

Molekuláris morfológiai módszerek a laboratóriumi medicinában

Balázs Margit
Ádány Róza

MOLECULAR MORPHOLOGICAL METHODS IN LABORATORY MEDICINE

Today, the increasing technical arsenal of molecular morphology has not only methodological importance, but also a revolutionary role in diagnostic laboratory medicine. Techniques previously used only in basic research have become widespread in routine diagnostics by now. The development of methodology for detection of genetic alterations has enabled laboratory tests not only to define disease associated pathobiochemical alterations, but also to identify the genetic background of diseases as well. Evolution of these methods caused qualitative changes not only in detection of disease specific alterations, but also in revealing increased individual susceptibility (sometimes at population level) indicating genetic predisposition to the disease.

Recently, the classical methodology based on genetic microscopic morphology has been gradually supplemented or even replaced by different *in situ* hybridization techniques in many laboratories. Using these techniques chromosomal alterations in cells and tissues (including tumor cells) can be detected within one day (or maximum 1-2 days) without *in vitro* manipulation of cells. These improved techniques allow us to monitor chromosomal changes after the treatment of genetic diseases or define these alterations induced by environmental exposures.

Correspondence:
Róza Ádány, MD

University of Debrecen, Medical and Health
Science Center,
School of Public Health Department of
Preventive Medicine,
4032 Debrecen Nagyerdei Krt. 98. Hungary

***in situ* hybridization,
molecular cytogenetics, tumor progression,
genetic markers,
comparative genomic hybridization**

Napjainkban a molekuláris morfológiai módszerek térhódítása a laboratóriumi medicinában nem pusztán a módszertani újdonság erejével hat, de diagnosztikai szinten is forradalmi változást jelent. Mára a rutindiagnosztikában is szinte mindennaposá váltak azok a technikák, amelyeket korábban csak az alap kutatásban alkalmaztak. A genetikai változások kimutatását célzó módszertan fejlődése oda vezetett, hogy a laboratóriumi diagnosztika nemcsak a betegségekhez társuló, a betegségre általában nem specifikus patobiokémiai történéseket, illetve az ezek következtében kialakult elváltozásokat tárja fel, de a betegség hátterében álló genetikai elváltozás(ok) azonosításával esetenként oki diagnózis felállítására is képes. Minőségi változást jelent, hogy az egyre tökéletesedő módszerekkel nemcsak a betegség-specifikus eltérések, hanem a betegség iránti fokozott egyéni (esetenként populációs szintű) fogékonyság, azaz az adott betegségre nézve a genetikailag meghatározott veszélyeztetettség is kimutatható.

A klasszikus genetikai mikroszkópos morfológiai módszertant, a citogenetikát számos laboratóriumban ma már egyre inkább kiegészítik, sőt egyes esetekben felváltják a különböző *in situ* hibridizációs technikák. Ezekkel a módszerekkel sejtek és szövetek (köztük tumorok) kromoszomális szintű vizsgálata valósítható meg akár egy (de legfeljebb néhány) napon belül, anélkül, hogy a sejteket mesterséges körülmények között tenyészténénk/manipulálnánk, és így az eredeti genetikai eltéréseket esetleg megváltoztatnánk. Lehetőség nyílik a genetikai betegségek terápiát követő monitorozására, illetve a környezeti expozíció által indukált kromoszomális eltérések gyors kimutatására is.

Levelezési cím:

dr. Ádány Róza
Debreceni Egyetem, Orvos- és
Egészségtudományi Centrum,
Népegészségügyi Iskola
Megelőző Orvostani Intézet,
4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

***in situ* hibridizáció,
molekuláris citogenetika, tumorprogresszió,
genetikai markerek,
komparatív genomális hibridizáció**

Molekuláris morfológiai módszerek alatt azon eljárásokat értjük, amelyekkel a DNS-struktúra, s ezáltal a genetikai kód változásait mikroszkópos morfológiai módszerekkel azonosítjuk/vizualizáljuk. A genetikai betegségekkel társuló kromoszomális eltérések kimutatására rendelkezésre álló módszerek közül kiemelkedő jelentőségű a fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) és a komparatív genomális hibridizáció (CGH).

Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

A sejt- és kromoszómaszintű *in situ* hibridizációs módszer több mint negyedszázados múltra tekint vissza (1). Az eltelt idő alatt mind a kísérleti protokollok, mind az alkalmazott DNS-specifikus próbák sok szempontból átalakultak és tökéletesedtek. A kezdeti radioaktív jelölési eljárásokat az abszorpciós és fluoreszcens detektálási módszerek váltották fel. A jelenleg forgalomban lévő DNS-specifikus próbákkal a diagnosztikus és prognosztikus jelentőségű genetikai rendellenességek az – akár többhetes – kariotipizálási eljárásnál lényegesen rövidebb idő alatt (1–24 óra) mutathatók ki, a módszer független a tumorsejtek proliferációs hajlamától, a genetikai analízis az interfázisban lévő sejteken is megvalósítható. Jelenleg a FISH alkalmazása igen széles körű; fontos szerepet tölt be a kromoszomális rendellenességek kimutatásánál, alkalmazzák a géntérképezésnél, genetikai betegségek diagnózisánál, radioaktív sugárzás által előidézett genetikai károsodások kimutatásánál, valamint a kromatin organizációjának és struktúrájának tanulmányozásánál.

A FISH alapját a DNS azon tulajdonsága képezi, hogy a dupla szálú DNS-molekula szerkezete megfelelő körülmények között megbomlik (DNS-denaturáció), a meglazult kötések miatt a kettős spirál szétválik, ezáltal az egyszálú DNS hozzáférhetővé válik az ugyancsak denaturált, fluoreszcens festékkel jelzett DNS-próbák számára. Ezek a DNS-próbák a genom egy-egy kis szakaszát jelenítik meg. A target-DNS nemcsak tárgylemezre fixált kromoszómapreparátum lehet, de interfázisban lévő sejtek magjai, vagy akár szöveti metszetekben lévő sejtek magjai is. A DNS-próba (a magyar szakirodalomban DNS-szondaként is említik) jelzése fluoreszcensen módosított dUTP-vel történik, jelzetlen dNTP-k, DNA-áz I- és polimeráz I-enzimek jelenlétében, megfelelő reakciókörülmények biztosítása mellett. A detektálás érzékenységét számos amplifikációs módszer segíti, beleértve a biotin-avidin és a peroxidáz alapú tiramid amplifikálási módszereket.

Az 1. ábra a FISH leglényegesebb lépéseit szemlélteti. A 2. ábra a FISH gyakorlati alkalmazására mutat be példát. Metafázisban lévő, normál periféri-

ás lymphocyták kromoszómáin a DNS-specifikus próbák kötődését kromoszómánként egy-egy fluoreszkáló pont jelzi (2. a. ábra), míg az interfázisos normál sejtmagokban a diploid kromoszómaszámuk megfelelően két fluoreszcens szignál jelenik meg (2. b. ábra).

A DNS-specifikus próbák típusai

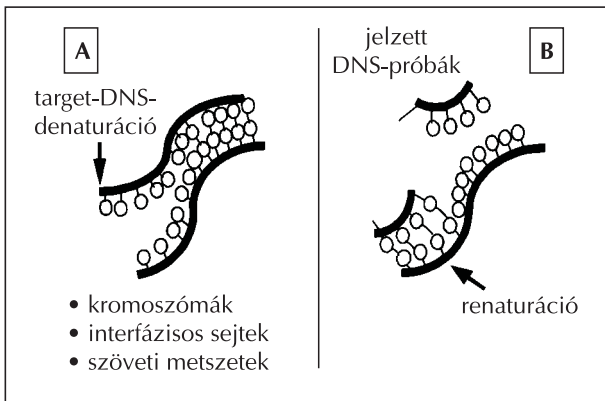
A kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatására centroméraspecifikus és kromoszómafestő DNS-próbák, míg a strukturális eltérések detektálására a kromoszómát festő, a génspecifikus, valamint a töréspont-specifikus próbák alkalmasak (2). A centroméraspecifikus DNS-próbák voltak az első FISH-próbák, amelyekkel a kromoszómák számbeli eltéréseit mutatták ki interfázisos tumorsejtekben (3–5). Jellegzetességük, hogy a kromoszómák heterokromatinjához (sokszorososan, tandem ismétlődő szekvenciákhoz) hibridizálódva nagyméretű fluoreszcens szignált szolgáltatnak, így az eltérések mikroszkóppal könnyen megfigyelhetők (6).

