC TGA TCC TCA AAC GA
STR ²	Primer	TGG TCC CTG AGC GTG AGA AA

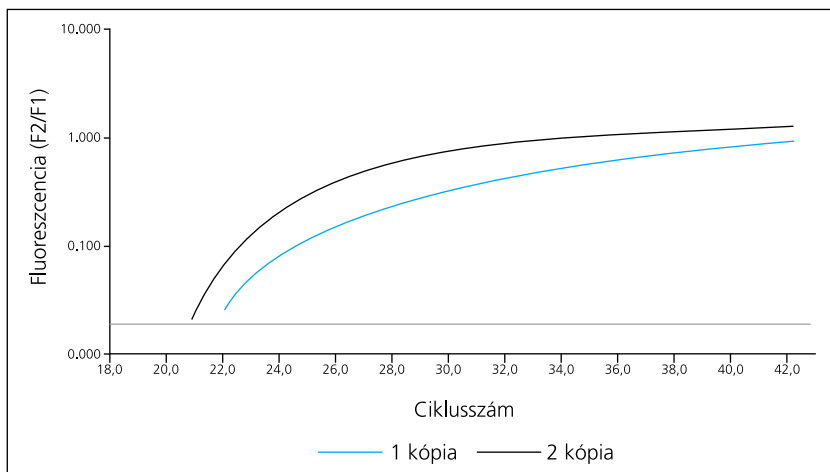
2. táblázat. Valós idejű PCR eljárás lépései (*ciklusszám:45)

Lépés	Cél T (°C)	Hőmérséklet tartása (sec)	Meredekség (°C/sec)	Adatgyűjtés módja
Kezdeti denaturálás	95	30	20	Nincs
Denaturálás*	95	0	20	Nincs
Primer-kapcsolódás*	60	10	20	Egyszeri
Extenzió*	72	5	20	Nincs
Hűtés	40	30	20	Nincs

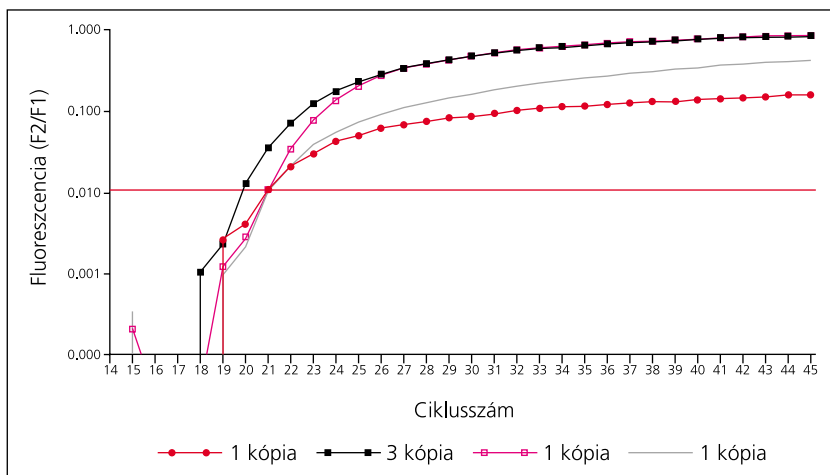
Eredmények

A valós idejű kvantitatív PCR eljárás érzékenységét vizsgálva azt találtuk, hogy az IMR 32 sejtvonalból és az egészséges mellékveséből izolált DNS-ből előállított 2 kópiás mintát pontosan el lehetett különíteni az 1 kópiástól (1. ábra). A 21 minta adatait a 3. táblázat tartalmazza. A 21 min-

1. ábra. A kétszeres amplifikációt tartalmazó minta a 21., míg az amplifikációt nem mutató minta a 22. ciklusnál érte el az áttörési pontot. A PCR-termék mennyisége, ha minden körülmény optimális, elvileg a $\text{Termék} = \text{Templát} \times 2^{\text{ciklusszám}}$ képletből adódik. A kapott eredmény megfelel ennek a képletnek, hiszen az amplifikációt nem mutató templátból egy ciklussal később amplifikálódott ugyanannyi termék, mint a kétszeres amplifikációt tartalmazó mintából.



