

Paradigmaváltás a daganatok patológiai diagnosztikájában: molekuláris alapú differenciáldiagnosztika, prognosztikus és prediktív patológia

Orosz Zsolt¹, Sápi Zoltán⁴, Szentirmay Zoltán², Tímár József³, Tóth József¹

Országos Onkológiai Intézet, ¹Humán és Kísérletes Daganatpatológiai,

²Molekuláris Patológiai, ³Tumor Progressziós Osztály,

⁴Semmelweis Egyetem 1. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézet, Budapest

A patológia klasszikus metodikai skálája az ultrastrukturális módszerek és az immunhisztokémia után újabban a molekuláris (genomiális) technikákkal bővült, ami lehetővé tette hogy a diagnosztika a szöveti/sejtszint mellett kiegészüljön a molekuláris szinttel is. Ez a fejlődés alapjaiban változtatta/változtatja meg a daganatok differenciál diagnosztikáját és fő motorja a prognosztikus és prediktív patológia fejlődésének. Lehetővé vált virális kóroki tényező kimutatása (HPV), a lágyrésztumorkok reklaszifikációja. Beépültek a napi rutinba a molekuláris szintű prognózisbecslési módszerek (mikrosatellita-instabilitás: vastagbélrák, HER2-génamplifikáció: emlőrák, N-MYC-amplifikáció: neuroblastoma). A daganatok molekulárisan célzott terápiája pedig kifejleszti a molekuláris prediktív patológiát (c-kit-expresszió és -mutáció: gastrointestinalis stromalis tumor, fokozott EGFR-expresszió, -amplifikáció, -mutáció: nem-kissejtes tüdőrák, vastag- és végbélrák). A molekuláris patológia fejlődése töretlenül tűnik és jelentős mértékben járul hozzá a klinikai onkológia korszerűsödéséhez. *Magyar Onkológia, 51:103–112, 2007*

Classical methodology of surgical pathology extended first with ultrastructural methods, then with immunohistochemistry and more recently with molecular/genomic techniques. These changes added new dimensions to the classical tissue- and cellular levels of diagnostics: the molecular level. This change is the primary motor of the development of the diagnostic as well as the prognostic and predictive pathology. It is now possible to identify an ethiological factor (HPV) or reclassify an entire entity (soft tissue tumors). Prognosis of cancer relies more and more on molecular/genetic parameters such as microsatellite instability, gene amplifications etc. Targeted therapy of cancer develops parallel with the molecular predictive pathology such as the anti-HER2 or anti-EGFR therapies. In conclusion, it is fair to say that molecular pathology contributes significantly to the development of clinical oncology. *Orosz Z, Sápi Z, Szentirmay Z, Tímár J, Tóth J. Paradigm shift in surgical pathology of cancer: molecular diagnostics, prognosticators and predictive pathology. Hungarian Oncology, 51:103–112, 2007*



Bevezetés

A patológiai diagnosztika az évszázadokkal ezelőtti makroszkópos patológiából fejlődött ki és a múlt században gyakorlatilag a sejt- illetve szöveti patológiára alapult és jó értelemben az orvostudomány egyik legkonzervatívabb ágának bizonyult.

A daganatok diagnosztikája mind a mai napig szövettani diagnózison alapul, amely elsősorban a daganat dignitását, de ezen túlmenően biológiai viselkedését is igyekszik pontosan megjósolni. Ebből az ágból fejlődik ki a szemünk láttára a prognosztikus patológia, amely olyan objektív ún. molekuláris tényezőket vesz figyelembe a biológiai viselkedés jóslására, amelyek meghatározó szerepet játszanak az adott daganattípus progressziójában. A diagnosztikus patológia egy másik, szintén gyorsan fejlődő ága a prediktív patológia, amely nemcsak a daganat típusát és lehetséges biológiai viselkedését, hanem terápiás érzékenységét is képes meghatározni. Ezzel a három ágával a patoló-

Közlésre érkezett: 2007. május 20.

Elfogadva: 2007. június 20.

Levelezési cím: Dr. Tímár József,
Országos Onkológiai Intézet,
1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.,
Tel.: 1-224-8786, Fax: 1-224-8706, e-mail: jtimar@oncol.hu

gia, legalább is az onkológiában, a klinikai döntéshozatal kulcsszereplőjévé vált.

A szövettani alapú diagnosztika egyeduralmát az ultrastrukturális patológia igyekezett megtörni, de sikere átmeneti volt, mert az immunhisztokémia diagnosztikában történő elterjedése jelentőségét lecsökkentette. Az immunhisztokémia mintegy előhírnöke volt a molekuláris diagnosztikának, hiszen segítségével a differenciáldiagnosztikát egy másik dimenzióba helyezte, mely már a makromolekulák szintje. Az elmúlt évtized a molekuláris patológia kifejlődésének évtizede, amely molekuláris genetikai módszerek segítségével segít megválaszolni a klinikai kérdéseket, a daganat dignitását, a progressziós képességet illetve a terápiás érzékenységet, amit a betegből vett sejt- illetve szövetminták analizisére alapoz.

A patológia metodikai skálája jelentősen bővült ezzel a fenti fejlődési folyamattal párhuzamosan, és kiegészült a nukleinsav alapú technikákkal, a polimeráz láncreakció különféle formáival, az in situ hibridizációs technikákkal, a génszekvenálási módszerekkel és újabban a globális genomiális módszerekkel, mint amilyen a DNS-mikrocsip, a lézer-mikrodisszekció, vagy a komparatív genomiális hibridizáció. A klasszikus szövettani módszerek közé bekerült a szöveti mikroarray módszere és a protein-technikák között rutinná vált a Western blot technika illetve megjelent a tömegspektrometria is. E jelenségek elérték a kritikus határértéket, aminek alapján ma már paradigmaváltásról kell beszélnünk a daganatok patológiai diagnosztikájában, mert a korábban egyeduralkodónak tűnő klasszikus hematoxilin-eozinos szövettani diagnosztika legalábbis kiegészült ezen új eljárásokkal és az azokra alapozódó ún. molekuláris diagnosztikával. Az alábbiakban példákat fogunk felvonultatni e paradigmaváltásra és azokra az új problémákra, amelyek az új módszerek megjelenésével keletkeztek a daganatok rutin diagnosztikájában.

A humán papillomavírusok (HPV) kimutatásának patológiai jelentősége

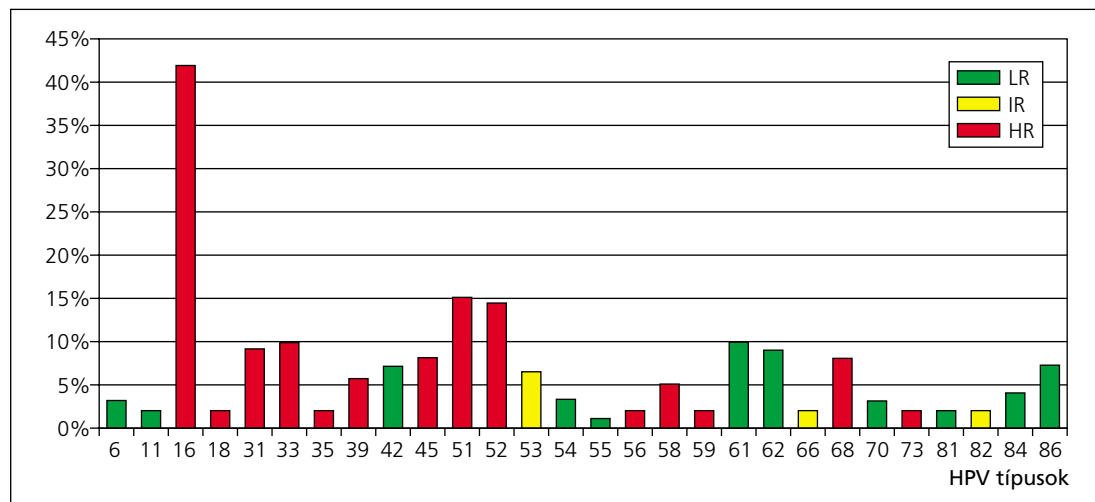
A HPV-fertőzés az összes emberi daganat 6,1%-át okozza (21). Az embert megbetegítő HPV-féleség-

gek közül számos csak a bőrön okoz szemölcsöket, esetleg könnyen gyógyítható bőrrákot, míg legalább 60-féle vírus azokat a testrészeket fertőzi, amelyeket többrétegű laphámmal fedett nyálkahártya borít, mint a méhnyak, hüvely, szeméremtest, szájüreg, garat, gége, nyelöcső, a húgycsőnyílás és végbélnyílás környéke. Újabb adatok szerint az invazív ductalis emlőrákok 25-48%-ában is kimutatták HPV jelenlétét (7).