A kromoszómák számbeli eltérése gyakori jelenség mind a hematológiai, mind a szolid tumorok esetében. Példaként a gliomák és malignus melanomák jelentős hányadára karakterisztikus, a 10-es kromoszóma teljes vagy részleges deletióját említhetjük, a részleges deletiók sok esetben az ugyanazon kromoszómára lokalizálódó, többszörös tumorszuppresszor gének alterációival társulnak (7, 8). Klinikopatológiai és citogenetikai adatok összevetése során figyeltek fel arra, hogy több tumortípus – prostatatumor, krónikus myeloid leukaemia, emlőcarcinoma, malignus melanoma stb. – esetében rossz prognózissal társul a 8-as kromoszóma aneuploidiaja (9, 10). A 3. ábra interfázisos melanomasejteken szemlélteti a 8-as centroméra hibridizációját követően a tumorsejtekre jellemző aneuploidiait.

A kromoszomális aneuploidiaakra további példa a 7-es kromoszóma papillaris vesecarcinomákban jelentkező többlete; ez az eltérés bizonyítottan mutáns *met* onkogén jelenlétével társul (11). A hematológiai betegségek diagnózisában a FISH gyors rutindiagnosztikai eljárássá válhat, hiszen a különböző myeloid betegségekre jellemző 7-es monoszómia vagy 8-as triszómia, továbbá a krónikus myeloid leukaemiákban gyakran jelentkező 12-es triszómia gyorsan és biztonságosan kimutatható FISH-sel (12, 13).

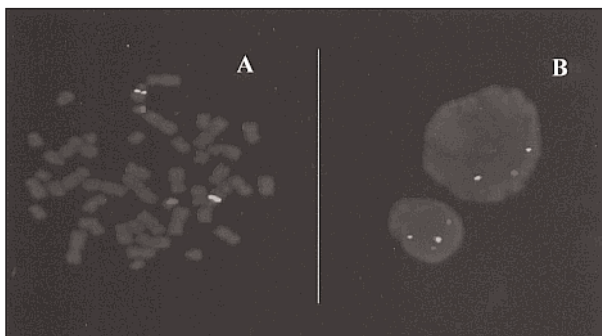
A tumordiagnosztika mellett a prenatális diagnosztika az a terület, ahol a számbeli eltéréseket kimutató FISH fontos szerepet

dr. Balázs Margit,
dr. Ádány Róza:
Debreceni Egyetem Orvos-
és Egészségtudományi
Centrum, Népegészségügyi
Iskola, Megelőző Orvostani
Intézet, Debrecen.
Érkezett: 2001. február 28.
Elfogadva: 2001. április 26.



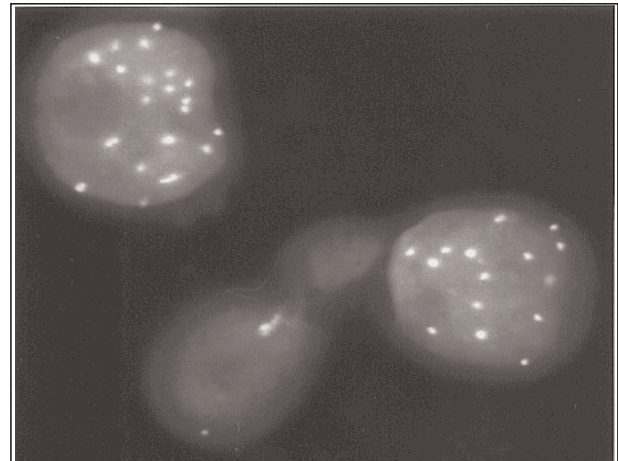
1. ábra. A fluoreszcencia in situ hibridizáció sematikus ábrázolása. a. A dupla szálú DNS-molekula megfelelő denaturálási hőmérsékleten egyszálúvá alakul át. b. A denaturált target-DNS az ugyancsak denaturált, kémiaiailag módosított DNS-próbával a renaturációs hőmérsékleten hibridizálódik. A fluoreszcensen jelzett, hibridizálódott DNS-próba, s ezáltal az általa jelzett normál- vagy károsodott DNS-szakasz a mikroszkóp alatt láthatóvá válik