2. ábra. N-myc-amplifikáció vizsgálata valós idejű PCR-eljárással a 11, 12, 14-es minta esetében. Az áttörési pontot vizsgálva a 14-es minta 3-szoros n-myc-amplifikációt tartalmazott, míg a másik két mintában nem volt amplifikáció. A negyedik minta az egészséges mellékveséből izolált kontroll.



3. táblázat A szemikvantitatív és a LightCycler vizsgálatok eredménye (* in situ PCR vizsgálat a jelölt esetekből)

Eset száma	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	IMR 10	32	10 kópia
Az n-myc sáv relatív intenzitása szemikvantitatív PCR-rel	52	50	51	63	55	51	64	60	59	50	51	52	55	54	65	58	56	65	52	71	60	70	55	
Kópiaszám valós idejű PCR-rel	1	1	1	13	1	1	1	3	1	1	1	1	2	3	25	3	3	4	1	55	400	25	10	

tábol 11 (52%) nem mutatott amplifikációt, 6 (29%) 10-nél kevesebb, 4 (19%) több mint 10-szeres n-myc-génamplifikációt tartalmazott (2. ábra). Egy beteg tumorából két alkalommal, egy éves időközzel kaptunk mintát (10., 18. eset). Az első alkalommal nem tudtunk amplifikációt kimutatni, míg a második vizsgálatnál 4-szeres amplifikációt találtunk. Ez magyarázható a tumor heterogenitásával, azaz elképzelhető, hogy csak a tumorsejtek kis része tartalmaz n-myc-amplifikációt, és a mintavétel függvényében eltérő eredményt kaptunk.

A szemikvantitatív eljárással kapott eredményeket szintén a 3. táblázat tartalmazza. A β -globin és az n-myc gén amplifikációját közös csőben végeztük. A PCR-termékeket agaróz gélen futattuk és összehasonlítottuk a β -globin és az n-myc primerekkel amplifikált termékek mennyiségét. A termék mennyiségére a két sáv egymáshoz viszonyított intenzitásából következtettünk. Nyolc, LightCycler-rel amplifikációt mutató minta relatív n-myc sávintenzitása 50 és 55% közé esett, két minta esetén azonban ez 59 és 64% volt. LightCycler-rel 10-szeresnél kisebb mértékű amplifikációt mutató minták ezen értéke 54 és 65% közé esett, míg a 10-nél magasabb kópiaszámú tumoroknál 60-71% volt az n-myc sáv relatív intenzitása (3. ábra).

In situ PCR vizsgálatot 2 esetben (4., 15. eset) végeztünk, ezekben differenciált elemek jelenléte ellenére mind a szemikvantitatív, mind a valós idejű PCR-rel amplifikációt találtunk. Ezekben a mintákban sem a ganglionsejtek, sem az S100-pozitív sejtek nem tartalmaztak génamplifikációt, míg a neuroblastokban kimutatható volt az n-myc-génamplifikációja.