Epidemiológiai adatok – előfordulási gyakoriság rákmegelőző állapotokban és méhnyakrákban – illetve filogenetikai hasonlóság alapján megkülönböztetünk alacsony-, átmeneti- és magas rizikójú HPV-típusokat (1. ábra). A kétféle besorolás egymással nagyon jól korrelál. A rizikócsoporthoz sorolás azonban nem utal a HPV fertőzőképességre vagy a méhnyakrák fejlődésmentének időtartamára. Az alacsony rizikójú (low-risk, LR) vagy „nem onkogén” HPV-típusok enyhe méhnyaklaphám-elváltozásokban (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL, enyhe dysplasia), condylomákban és juvenilis laryngealis papillomatosisban fordulnak elő, egészen kivételesek méhnyakrákban. Az átmeneti rizikójú (intermediate risk, IR) vagy „valószínűleg onkogén” HPV-típust korábban a LR csoportba sorolták, de LSIL mellett a méhnyak közepes és súlyos dysplasiáiban (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) és méhnyakrákban is előfordul. A magas rizikójú (high-risk, HR) HPV-féleségek emelkedő gyakorisággal fordulnak elő egyre súlyosbodó cervicális dysplasiákban és méhnyakrákban. Például saját HPV-pozitív cervixcitológiai anyagunkban (705 mintában polimeráz láncreakcióval [PCR] azonosított 890 vírus) 646 HR-HPV-t találtunk, ezek közül a Bethesda klasszifikáció szerinti negatív kenetekben a HPV16 30%, LSIL-ben 42% és HSIL-ben 52% előfordulási gyakoriságot mutatott.

Ismert, hogy a különböző régiókban előforduló HPV16-származékok egymástól 2%-ban is különbözhetnek, ezeket nevezzük variánsoknak. Egyéb HPV-törzsek is mutatnak variációkat. A HPV16-variánsok geográfiai és etnikai eredetűek (afrikai, európai, ázsiai, bennszülött amerikai), és a vírusok egymástól az E6, az L1, vagy mindkét vírusgén szekvenciájában különbözhetnek. Valósídejű PCR tesztet használva, mi az L1 génben

1. ábra.
Különböző típusok előfordulási gyakorisága HPV-pozitív cervixcitológiai mintákban Magyarországon. A gyakorisági hisztogram 125 vizsgált nőben előforduló 223 vírust tartalmaz. Mind-egyik mintában a HPV tipizálása „Linear Array HPV Genotyping Test” segítségével történt. Eltérően jelöltük az alacsony, átmeneti és magas rizikójú vírusokat. (További 766 HPV-féleség, amelyeket más eljárással (hagyományos PCR) azonosítottunk – bár gyakorisági eloszlásuk hasonló – a jelen adatok között nem szerepel.)



előforduló T350G európai típusú mutációt a magyarországi HPV16 vírusok mintegy 30%-ában találtak meg. Ennek az a jelentősége, hogy a variánsokkal szemben esetleg kevésbé hatékony a most folyó HPV-ellenes vakcináció.

A méhnyak citológiai vizsgálatával kapcsolatos HPV-teszt a következő esetekben ajánlott: (a) Ha az előző citológiai vizsgálat rák megelőző állapot gyanúját vetette fel, de az eredmény nem egyértelmű (ASCUS, ASC-H, AGUS). (b) citológiai indikáció alapján végzett conisatiót követő kontroll vizsgálat során a kezelés eredményének értékelésére. (c) Tervezett terhesség előtt az esetleges HPV-fertőzöttség kimutatására. Ez a vizsgálat azért is fontos, mert a juvenilis laryngealis papillomatosis gyermekkori formájában a HPV-fertőzés mindig az anyától származik. (d) Végül partnerkapcsolatokkal összefüggő kérdések miatt.

Ha a citológiai- és HPV-teszt egyaránt negatív, nincs méhnyakrákkockázat, ezért újabb szűrővizsgálatot elég 3 év múlva végezni. Ha a HPV-teszt pozitív és a citológiai vizsgálat eredménye negatív, illetve HPV-negatív teszt és ASCUS esetén 12 hónap múlva javasolunk újabb citológiai és HPV-vizsgálatot. Ha ASCUS vagy LSIL mellett a HPV-teszt pozitív, kolposzkópos vizsgálat, esetleg conisatio szükséges.

A szájrégi, garat- és gége-, valamint a nyelöcsőrakok legalább egyharmadában a HPV jelenléte szintén kimutatható. A HPV-fertőzés összefüggést mutat a daganatok szövettani típusával. A verrucosus carcinomák 100%-ában, a basalooid laphámrákok 88%-ában a HPV kimutatható, de a környezeti karcinogén hatásra (alkohol, dohányzás) visszavezethető elszarusodó laphámrákok 20%-a is HPV-pozitív. Ezek a laphámrákok a nekik megfelelő HPV-negatív tumoroknál sugárérzékenyeb-

ek, a lokális recidíva aránya alacsonyabb és az átlagos 5 éves túlélési idő is kedvezőbb (22).

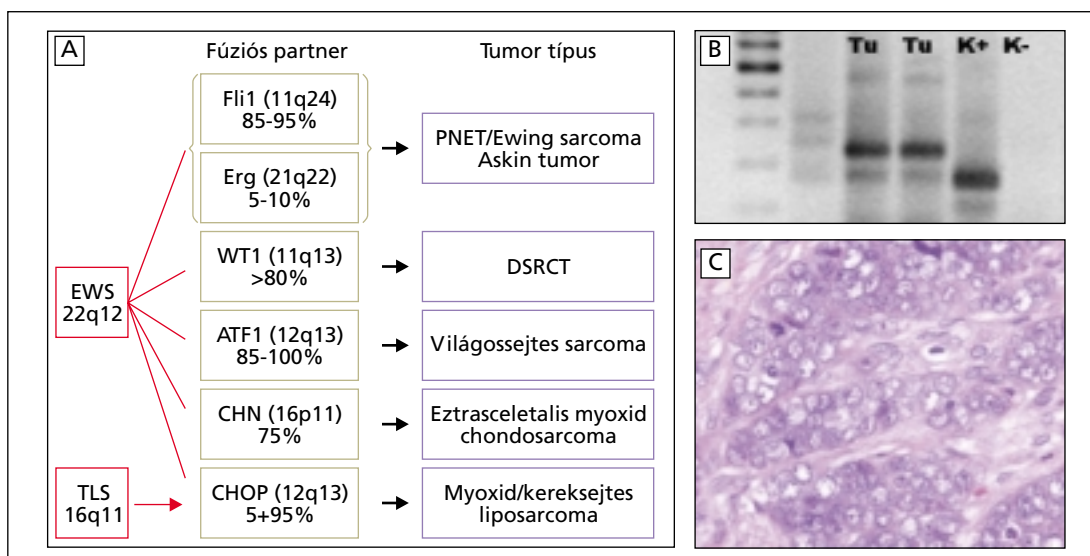
Lágyrésztumorok molekuláris patológiai diagnosztikája

A lágyrészdaganatok a mesenchyma tumoros vagy tumorszerű elváltozásai, amelyeket a bennük megfigyelhető szöveti differenciáció – zsírszövet, sima- és harántcsíkolt izom, endothel, perifériás ideg, csont, porc, mesothel, synovium, fibroblast stb. – alapján osztályozunk fő csoportokba. Gyakorlatilag minden csoportban előfordulnak jóindulatú, intermedier viselkedésű és malignus daganatok, és a hisztológiailag karakterizált entitások száma meghaladja a 150-et.