kaphat, hisz ma már több laboratóriumban is diagnosztikai módszerként alkalmazzák (14, 15). Intézetünk is részt vett abban a nemzetközi, multicentrikus vizsgálatban, amelynek célja a Vysis cég (USA) által összeállított prenatális kit kipróbálása volt klinikai mintákon, valamint alkalmazhatóságának tesztelése interfázisos amniocytákon. A 13., 18., 21. X és Y kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatását szolgáló prenatális kitet 1998 óta forgalmazzák. A diagnózis az amniocentesist követően 24 órán belül felállítható FISH végzésével, s a vizsgálat-hoz mindössze néhány milliliter magzatvíz (illetve belőle nyerhető sejtpopuláció) elegendő (4. ábra).



2. ábra. FISH két különböző DNS-próbával, normális perifériás lymphocytákban. A piros fluoreszcens pontok a 21-es kromoszóma 21q22.3 szakaszára, míg a zöld pontok a 13-as kromoszóma 13q14 szakaszára specifikus próba hibridizációját jelzik metafázisos (a) és interfázisos magokban (b). A FISH normál diploid kromoszómaszámnak megfelelően két piros és két zöld fluoreszcens szignált eredményez. A kék szín a DNS-t festő DAPI fluoreszcenciájától származik.

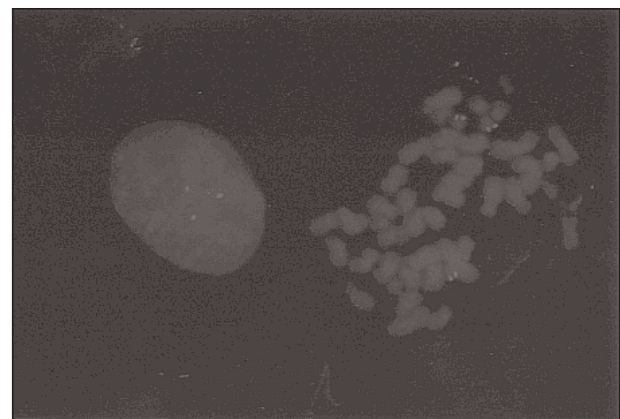
DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol



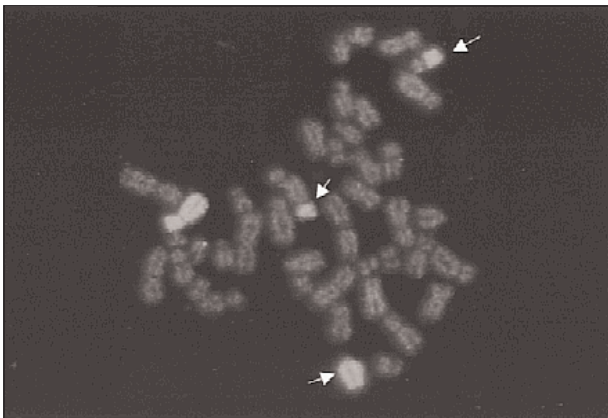
3. ábra. FISH 8-as kromoszóma centroméraspecifikus DNS-próbával interfázisos humán melanomasejteken. Az eredetileg zöld pontok a hibridizálódott 8-as kromoszóma centromerájának kópiaszámát jelölik. A sejtmag piros fluoreszcenciája (amely a próba zöld színét részlegesen elfedi) a DNS-szálak közé interkalálódó propidiumjodidtól származik

A kromoszómák számbeli eltéréseinek kimutatására szolgáló másik lehetőség a homológ kromoszómákat azonosan festő DNS-próbák alkalmazása (16). A teljes kromoszómát egyenletesen festő próbáknak az előzőekben leírt centroméraspecifikus próbákkal szemben az a hátrányuk, hogy csak kromoszómapreparátumokon alkalmazhatók; viszont nagy előnyt jelent, hogy segítségükkel az aneuploidia mellett a kromoszomális transzlokációk is detektálhatók, olyan kromoszómapreparátumokon is, amelyek sávozásos kariotípus-analízisre nem alkalmasak (5. ábra).