Megbeszélés

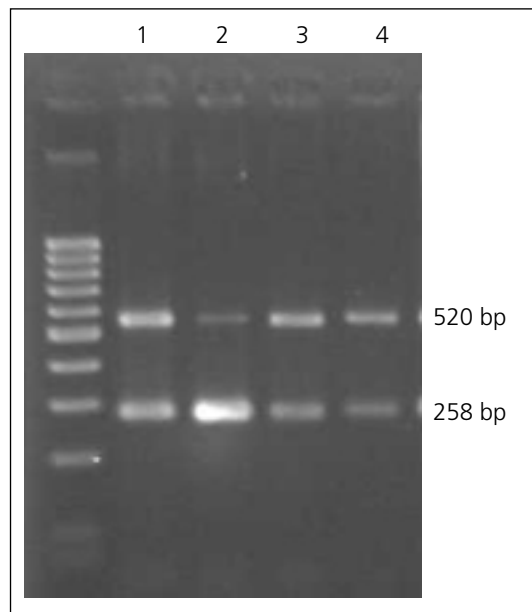
A neuroblastoma a leggyakoribb gyermekkori extracranialis szolid tumor. Bár gyakran mutat spontán differenciációt vagy regressziót, egyes betegek prognózisa igen rossz. A II és III stádiumba tartozó betegeknél a magas rizikójú csoportba az n-myc gén amplifikációját tartalmazó tumorokat soroljuk, ezért rendkívül fontos az amplifikáció kimutatása. Az n-myc gén kópiaszámát meg lehet határozni Southern blottal, FISH-sel és PCR-alapú komparatív (2) vagy kompetitív módszerekkel (3, 4). Ez utóbbi kettő alkalmazása önmagában második módszer nélkül nem ajánlható. Southern blot-alapú módszerrel csak akkor mondhatjuk ki az amplifikációt, ha a termék legalább négyszeres intenzitásbeli különbséget mu-

tat egy belső kontrollhoz képest. Négyeszeres amplifikáció alatt az eredményt FISH-sel kell igazolni. Hátránya még, hogy legalább 10 mg tumorszövetet igényel. A fenti PCR- és Southern blot-alapú módszerek a tumor heterogenitását nem képesek kimutatni, és a pontos kimutatáshoz szükséges, hogy a minta legalább 60%-ban tumorsejtet tartalmazzon. A FISH az amplifikációt sejtenként vizsgálja, így megfelelő számú sejtet használva mindkét fenti probléma kiküszöbölhető (9), ugyanakkor igen munkaigényes és drága eljárás.

Az n-myc-génamplifikáció kimutatásához új, valós idejű kvantitatív PCR-alapú eljárást használtunk, amely nem igényel több mintát vagy munkát, mint a hagyományos PCR eljárások. A termék valós idejű detektálásához fluoreszcensen jelölt próbát használ, ez teszi lehetővé a kvantitatív analízist is. A termék mennyiségi meghatározása a hagyományos PCR eljárásokkal szemben a logaritmusos fázisban történik. Az általunk használt LightCycler készülék további előnye, hogy a reakció boroszilikát kapillárisokban zajlik, amely lehetővé teszi egy mérés idejének harmadára-negyedére csökkentését. A mennyiségi meghatározás ismert kópiaszámú mintákból felépült kalibrációs görbe alapján történik. Az n-myc-amplifikáció meghatározására a kalibrációs sort a 25-szörös n-myc-génamplifikációt tartalmazó IMR 32 sejtvonalból izolált DNS-t, egészséges mellékveséből izolált DNS-t, valamint a kettő elegyítéséből előállított 2-, 10-, 13-szoros kópiaszámú DNS-t használtunk. A reakció optimalizálása után az eljárás érzékenységét vizsgálva azt mondhatjuk, hogy képes akár kétszeres amplifikációt is reprodukálhatóan kimutatni.