Egy lágyrészdaganat diagnosztizálása során a szöveti szerkezet mellett figyelembe kell venni a beteg korát, az elváltozás elhelyezkedését, növekedési ütemét, környezethez való viszonyát, az elhalások és bevérezések jelenlétét vagy hiányát, a sejttípust és az osztódási aktivitást. A differenciáció megállapításához sokszor elengedhetetlen immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése. A fenti paraméterek alapos elemzése az esetek többségében elegendő a pontos diagnózis megállapításához, azonban átfedő morfológiájú esetek nem csak a differenciálatlan, hanem a kiérett szövetekből felépülő daganatok csoportjában is előfordulnak.

A lágyrészdaganatok egy részében jellegzetes kromoszómaeltérések fordulnak elő, amelyek gyakran az adott tumortípusra karakterisztikus fúziós gének kialakulásához vezetnek. A fúziós gének kimutatása hozzájárul a szövettani kép és immunfenotípus alapján nehezen eldönthető, ezért a korrekt terápiát is befolyásoló diagnosztikai problémák megoldásához (2. ábra).

2. ábra. A: Az EWS gén transzlokációja más-más fúziós partnerekkel, továbbá a kialakult fúziós gén előfordulási gyakorisága a rá jellemző lágyrész-sarcomában. A myxoid/kereksejtes liposarcomában gyakori TLS/CHOP t(16;12)(q11;q13) traslokáció is fel van tüntetve. PNET=perifériás/primitív neuroectodermalis tumor; DSRCT=desmoplasticus kis kereksejtes tumor. B: Az EWS/Fli1 fúziós gén RT-PCR tesztje. Az mRNS izolálása abból a formalin-fixált, paraffinba ágyazott tumorszövet-mintából történt, ami a C ábrán látható. C: 13 éves fiú exoftalmust okozó sinus maxillaris tumora. A szövettani metszeteket több patológus is konzultálta, a végleges PNET diagnózist az EWS/Fli1 fúziós gén kimutatása adta meg.



A fúziós gének vizsgálatára RT-PCR (2.b ábra) vagy FISH technikát alkalmazhatunk, amelyek paraffinba ágyazott rutin szövettani anyagon is elvégezhetőek (18). Lágyszövetdaganatokban a 22q12 kromoszómaregióra lokalizált Ewing-sarcoma (EWS) gén az egyik leggyakoribb fúziós partner (2. ábra), ami több, különböző főcsoportba tartozó daganat kialakulásában játszik szerepet. A Ewing-sarcoma/primitív neuroectodermális tumor (PNET) csoport diagnózisát elősegítő EWS/Flil fúziós gén kimutatását illusztrálja a 2.b.c. ábra. A Ewing-sarcoma/PNET csoportban az EWS gén más génekkel fuzionált formái is megtalálhatók: EWS/ERG, EWS/ETV1, EWS/E1AF, EWS/FEW, EWS/ZSG. A t(X;18) (p11;q11) transzlokációval járó SYT/SSX1, SYT/SSX2 és SYT/SSX4 fúziós gének synovialis sarcomára, a PAX3/FKHR vagy PAX7/FKHR fúziós gének, amelyek t(2;3) (q35;q14) illetve t(1;3) (q35;q14) transzlokációt kísérnek, alveolaris rhabdomyosarcomára jellemzőek. Ezek kimutatása szintén hozzájárul az ún. „kis kereksejtes tumorok” diagnosztikájához (2, 8, 10). Az orsósejtes megjelenésű lágyszövetdaganatok között a congenitalis/infantil fibrosarcomára specifikus fúziós gén az ETV6-NTRK3, az inflammatorikus myofibroblastos tumorra a TPM3-ALK, TPM4-ALK, CLTC-ALK vagy CARS-ALK. A fúziós gének kimutatásának diagnosztikus erejére példa a myxoid liposarcomák és a lipoblastomák esete. A két elváltozás morfológiailag gyakran elkülöníthetetlen, azonban biológiai viselkedésük alapvetően eltérő. A myxoid liposarcomát magas kiújulási hajlam, dedifferenciációs és metasztatizáló potenciál jellemzi, míg a lipoblastoma lényegében jóindulatú elváltozás. A myxoid liposarcomát jellemző TLS/CHOP fúziós gén lipoblastomában soha nincs jelen, ennek kimutatásával így a terápiát meghatározó alapvető információhoz juthatunk.

Ugyanazon fúziós gén jelenléte morfológiailag eltérő két elváltozásban azok hisztogenetikai

rokonságát jelzi. A COL1A1-PDGFB fúziós gén kimutatása dermatofibrosarcoma protuberansban és óriássejtes fibroblastomában világított rá, hogy lényegében ugyanazon daganat két, megjelenésében eltérő formájával állunk szemben.

Az azonos morfológiai megjelenésű daganatok eltérő fúziós génjeinek (pl. Ewing-sarcoma) prognosztikus illetve prediktív értékére vonatkozó vizsgálatok jelenleg még folyamatban vannak.

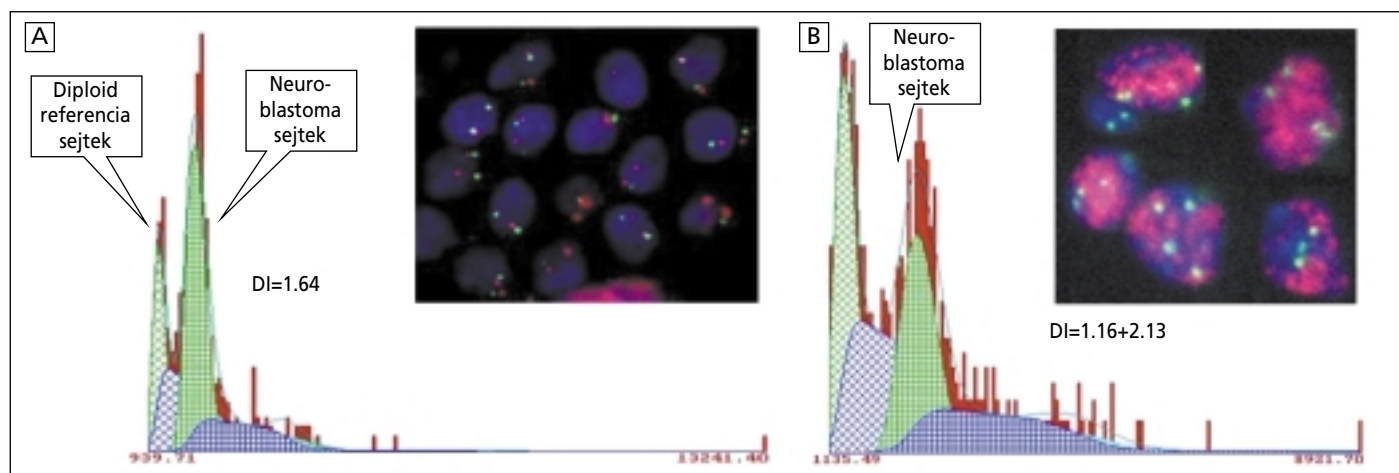
Genetikai prognózisbecslés

Néhány olyan génelváltozás található rosszindulatú daganatokban, amelyek nem kötődnek szorosan valamely daganattípushoz, ezért kimutatásuk inkább prognosztikai, mint diagnosztikai jelentőségű. Valamelyik onkogén amplifikációja egy adott tumorban az ugyanolyan szövettani szerkezetű de génamplifikációt nem tartalmazó másik tumorhoz képest kedvezőtlen kórlefeletást jelent. A génamplifikációk kimutatásának prognosztikai és terápiás értékére jó példa a MYCN onkogén kópiaszámának meghatározása neuroblastomában, valamint a c-erb-B2, más néven HER2/neu onkogén amplifikációjának vizsgálata emlőrákban. A mikroszatellita-instabilitás (MSI) kimutatásának diagnosztikai és prognosztikai értékét a vastagbélrákok példáján mutatjuk be. A fent említett vizsgálatok a megfelelő daganatellenes kezelés kiválasztásához ma már elengedhetetlenek.