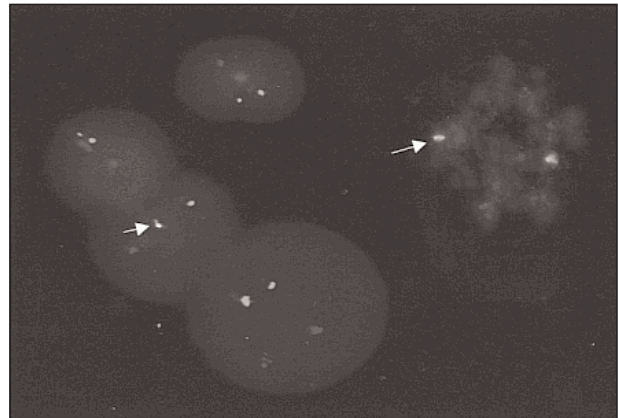
Néha a hibridizációs képből nehéz megállapítani,



4. ábra. A 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatása FISH-sel, interfázisos amniocytákban. A piros fluoreszcens pontok a SpectrumRed jelzett 21q22.3-szekvenciára specifikus DNS-próba hibridizációját jelzik. A triszómia Down-szindrómát igazol



5. ábra. Transzlokáció kimutatása 6-os kromoszómát festő DNS-próbával, melanomasejtekből származó kromoszómákon. Az ábrán két, eredetileg zöld színnel jelölt 6-os kromoszóma látható, a kromoszóma transzlokálódott szegmenseit nyilak jelölik

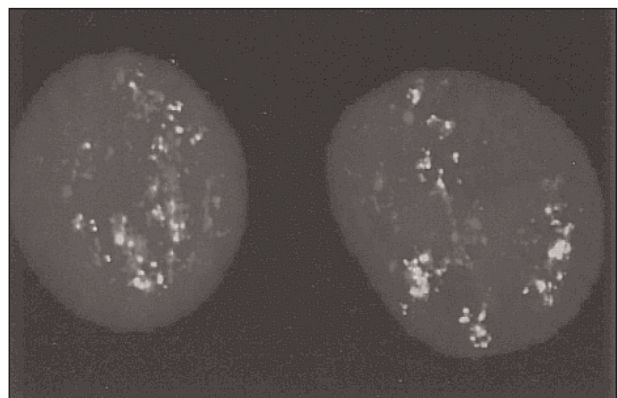


6. ábra. Ph1 kromoszóma kimutatása FISH-sel. CML-es betegből származó interfázisos sejtek hibridizációja 9q22 (zöld) és 22q11 (piros) DNS-szekvenca-specifikus próbákkal. A nyíl a két kromoszómaszegmens fúziója eredményeképpen létrejött Ph1 kromoszómára mutat, a szignálok fedettsége egyértelmű jele a transzlokációnak

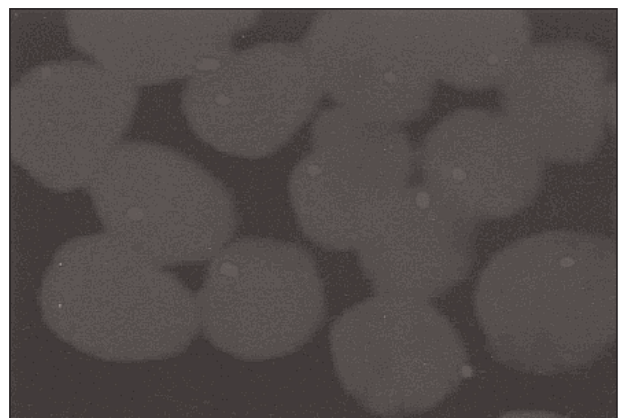
hogyan pontosan melyik kromoszómára történt az adott kromoszómaszegment(ek) transzlokációja, de több, különböző színű kromoszómafestő próba egyidejű hibridizációjával ez is megvalósítható. Ma már lehetőség nyílik mind a 46 humán kromoszóma 24 különböző színnel történő vizualizálására is (multiplex FISH). Ez a módszer komplex instrumentális háttérrel igényel, de segítségével a kromoszómális eltérések – a kromoszómák színkódja révén – könnyen azonosíthatók, s értékelhetővé válnak a klasszikus módszerrel fel nem ismerhető strukturális elváltozások is (17, 18).

Kromoszómális transzlokációk nemcsak kromoszómafestő próbákkal mutathatók ki, hanem olyan locus-specifikus próbákkal is, amelyek adott kromoszómák töréspontjára specifikusak. Az első ilyen töréspont-specifikus próba a Ph1 kromoszóma [*BCR/ABL*-fúzió, t(9;22) (q34;q11)] kimutatására szolgáló próba volt (19–21).