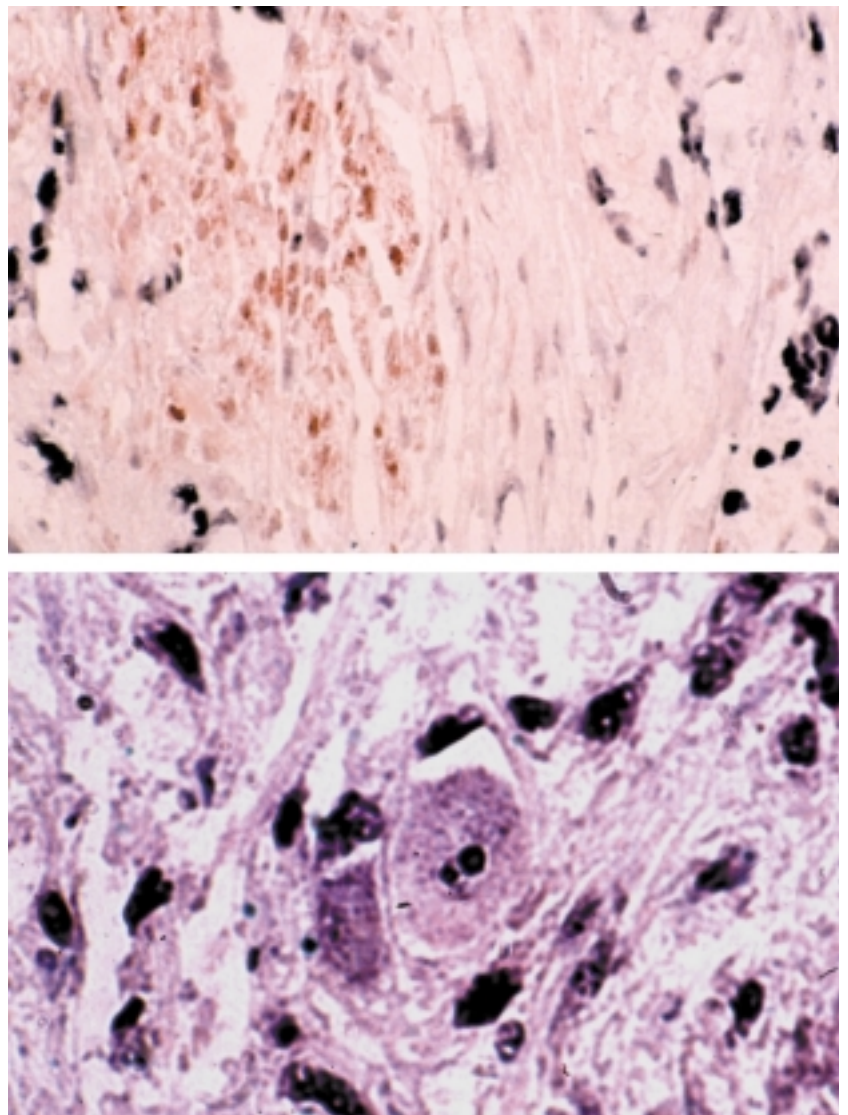
Összehasonlítva a szemikvantitatív és a valós idejű PCR eredményeit azt tapasztaltuk, hogy a szemikvantitatív 10-szeresnél kisebb mértékű amplifikációt tartalmazó tumorokat nehéz elkülöníteni az amplifikációt nem tartalmazóktól. Mivel a kezelés szempontjából fontos a minimális amplifikáció kimutatása is, annak, aki ezt a módszert használja, tanácsos, hogy az n-myc sáv 55%-os relatív intenzitása felett az eredményt FISH, Southern blot vagy valós idejű PCR módszerrel ellenőrizze.

Az in situ PCR alkalmazása akkor előnyös, ha az n-myc-génamplifikáció jelenléte nem áll összhangban a szövettani és egyéb prognosztikai faktorokkal. Ennek a módszernek előnye, hogy paraffinba ágyazott mintát is használhatunk, valamint az in situ PCR reakció után immunhisztokémiai vizsgálat is végezhető (4. ábra). Az általunk vizsgált két tumor esetében, bár a fenti PCR alapú eljárásokkal amplifikációt találtunk, a differenciált sejtalakok n-myc-amplifikációt nem tartalmaztak. A 4-es számú esetben in situ PCR-rel jól elkülönült a szövettanilag is eltérő két sejtpopuláció, egy rosszul differenciált neuroblastomás, és egy jól differenciált ganglioneuroblastomás komponens. A 15-ös esetben a beteg a szövettani vizsgálat előtt kemoterápiás kezelést kapott. Az n-myc-génamplifikáció hiányát a kiértékelt alkognál ebben az esetben azzal magyarázhatjuk,



3. ábra. Szemikvantitatív PCR géldenzitometriás kiértékelése. 1: kontroll egészséges mellékveséből. 2: IMR 32 sejtvonal. 3: 11-es eset, 4: 12-es eset. Az utóbbi kettőben amplifikáció nem volt. Az 520 bp hosszú szakasz a β -globin, a 258 bp hosszú az n-myc termék.