A MYCN gén amplifikációja és a sejtenkénti DNS-tartalom meghatározásának prognosztikai értéke és terápiás jelentősége neuroblastomákban

A neuroblastoma differenciálatlan neuroectodermális sejtekből felépülő malignus tumor, amelynek sejtjei szövettanilag nem különböztethetők

3 ábra. A: Fél éves kislány 4S stádiumú neuroblastomája. A valósidejű PCR és FISH egyaránt 2 kópia MYCN gént, a DNS-hisztogram aneuploid, közel triploid sejtpopulációt mutat. Mindegyik prognosztikai paraméter kedvező kórlefeletásra utal, a gyermek 4 évvel a daganat felismerése után is él, tumormentes. B: Két éves kisfiú 3. stádiumú tumora. A sejtekben a MYCN gén 300 kópiáját mutattuk ki valósidejű PCR-rel, a FISH kép a 2. kromoszóma tetraszómiája mellett szintén nagyfokú génamplifikációra utal. A DNS-hisztogram 2 aneuploid, gyorsan proliferáló sejtpopulációt mutat. Mindezek a daganatos genom nagyfokú instabilitására, generalizált kromoszómális strukturális eltérésekre engednek következtetni, ami együttesen a rossz prognózis jele. A gyermek 3 évvel a primer tumor jelentkezése után daganatos betegségében meghalt.



meg az embrionális neuroblastoktól. Gyermekekben a leggyakrabban előforduló szolid tumor, 80-95%-ban 5 évesnél fiatalabb életkorban jelentkezik, és a daganatos halálesetek mintegy 15%-áért felelős. Az adott tumorra legmegfelelőbb daganatellenes terápia megválasztása (csak műtét, műtét és egyszerű adjuváns kemoterápia, műtét és nagy dózisú agresszív kemoterápia csontvelő-átültetéssel) a klinikai stádium, a szövettani grading, az MYCN-amplifikáció mértéke és a DNS-ploidia segítségével meghatározott rizikocsoportba sorolástól függ. Az MYCN-kópiaszám meghatározását valósidejű kvantitatív PCR eljárással és/vagy FISH technikával, a sejtenkénti DNS-tartalom vizsgálatát Feulgen-festett kenetek digitális képanalízisével végezzük (3. ábra).

Az MYCN-amplifikációt mutató, eredetileg rossz prognózisú neuroblastomás betegek kórlefolását valamivel kedvezőtlenebbnek találtuk, mint az olyan betegek túlélését, akiknek a daganatában az MYCN nem volt amplifikált. A különbség azonban nem volt szignifikáns (13). Mindez azzal magyarázható, hogy Magyarországon a neuroblastoma választandó kezelése jelenleg már molekuláris patológiai diagnózison és a várható kórlefolás előrejelzésén alapul. A kezelőorvos a tumorelles kezelés megválasztásakor az MYCN-kópiaszám adatot mindig figyelembe veszi, és ezért a biológiailag eleve agresszívabb tumorokat is hatásos terápiaiban részesítheti.

HER2/neu-amplifikáció vizsgálata emlőrákban

Az emlőrákok bizonyítékokon alapuló prognosztikai faktorai sora – kor, TNM-stádium, szövettani differenciáltság és hormonreceptor-státus – az elmúlt években a HER2-státusszal bővült. A HER2 a humán epidermális növekedési faktor receptor-család 2-es számú tagja. A HER2 receptor tirozin-kináz-aktivitással rendelkezik, szerepe van a sejtnövekedésben, differenciációban, a migráció szabályozásában. A HER2 receptor az emlőrákok 15-25%-ában fokozott mértékben, az ép hámsejtekhez képest nagyságrendekkel nagyobb számban van jelen. A receptorfehérje felszaporodásának hátterében a kódoló HER2 gén számbeli felszaporodása, amplifikációja áll. A tapasztalatok szerint a HER2-pozitív emlőrákok kedvezőtlenebb kórlefolásúak.

A HER2 kedvezőtlen prognosztikai szerepe azonban kedvező prediktív értékkel kombinálódik, mert a receptor-túlprodukció miatti túlműködés sikeresen blokkolható egy neutralizáló antitesttel, a trastuzumabbal, ami Herceptin® néven került gyógyszerként törzskönyvezésre. A Herceptin sikeresnek bizonyult a HER2-pozitív emlőrákok kezelésében. A gyógyszer alkalmazásának feltétele a HER2 protein túlprodukciójának illetve az ezt kiváltó génamplifikációnak az igazolása.

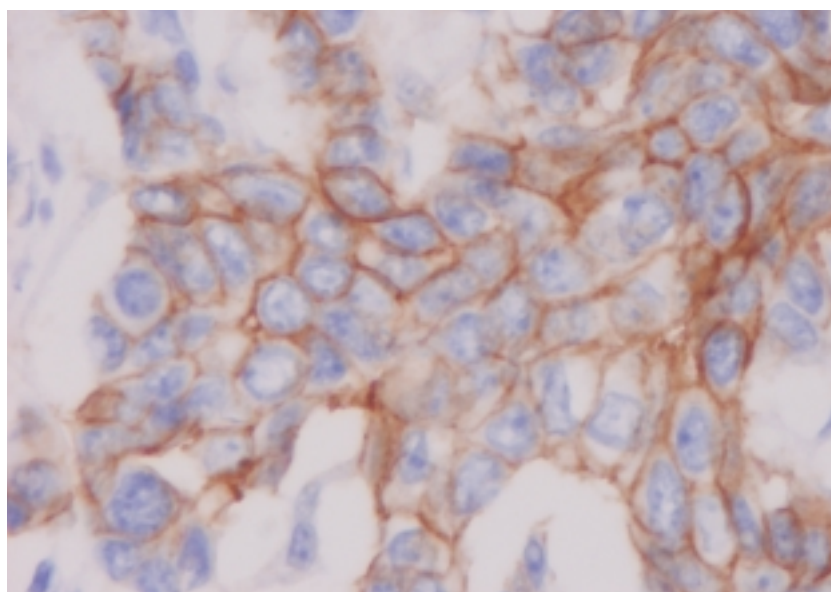
A HER2 protein kimutatására a kereskedelemben számos immunhisztokémiai antitest áll rendelkezésre. Mivel a fehérje a normális sejtekben is jelen van, alapvető fontosságú, hogy a reakció érzékenysége ennek megfelelően legyen beállítva, azaz standardizált legyen. Intézetünk-

ben 2002 óta végzünk HER2-státus-meghatározást, immunhisztokémiai és fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) módszerrel (6). A különböző antitestekkel elvégzett reakciókat rendszeresen összehasonlítjuk az ugyanazon a mintán elvégzett FISH-vizsgálatok eredményével, az immunhisztokémiai vizsgálatok értékelésénél a HercepTest-re kialakított 0, 1+, 2+ és 3+ skálát alkalmazva (4. ábra). A különböző antitestek a receptorfehérje különböző epitópjai ellen kerültek kifejlesztésre, így nem meglepő, hogy azok egyazon szövetszövetminta-sorozaton nem adnak teljesen azonos eredményt, illetve az immunhisztokémiai- és FISH-eredmények sem 100%-ban egybevágoak. Emiatt indokolt minden immunhisztokémiai kétséges esetben elvégezni a FISH-vizsgálatot, illetve periodikusan minden olyan laboratórium esetében, ahol FISH-vizsgálat nem áll rendelkezésre, kontroll vizsgálatokat végeztetni a reakciók validálására. A génamplifikáció vizsgálatára igéretes, könnyebben hozzáférhető módszer a kromogén szubsztrátos in situ hibridizáció (CISH), amelynek eredményei a FISH-vizsgálatokéval közel azonos pontosságúak.