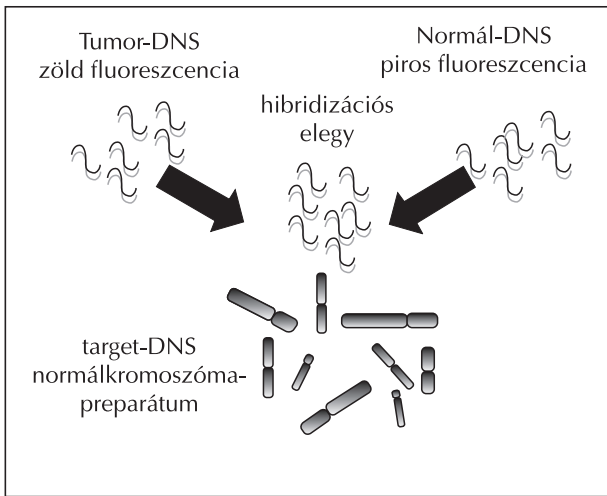
A Ph1 kromoszóma a 9-es (9q34) és a 22-es (22q11) kromoszómaszegmentek specifikus fúziójának eredményeképpen alakul ki. Amennyiben a 9q34-szekvenciára specifikus DNS-próbát zölden fluoreszkáló festékkel, a 22q11-szekvenciára specifikus DNS-próbát pirosan fluoreszkáló festékkel jelöljük, a hibridizációt követően a Ph1-negatív sejtekben két különálló piros és két különálló zöld fluoreszcens szignál jelenik meg. Abban az esetben viszont, ha a két kromoszómaszegmens eltört, majd a töréspontnál fuzionált, a fúzió eredményeképpen a piros és zöld szignálok szinte átfedésbe kerülnek egymással (6. ábra). Mivel FISH-sel egyetlen kísérlet során több száz sejt analizálható, ezért a mintában az eltérés akkor is kimutatható, ha ez a sejteknek csak néhány százalékát érinti, lehetőség nyílik tehát a korai diagnózisra, a kezelést köve-



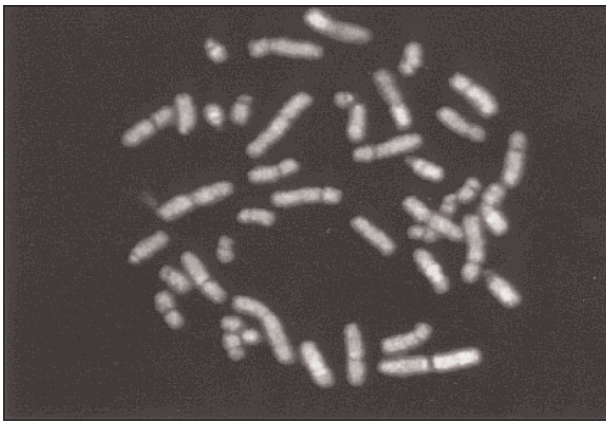
7. ábra. *ERBB2*-gén-amplifikáció kimutatása emlőtumorsejtekben, kettős FISH-sel. A piros szignálok a 17-es kromoszóma centroméráit, míg a zöld szín az *erbB-2* onkogént jelöli



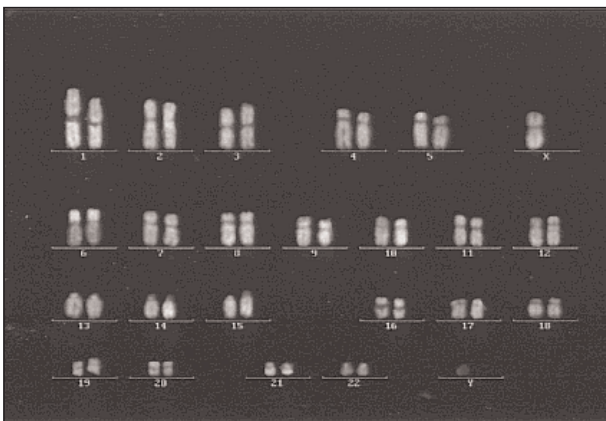
8. ábra. *RB1*-géndeletio kimutatása 13q14.2-specifikus DNS-próbával. A piros pontok a retinoblastoma-sejtekben jelen lévő *RB1*-gén kópiaszámát mutatják. Valamennyi sejtben az egyik *RB1*-gén deletiót szenvedett