4. ábra. 4-es mintán végzett in situ PCR vizsgálatok. A felső képen látható, hogy az S100-pozitív sejtek nem mutatnak amplifikációt. A lenti képen amplifikációt tartalmazó neuroblastok között egy ganglionsejt helyezkedik el. Az utóbbiban amplifikáció nem látható.



hogya a kezelés hatására a sejtek Schwann-sejt és ganglionsejt irányba differenciálódtak, elvesztve az n-myc-génamplifikációt.

A valós idejű PCR megbízható és pontos eredményt ad az n-myc-amplifikáció meghatározásánál. Tapasztalataink alapján előnyben részesítjük a fent leírt módszerekkel szemben, egyrészt pontosságáért, másrészt a reakciók gyors kivitelezhetősége miatt.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak dr. Tóth Erika adjunktusnak, Budai Zsuzsa, Takács Józsefné, Schád Béláné szakasszisztenseknek és Kónya Miklós főnyelvtanárnak a munka elkészítésében nyújtott segítségükért.

Irodalom

1. Coze C, Hartman O, Michon J, et al. NB87 induction protocol for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age: a report from the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 15:3433-3440, 1997
2. Crabbe DCG, Peters J, Seeger RC. Rapid detection of MYCN gene amplification in neuroblastoma using the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Path* 4:229-234, 1992
3. Hasan Z, Inoue A, Ikeda H, et al. Competitive polymerase chain reaction for the determination of N-myc amplification in neuroblastoma: report of clinical cases. *Eur J Pediatr Surg* 9:138-141, 1999
4. Inoue A, Hasan Z, Hemmi H, et al. Competitive polymerase chain reaction for the quantification of N-myc gene copy number in neuroblastoma. *Tumour Biol* 17:262-270, 1996
5. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341:1165-1173, 1999
6. Reynolds CP, Villablanca J, Stram DO, et al. 13-cis-retinoic acid after intensive consolidation therapy for neuroblastoma improves event-free survival: a randomized Children's Cancer Group Study. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 17, 1998
7. Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308:288-291, 1984
8. Seeger RC, Garrett M, Brodeur M, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111-1116, 1985
9. Tajiri T, Shono K, Fujii Z, et al. Highly sensitive analysis for N-myc amplification in neuroblastoma based on fluorescence in situ hybridization. *J Pediatr Surg* 34:1615-1619, 1999
10. Villablanca JG, Khan AA, Avramis VI, et al. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 13:894-901, 1995
11. Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, et al. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol* 16:2169-2180, 1998

MEGHÍVÓ

Örömmel értesítünk minden pszichoonkológiai munkát végző és a tevékenység iránt érdeklődő kollégát, hogy

**2002. április 26-27-én
Pszichoonkológiai Konferenciát
rendezünk Kecskeméten.**

Ez az alkalom kitűnő lehetőség a tudományos program mellett a találkozásra, egymás megismerésére és egyben a

Magyar Pszichoonkológiai Társaság megalakítására.

Jelentkezési határidő: 2002. március 26.

Jelentkezési címek:

Dr. Molnár Mária
Megyei kórház, Onkoradiológiai központ
6000. Kecskemét, Nyíri u. 38.
Tel.: 76-516-700/5925 mellék
Fax: 76-481-840
e-mail: molnarm@kmk.hu

Rohányszky Magdolna
Szt. László Kórház, Onkológiai Osztály
1097. Budapest, Gyáli út 5-7.
Tel.: 1-455-8100/8324 mellék
e-mail: aradne@euroweb.hu

A jelentkezőknek a végleges programról tájékoztatást küldünk.