Mikroszatellita-instabilitás (MSI) kimutatásának jelentősége vastagbélrákban

Az összes vastagbélrákot a mikroszatellita-státus alapján két fő csoportra lehet osztani. A daganatok nagyobb csoportjában kromoszomális instabilitás és mikroszatellita-stabilitás (MSS) mutatható ki, a másik kisebb csoportra pedig a magas fokú mikroszatellita-instabilitás (MSI-H) jellemző. A két tumorcsoport egymástól szövettani szerkezetében és kórlefolásában különbözik. Az MSS daganatokban a TP53 gén rendszerint mutáns és durva kromoszomális rendellenességek is kialakulnak, amelyek aneuploidiában nyilvánulnak meg. Az MSI-H tumorokra viszont valamelyik DNS-hibajavító génben a leolvasási keret funkcióvesztő mutációja vagy az MLH1 gén promotermetilációja okozta génműködés gátlása lesz a jellemző, ami nem jár kromoszomális instabilitással. Az MSI-H rákok egy

4. ábra.
HercepTest 3+ invazív ductális carcinoma immunhisztokémiai képe. A daganatsejtek membránjában körkörös intenzív jelölődés (barna reakció)



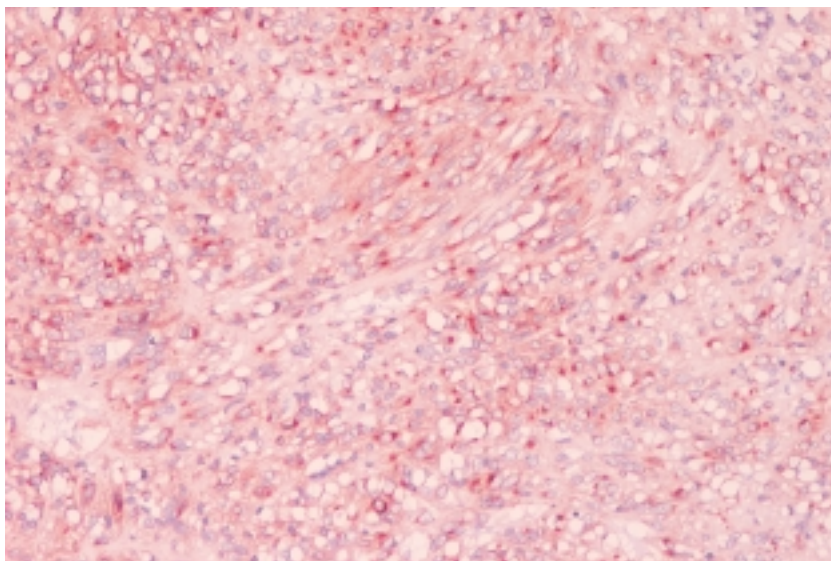
része idős korban jelentkezik, sporadikus és az összes daganat mintegy 15%-át teszik ki, további 3-5% a herediter nem-polyposis colorectalis carcinoma (HNPCC) szindrómával kapcsolatos. Ellentétes biológiai viselkedés tapasztalható az MSS és MSI-H tumortípusnál. Az MSS daganatok kórlefolása rendszerint kedvezőtlen, az 5 éves túlélési arány 35%, ugyanakkor adjuváns 5-fluorouracil-kezelésre rendszerint jól reagálnak. Ezzel szemben az MSI-H carcinomák kórlefolása nagyon kedvező. A Dukés C-stádiumú MSI-H rákok adjuváns kemoterápia után, sőt HNPCC esetén a kemoterápiát elhagyva is 80-90%-os 5 éves túlélést mutatnak, de nem jól reagálnak 5-fluorouracil-terápiára, sőt az ilyen kezelés a betegség kimenetelét rontja (20). A mikroszatellita-státus PCR-rel történő rutinszerű meghatározása fixálatlan vagy formalin-fixált, paraffinba ágyazott tumorszövetből lehetséges. Ez két szempontból is nagyon fontos: először, mert nagymértékben segíti a kezelő orvost a várható kórlefolás és a legmegfelelőbb kezelés kiválasztásában; másodsor, mert nagyon jó módszer a fiatal korban jelentkező HNPCC kiszűrésére.

A daganatellenes célzott kemoterápia alkalmazásának molekuláris diagnosztikai alapja

KIT és PDGFRA gének mutációi gastrointestinalis stromalis tumorokban

Jelenleg három olyan gént ismerünk (c-kit, PDGFRA, EGFR), amelyek funkcionyerő mutációjának kimutatása terápiás jelentőségű. A KIT gén, ami egy tirozinkináz-családba tartozó receptorfehérjét, a c-kit-et kódolja, a gastrointestinalis stromalis tumorok (GIST) 85%-ában mutáns. A GIST a gastrointestinalis traktus leggyakoribb mesenchymalis tumora, ami az interstitialis Cajal-sejtekhez hasonló differenciációt mutat. A szövettani diagnózist a GIST-ek változatos morfológiája nehezíti, ezért minden gastrointestinalis traktusra lokalizált lágyrészdaganat esetében indokolt immunhisztokémiai vizsgálati panel alkalmazása. A GIST diagnózist a CD117 immunhisztokémiai reakció klasszikus GIST-ben (piros reakció)

5. ábra.
CD117/c-kit
immunhisztokémiai
reakció klasszikus
GIST-ben (piros reakció)



tokémiai reakció pozitívásával támasztjuk alá (5. ábra). A tumorok várható biológiai viselkedését az osztódási aktivitás (50 nagy nagytűsű - 400-szoros - látótérben megszámlolt mitotikus formák száma) illetve a daganat mérete határozza meg, ennek alapján soroljuk a GIST-eket rizikócsoportokba. Újabb szakirodalmi adatok szerint a GIST kiindulási helyét is figyelembe kell venni, ugyanolyan patológiai paraméterek mellett a vékonybél-GIST-ek rosszabb prognózissal járnak.

A KIT által kódolt c-kit receptorfehérje ép sejtekben történő aktiválódását az ún. őssejtfaktor (stem cell factor, steel factor, SCF) indukálja. GIST-ekben a KIT gén mutációja miatt a receptor a ligand bekötődése nélkül is folyamatosan aktív. A mutáció a KIT gén különböző exonjait érinti, ezek gyakoriság szerint csökkenő sorrendben a következők: exon 11, exon 9, exon 13 illetve exon 17. Ezek a mutációk a c-kit receptorfehérje extracelluláris, sejtmembránhoz közeli, illetve tirozinkináz I-es vagy II-es szakaszait érinthetik.

Recidív, irreszekábilis vagy metasztatikus GIST-ek kezelésében, amelyek a korábbi kemo- vagy sugárterápiás kezelésekre gyakorlatilag rezisztensnek bizonyultak, áttörést hozott az imatinib mesylat (Glivec®) alkalmazása. A kismolekulású gyógyszer hatékonyan blokkolja a kóros intracitoplazmatikus szignálutat, klinikai hatékonyságát pedig a 80% körüli terápiás válaszarány bizonyítja.

A klinikai tapasztalatok azt is bizonyították, hogy a KIT gén különböző típusai eltérő terápiás érzékenységgel járnak. A leggyakoribb, 11-es exon mutáció mellett az imatinib mesylat hatékony, míg a 9-es exon mutációja esetén a megfelelő hatékonyság a gyógyszer magasabb kezdő adagjával érhető el.

A KIT génre vad típusú GIST-ekben a KIT génben nem mutatható ki mutáció. Ezek a GIST-ek CD117 immunhisztokémiai reakcióval általában negatívak. A KIT génre vad típusú GIST-ek nagyobb részében a daganat kialakulásának hátterében egy másik tirozinkináz gén, a thrombocyta-eredetű növekedési faktor receptor alfa (PDGFRA) mutációi állnak. A mutáció itt is különböző helyeken, a 12-es, 14-es, vagy 18-as exonban fordul elő. A primeren PDGFRA-mutáns GIST-ek általában imatinib-rezisztensek, és a megfigyelések szerint gyakori, hogy a terápia során rezisztenssé váló GIST-ek esetében második, PDGFRA-mutáció alakul ki.

A PDGFRA-mutáns illetve rezisztenssé váló GIST-ek kezelésében eredményt a sunitinib-kezelés hozhat (16).

Az EGFR molekuláris patológiája

A klinikai onkológia egyik legdinamikusabban fejlődő ága a célzott terápiák területe, amely megkezdte átalakítani a tradicionális kezelési sémákat. E célzott terápiás gyógyszerek egyik legígéretesebb csoportja az EGF-receptorgátló szerek családja, amely különböző daganattípusokban jelentős klinikai aktivitást mutatott, néhány esetben olyan daganatok esetében is, amelyeknél

a terápiás eredmények elérték határaikat (3). Ma-napság az anti-EGFR szerek két csoportját ismer-jük, a monoklonális antitesteket és a tirozinkináz-gátlókat. A célzott terápia sikeressége szem-pontjából nagyon fontos annak a betegcsoport-nak a meghatározása, amely esetében a célzott terápia maximális sikereket érhet el. Két daga-natfeleség esetében a törzskönyvezett anti-EGFR szer alkalmazásának feltétele az akár igen ala-csony szintű (1-10%) EGFR-expresszió. Az anti-EGFR antitest, a cetuximab colorectalis rákban történő alkalmazásának feltétele legalább 1% EGFR-t expresszáló daganatsejt jelenléte a tu-morban. A tüdőrák EGFR tirozinkináz-gátló Tar-ceva kezelésének indikációja pedig a tumorban lévő daganatsejtek több mint 10%-ának EGFR-pozitivitása. Ez az alacsony target-szint vagy diag-nosztikus határ meglehetősen ellentétben áll egy másik célzott terápia esetében meghatározott di-agnosztikus határértékkel, amit az anti-HER2 an-titest-terápia esetén alkalmaznak emlőrák eseté-ben. Ennek előfeltétele az intenzív HER2 prote-in-expresszió (++, +++ intenzitás Hercept Test felhasználásával, ill. a HER2 gén amplifiká-ciójának kimutatása).