9. ábra. A komparatív genomhibridizáció sematikus illusztrációja



10. ábra. Malignus melanomából származó DNS komparatív hibridizációja normálkromoszómákra. A nyilak a homológ 6-os kromoszómákon látható delesiót (piros nyíl), illetve amplifikációt jelölik (zöld nyíl)



11. ábra. Normál kromoszómák komparatív genomialis hibridizációt követő színes kariogramja

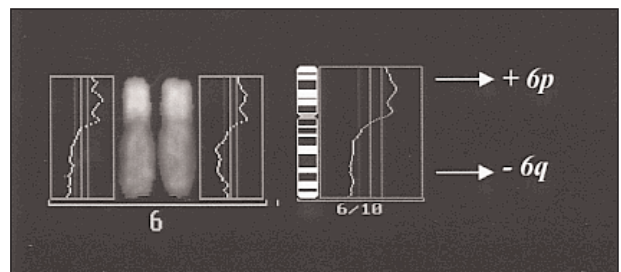
tő monitorozásra és a reziduális betegség kimutatására.

A *BCR/ABL*-füzió kimutatására szolgáló próbák mellett más betegségekre specifikus DNS-próbák is léteznek, ezek közül megemlítjük a DiGeorge-szindrómára és a Miller–Dieker-féle microdeletióra specifikus DNS-próbákat (22, 23).

A DNS-locus-specifikus próbák közül különös jelentőségűek az onkogének amplifikációját vagy a tumorszuppresszor gének delesióját megjelenítő próbák. Ezek közül az emlőtumorer progressziójával szoros kapcsolatban álló *ERBB2* (*HER2/neu*) gén amplifikációját detektáló génspecifikus próbát alkalmazzák a legerjedtebben (24–26). A génamplifikáció FISH-sel végzett kimutatása (7. ábra) patológiai mintákon nemcsak diagnosztikai, de terápiás szempontból is alapvető jelentőségű, hisz a génamplifikáció és a gyógyszer-rezisztencia között szoros asszociációt írtak le (27).

Interfázisos sejtekben a géndeletio is kimutatható (28). A FISH ilyen célú alkalmazásának klasszikus példája a retinoblastoma-gén delesiójának detektálása a 13q14.2 locusra specifikus próbával (8. ábra).

Mint említettük, a FISH csak ismert kromoszomális eltérések sejt szintű kimutatására alkalmas, tehát ezzel a módszerrel csak azok a kromoszomális eltérések analizálhatók, amelyekre specifikus DNS-próba rendelkezésre áll. A FISH módszertani alapjaira épülő komparatív genomhibridizáció (comparative genomic hybridization: CGH) módszer volt az első olyan molekuláris genetikai technika, amelynek segítségével nemcsak célzott szekvenciák tanulmányozhatók, hanem a tumor-genom egészében megjelenő genetikai eltérések átfogó analízise is megvalósítható. A CGH alkalmazásával nemcsak az ismert, hanem a más módszerek metodikai korlátjai miatt ki nem mutatható genetikai eltérések is elemezhetők (29).



12. ábra. Komparatív genomialis hibridizáció kromoszomaprofiljának értelmezése. a. A két homológ kromoszóma azonos zöld/piros intenzitáshányados-profil eredményez. A színes kromoszómák melletti függőleges vonalak jelentése: fehér: zöld/piros arány=1,0; zöld: z/p=1,2; piros: z/p=0,85. b. A sávozott 6-os kromoszóma mellett tíz homológ kromoszóma átlagolásával nyert profil látható