A klinikusok kezdeti lelkesedése az ún. cél-zott terápiák alkalmazásával jelentősen csökkent, amikor olyan klinikai vizsgálatok eredményei lát-tak napvilágot, amelyek esetében nem lehetett egyértelműen összekapcsolni a terápia sikeressé-gét, hatékonyságát a daganatban lévő célfehérje kimutatásával (immunhisztokémia esetében) (14). Bár számtalan lehetséges magyarázat van ezen ellentmondásra, amelyek között az egyik a használt szer többszörös célzási képessége, az egyik legvalószínűbb oka az ellenmondásnak a célpont kimutatásában rejlő problémák. Az EGFR proteinek daganatokban történő kimutatásának széles körben alkalmazott módszerei és diagnosztikus kitéjei ismertek. E kitek között a leggyakrab-ban használt az EGFR pharmDx™ (11), a Confirm (12), és a 31g7 anti-EGFR-antitest (17). Ezek kö-zül az EGFR pharmDx™ rendelkezik FDA-enge-déllyel, amely természetesen csak az Egyesült Államokbeli alkalmazásának kötelező feltétele. Európában ilyen restrikciónak nincsenek, bárme-lyik validált módszert használni lehet. Miután a diagnosztikus eljárás arra irányul, hogy azt a be-tegcsoportot definiálja pontosan, amely nem ré-szesülhet ezen új és költséges terápiában, nagyon fontos az egyes alkalmazott immunhisztokémiai protokollok érzékenységének meghatározása. Is-merve azt a tényt, hogy a diagnosztikus EGFR-meghatározási protokollok mennyire függenek az adott tumorszövet fixálási, beágyazási körülmé-nyeitől, felmerült annak a lehetősége, hogy a „kő-bevételt” protokollok finom módosítása megvál-toztathatja e kitek érzékenységét, pozitív vagy negatív irányba. Hogy ezt a feltételezést igazol-juk, egy nagyobb tüdő-adenocarcinoma anyagon (50 eset) megvizsgáltuk a legszélesebb körben al-kalmazott EGFR-kimutatási kit, a pharmDx mű-ködését, különböző protokollmódosítások esetén (9). Az 50 adenocarcinomás eset közül 8 EGFR-negatívnak bizonyult az alap diagnosztikus proto-

koll alkalmazásával (EGFR pharmDx). Megvizs-gáltuk, hogy az antigénfeltárási eljárás módosítá-sa befolyásolja-e a kit működését, és azt találtuk, hogy ritkán, de ez az eljárás is egy negatív daga-nat esetében pozitív EGFR-expresszióhoz veze-tett, amelynek mértéke elérte azt a szintet (na-gyobb mint 10%), amely az adott beteg kezelésé-nek feltétele. Az esetek többségében azonban (8-ból 7 eset) az antigénfeltárási protokoll megvál-toztatása, ami a proteázzal szemben mikrohullá-mú feltárást jelent, nem változtatta meg a diag-nosztika eredményeit. Az eredeti pharmDx kit protokolljának egy másik lépését is megváltoztat-ta, amikor a primer antitesttel történő inkubáció idejét egy éjszakán át 4°C-on történő inkubációvá hosszabbítottuk, azt találtuk, hogy a 8 korábban negatívnak bizonyult EGFR-meghatározás vagy tumor közül 4 esetében több mint 10%-os EGFR-pozitivitást kaptunk (9), ezek között 20-50%-os intenzitásszintek is megjelentek. Ez az eredmény arra utalt, hogy a fixálási procedúra során károsod-tott antigénepitópok kimutatási sikere a primer antitesttel történő inkubáció hosszával jelentő-sen javítható. Amikor a mikrohullámú feltárást kombináltuk a primer antitesttel történő inkubá-lás hosszának változtatásával, ez a pozitív-negatív konverziós arány tovább már nem változott.

Eredményeink azt mutatják, hogy a diagnosztikában használt és egyes országokban standard-dá nemesített protokollokat az adott laboratóri-um fixálási, beágyazási sajátosságainak megfele-lően finoman kell hangolni, miután a betegek ke-zelésének meghatározásához elengedhetetlenül szükséges a megbízható EGFR-diagnosztika.

A pharmDx kit mellett hasonló vizsgálatokat vé-geztünk a Confirm kittel is, amely a korábbi vizsgá-latokban az egyik legérzékenyebb EGFR-kimutatási módszernek bizonyult (19). A vizsgálatban ugyanazt a 8, pharmDx kittel negatív tüdő-adenocarcinómát használtuk, amelyen a pharmDx™ protokolljának a módosításait is teszteltük. A korábbi összehasonlító-si tesztekben a pharmDx™, a Zymed és a Confirm, ill. az eljárások EGFR-kimutatási sikere nem az in-tenzív EGFR-expressziót mutató tumorok esetében volt eltérő, hanem a negatív, vagy gyengén pozitív tumorok esetében, amely felvetette annak lehetősé-gét, hogy pont a megfelelő betegcsoport kizárásának érzékenysége eltérő az egyes kitek alkalmazása ese-tén. Ezen 8, eredetileg EGFR-negatívnak bizonyult

	PharmDx™	Confirm
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	+
5	-	+
6	-	-
7	-	-
8	-	+
összesen	0/8	3/8

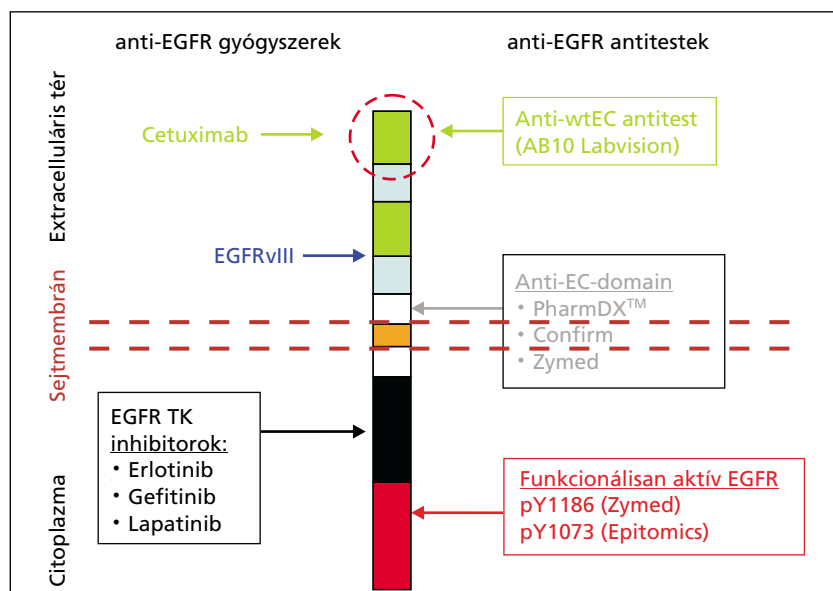
1. táblázat.
EGFR protein
kimutatása tüdő-
adenocarcinómákban
immunhisztokémiai
módszerrel

tüdő-adenocarcinoma újra tesztelése a Confirm módszerrel a 3 tumor esetében igazolt 10%-nál nagyobb EGFR-expressziós szintet (1. táblázat).

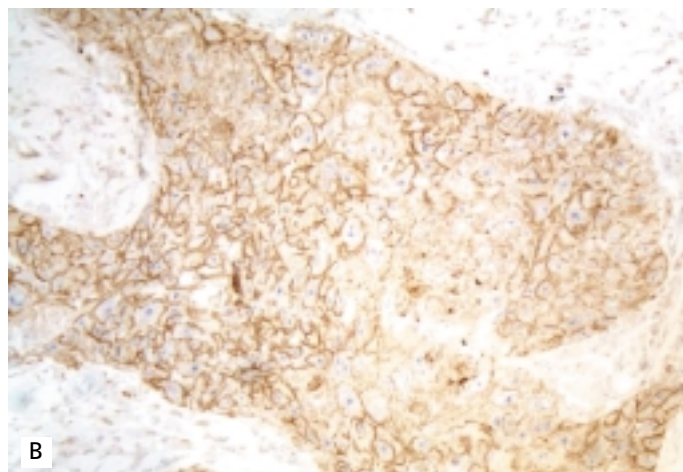
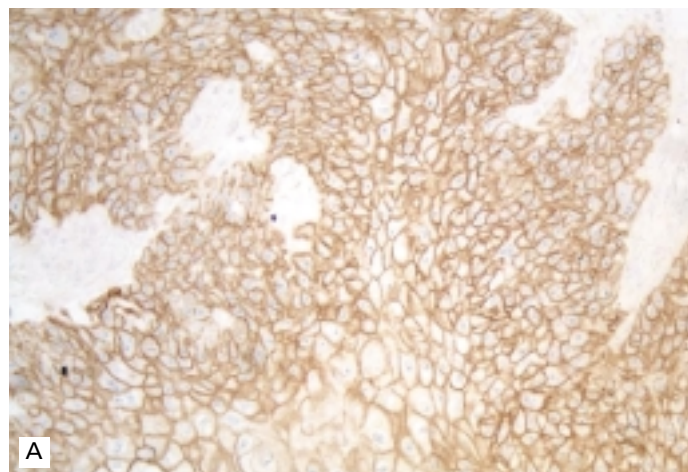
2. táblázat. Antigénfeltárás szerepe az EGFR protein immunhisztokémiai kimutatásában tüdő-adenocarcinómában Confirm kit esetében

	proteáz-K		mikrohullám	
	intenzitás	%	intenzitás	%
1	1+	10	1+	50
2	0	0	2+	100
3	1+	30	1+	90
4	3+	100	3+	100
5	0	0	0	0
egyezés	4/5	2/5		

6. ábra. Az EGFR fehérje szerkezete és immunológiai kimutatásának lehetséges módjai



7. ábra. Az EGFR membrán-közeli (pharmDx™) és ligand-kötő (Labvision) szakaszainak immunhisztokémiai kimutatása fej-nyaki laphámrákban. A: pharmDx™ reakció. A daganatsejtekben közel 100%-ban intenzív, folyamatos membránpozitivitás (+++). B: Labvision reakció. A daganatsejtek többségének membránjában intenzív, folyamatos membránjelölődés (+++). Feltűnő a sok EGFR-membránreakciót nem mutató daganatsejt.



A Confirm kit esetében is megvizsgáltuk, hogy az eredetileg alkalmazott antigénfeltárási eljárás (a proteáz-K lecserélése mikrohullámú feltárássra) befolyásolja-e az eljárás érzékenységét. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a 8, pharmDx kittel negatív EGFR-expressziót mutató tumor közül azon 4 esetében, amelynél pozitív reakciót lehetett protokollmódosítással elérni, a mikrohullámú antigénfeltárási eljárás jelentősen megváltoztatja az EGFR-kimutatás sikerességét. Az esetek többségében a mikrohullámú feltárási eljárás jelentős pozitívításfokozódást jelzett a daganatszövetben, amely a 10%-os szintről 50%-os, sőt egyes esetekben 100%-os szintig fokozta a tumorsejtek pozitivitását, ugyanakkor a reakció intenzitását nem befolyásolta (2. táblázat). Ezek a vizsgálatok is arra utalnak, hogy az EGF-receptor kimutatásának immunhisztokémiai módszereit nem szabad szigorúan alkalmazni, legalábbis hazai viszonyaink között. A protokoll sajátosságai csak a gyárilag alkalmazott pozitív kontrollokon működnek a forgalmazó által megadott minőségi keretek között, és amennyiben a fixálási és beágyazási „anamnézise” nem ismert pontosan a mintának, a kapott negatív reakciókat óvatosan kell kezelni és vagy az adott protokoll finomhangolásával kell meggyőződni, hogy ez ténylegesen negativitást jelent, vagy másik alternatív módszerrel is le kell ellenőrizni a reakció negativitását. A diagnosztikus eljárás tétje nem kevesebb, mint az, hogy pl. az adott tüdőrákos beteg a célzott terápiában részesülhet-e vagy sem.

Az EGFR-t célzó terápiák másik sikertörténete a vastagbélrák kezelésére, amely esetben monoklonális antitestterápiát alkalmaznak (cetuximab) (14). Az immunhisztokémiai kimutatás ellenmondásossága oly mértékű, hogy egyes, vastagbélrákon folytatott klinikai vizsgálatok során már nem követelték meg az EGFR-protein jelenlétét a betegek beválasztási kritériumaként (4), más részről klinikai vizsgálatok azt igazolták, hogy az EGFR-t célzó antitestterápia olyan esetekben is klinikai válaszhoz vezetett, ahol im-

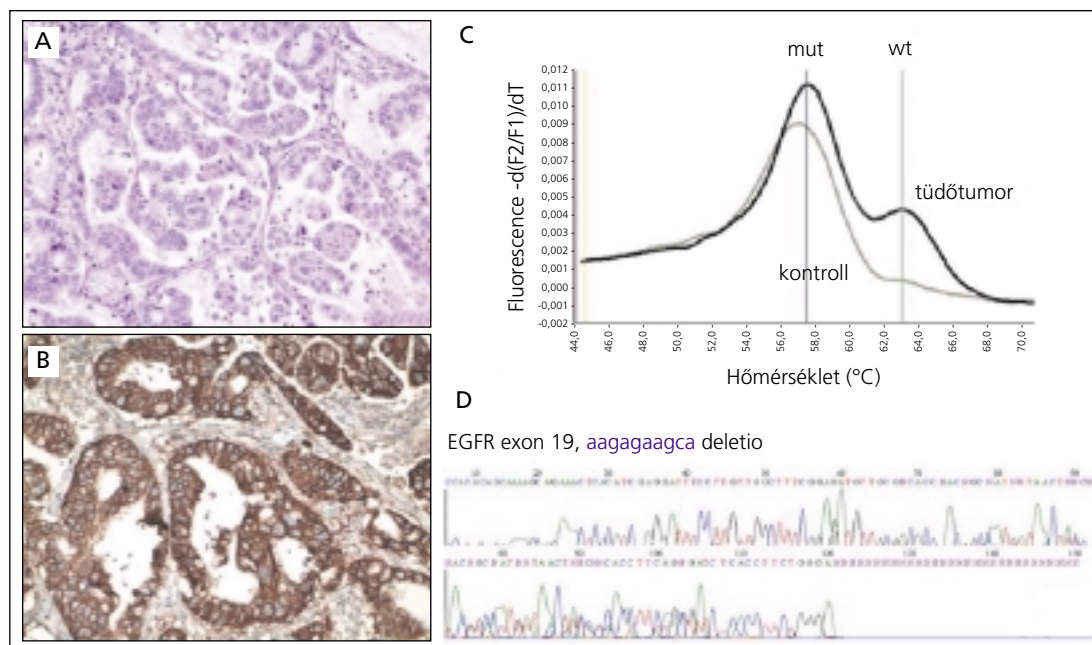
munhisztokémiával EGFR-negatívnak diagnosztizálták az adott beteg vastagbélrákját (5). Az elentmondás hátterében sok minden állhat. Az egyik magyarázat lehet az, hogy a vastagbélrákok EGFR-antitestterápiája esetében nem feltétlenül csak a daganatsejtek képezhetik a célpontot. Újabb vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a daganatok által indukált neoangiogenezis során a tumorban és a tumor körül lévő kiserek EGFR-t expresszálnak, és ez az EGFR jelátviteli szempontból is aktív (1). Ez esetben tehát egy EGFR-negatív tumor esetében antiangiogenikus gyógyszerként viselkedhet az anti-EGFR-terápia.

Egy másik lehetséges magyarázat, és a magunk részéről ezt inkább támogatjuk, hogy az immunhisztokémiai detekciós módszer elégtelen. Ennek oka a korábban bemutatott metodikai tanulmányok tanulságaiból vezethető le. Az immunhisztokémiai reakció nem elég érzékeny, vagy finomhangolása nem történik meg az adott minta igényeinek megfelelően. Egy harmadik magyarázat is felmerül azonban. Az EGF-receptor 3 doménből áll, egy nagy extracelluláris doménből, amelyben két szakasz is az ún. ligandkötő szakasz, amelyek közül az egyik az, amelyet az EGFR-antitestterápia, a cetuximab is céloz. A receptornak van egy transzmembrán szakasza, és egy citoplazmatikus része. A citoplazmatikus szakasz két részből áll, egy ún. kináz doménből, és az ezt követő szakaszból, ahol azok a foszforilációs helyek találhatóak, amelyek a receptor biológiai működéséhez elengedhetetlenül szükségesek (6. ábra). (Ez esetben egy olyan kinázzal állunk szemben, amely magát az EGFR protein citoplazmatikus részét foszforilálja, ún. autofoszforiláció révén.) Tehát, ha a receptor aktív, akkor legalább egy foszforilációs helyen foszforilált formában kell lennie az adott aminosavnak az EGFR fehérjeláncban.

Felmerült annak a lehetősége, hogy a vastagbélrákok egy részében olyan EGFR protein expresszáldik, amelynek a külső extracelluláris sza-

kaszból hiányzik az a rész, amelyiket a cetuximab és/vagy a diagnosztikus eljárás során alkalmazott antitest vagy antitestek ismernek fel. Ebből a szempontból tanulságos, hogy a leggyakrabban használt három kit esetében (pharmDx™, Confirm és a Zymed kit) az antitestek mind az EGFR membránközeli régióját detektálják, és egyik sem ad arra választ, hogy az EGFR-protein csonkolt formája expresszáldik-e a tumorban. Tudni kell ehhez azt, hogy az EGFR génje polimorf, normális körülmények között alternatív formában is megjelenhet. Ezen alternatív forma leggyakoribb verziója az ún. v3-verzió, amelyből hiányzik mindkét extracelluláris ligandkötő szakasz.

Az anti-EGFR-antitestterápia szempontjából ideális az volna, ha az EGFR-nek azt a szakaszát ismernék fel a felhasznált antitestek, ahol a terápiás antitest az EGFR-hez kötődik. Ilyen antitestek a kereskedelmi forgalomban léteznek, azonban ezeket nem tesztelték korábban patológiai diagnosztika szempontjából. Saját megfigyeléseink szerint az AB-10 antitest-klón (Labvision) paraffinos mintán megfelelő megbízhatósággal mutatja ki az EGFR-ligandkötő szakaszát (7. ábra). A reakció intenzitása az esetek döntő többségében messze alatta marad az EGFR-diagnosztikában használt protokollokkal kimutatott intenzitásnak, és az EGFR-pozitív daganatsejtek aránya is alacsonyabb. Számos esetben azonban teljes átfedést észleltünk tüdőrákok, vastagbélrákok, vagy fejnyaki daganatok esetében a standard kit és az AB-10 antitest alkalmazásakor. E megfigyelések arra irányítják a figyelmet, hogy az EGFR-diagnosztikát sokkal nagyobb körültekintéssel kell végezni, mintsem egyszerűen követni az ún. gyári kitekben meghatározott protokollokat, hiszen a beteg kezelésének megválasztásához a diagnosztikának a legpontosabb információkat kell biztosítania. Egy daganat EGFR-pozitivitása nem attól függ, hogy az adott diagnosztikai eljárás milyen sikeres, hanem attól, hogy az EGFR-protein megfelelő szinten expresszáldik-e a tumorban. Eb-



8. ábra.

A: 50 éves nő bal felső tüdőlebenyében 5 cm átmérőjű, a pleurát is elérő, egy hílusi nyirokcsomóban áttétet adó tüdő-adenocarcinoma. B: A daganatban az EGFR fehérje kifejezett membránexpressziója látható. C: Valósídejű PCR és olvadáspontanalízis segítségével az EGFR gén 19. exonjának mutációját találtuk, ami szekvencia-analízissel kis delécióknak bizonyult (D panel).

ből a szempontból célszerű átgondolni a diagnosztikus stratégiát, és minden olyan esetben, ahol EGFR-negativitást diagnosztizálnak, meg kell győződni arról, hogy az EGFR hiánya nem metodikai okból áll fenn, hanem valódi EGFR-protein-negativitást vagy igen alacsony szintű expressziót jelent.

Az epidermális növekedési faktor receptora gyakran mutáció következtében aktivált nem-kis-sejtes tüdőrákokban. A tirozinkináz domén 19. vagy 21. exonjának génavivációt okozó mutációja gyakorlatilag csak a tüdő adenocarcinomáiban fordul elő és kifejezetten érzékennyé teszi a tumort a tirozinkináz-gátló gefitinib (Iressa) vagy erlotinib (Tarceva) kezelésre (15) (8. ábra). A 20. exon mutációja e kezelésekkel szembeni rezisztenciát okoz.

Konklúziók

Számos olyan molekuláris technika került kifejlesztésre, amelyek a klinikumban is alkalmazhatók és ezzel a molekuláris diagnosztika a patológia integráns részévé vált. A humán papillomavírus-fertőzés, a génmutációk, a génamplifikációk, a fúziós gének vagy a mikroszatellita-instabilitás kimutatása nemcsak segíti a nehéz citológiai vagy szövettani diagnózist, hanem hozzá is járul a terápiás döntésekhez az onkológiában. Így a c-kit- vagy EGFR-mutációk kimutatása a GIST illetve nem kis-sejtes tüdőrák esetén a rutin patológiai diagnosztikának része kell, hogy legyen ahhoz, hogy az ilyen betegek megfelelő terápiában részesülhessenek.

Irodalom

- Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR inhibitors. *Cancer Res* 66:2173-2180, 2006
- Barr FG, Galili N, Holick J, et al. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the pediatric solid tumor alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 3:113-117, 1993
- Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 23:2445-2459, 2005
- Bunn PA Jr, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, et al. Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 12:3652-3656, 2006
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23:1803-1810, 2005
- Cserni G, Kálmán E, Kulka J, et al. HER2 immunohistochemical investigations in breast cancer. *Magyar Onkológia* 51:23-31, 2007
- Damin APS, Karam R, Zettler CG, et al. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 84:131-134, 2004
- Davis RJ, D'Cruz CN, Lovell MA, et al. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 54:2869-2872, 1993
- Derecskei K, Moldvay J, Bogos K, Timár J. Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDx™ in paraffin-embedded cancer tissues. *Pathol Oncol Res* 12:243-246, 2006
- dos Santos NR, de Bruijn DR, Belemans M, et al. Nuclear localization of SYT, SSX and the synovial sarcoma associated SYT-SSX fusion protein. *Hum Mol Genet* 6:1549-1558, 1997
- <http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs>
- <http://www.ventanamed.com/catalog/antibody>
- Melegh Z, Bálint I, Nagy K, et al. Detection of N-myc gene amplification in neuroblastoma by comparative, in situ and real-time polymerase chain reaction. *Pediatric Pathol Molec Med* 22:1-10, 2003
- Meropol NJ. Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: it's time to get back on target. *J Clin Oncol* 23:1791-1793, 2005
- Paez JG, Janne P A, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500, 2004
- Pfeifer JD. Molecular genetic testing in surgical pathology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2006, pp. 312-313
- Pii K, Andersen FG, Jensen S, Spaulding B. Characterization of a new monoclonal antibody, clone 2-18C9, for the measurement of epidermal growth factor receptor expression in solid tumor. *Proc. 95th AACR, Abstr #5029*, 2004
- Qian X, Jin L, Shearer BM, et al. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 14:23-28, 2005
- Renault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncol Rep* 16:1173-1179, 2006
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247-257, 2003
- Stewart BW, Kleihues P (eds.). *World Cancer Report*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Press, Lyon 2003, pp. 56-61
- Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: clinicopathological correlations. *Cancer Metast Rev* 24:19-34, 2005