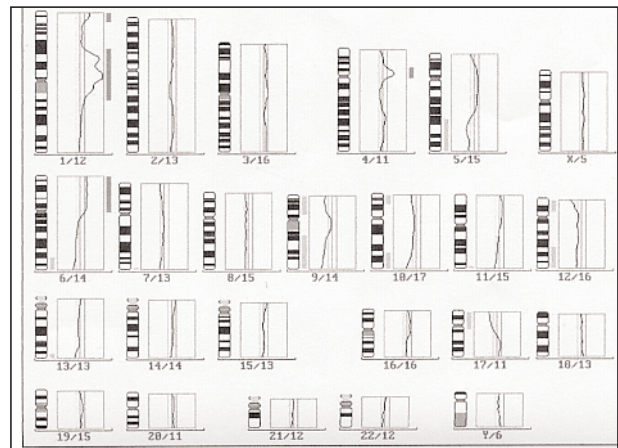
Komparatív genomiális hibridizáció

A CGH módszerével a tumorsejtek genomjában előforduló kromoszomális eltérésekről (DNS-amplifikációkról és -deletiókról) nyerünk információt (29). A kísérleti körülmények a FISH-hez hasonlóak, azzal a módosítással, hogy a jelzett DNS-próbákat a tumoros és normális sejtek teljes genomiális DNS-ei helyettesítik. A normális sejtekből származó genomiális DNS-referencia DNS-ként szolgál, a target-DNS minden esetben nem tumoros egyénből származó, tárgylemezen fixált kromoszómapreparátum. A 9. ábra sematikusan mutatja a CGH elvét. A tumorszövetből származó DNS-t zölden fluoreszkáló festékkel, míg a normális sejtekből származó DNS-t pirosan fluoreszkáló festékkel jelöljük meg. Ezt követően a jelzett DNS-ek 1:1 arányú keverékét, a FISH-hez hasonlóan, a normális kromoszómákat tartalmazó preparátumra hibridizáljuk.

A renaturáció során a fluoreszcensen jelzett normál- és tumor-DNS-fragmentek mennyiségüktől függő mértékben a normálkromoszómákhoz hibridizálódnak. Azokon a kromoszomális szakaszokon, amelyekben a normál- és tumor-DNS között nincs CGH-val detektálható genetikai különbség, a piros és a zöld csatornán detektált jelzések mikroszkópos egymásra vetítését követően narancssárga fluoreszcencia figyelhető meg. Ha a vizsgált tumor-DNS-ben egy adott DNS-szakaszon a normál-DNS-hez viszonyítva DNS-többlet van (például génamplifikáció miatt), akkor a targetkromoszóma megfelelő szakaszán – a zölden fluoreszkáló tumor-DNS-többlet kötődése miatt – erős zöld fluoreszcencia észlelhető; a tumor-DNS-ben lévő hiányra pedig a piros fluoreszcencia megjelenése utal (10. ábra).

A genetikai eltérések analízise és kromoszomális lokalizációjának meghatározása számítógép-vezérelt képanalízissel történik, amelynek első lépése a normálkromoszómák színes kariotípusának elkészítése (11. ábra). A következő lépésben a kromoszómák hossz tengelyére merőleges egyenes minden pontjához tartozó zöld/piros intenzitásarányokat határozzuk meg (12. ábra). Amennyiben a zöld-piros arány nagyobb mint 1,2, DNS-többlet (amplifikáció) áll fenn, ha kisebb mint 0,85, DNS-hiány (deletio) jellemzi a tumor-DNS meghatározott régióját. A kromoszómaprofil alapján jól megfigyelhető a 6p-amplifikáció és a 6q-deletio. A kromoszómaprofil mellett megjelenő sávozott kromoszóma segít a genetikai eltérések kromoszomális lokalizációjának meghatározásában. A 13. ábra a tumor teljes CGH-profilját mutatja be.

Az elmúlt évek kutatásai bebizonyították, hogy a komparatív genomiális hibridizáció a genetikai elté-



13. ábra. Humán malignus melanoma CGH-kromoszómaprofilja. A sávozott kromoszómák jobb oldalán látható merőleges vonal amplifikációt, a bal oldal deletiót jelöl

rések teljes humán genomot átfogó feltérképezése mellett az adott tumortípusra jellemző genetikai eltérések és a különböző klinikai paraméterek összehasonlítására is alkalmas (30–35). A módszer alkalmazásával jelentősen megnőtt mind a szolid, mind a hematológiai tumorok genetikai eltéréseire vonatkozó ismereteink mennyisége. A CGH-metodika – mint a genetikai eltérések átfogó analízisére alkalmas módszer – új utat nyitott a tumorok kialakulásában és progressziójában szerepet játszó celluláris onko- és más gének szerepének tanulmányozásában. Példaként említjük meg a prostatarákoknál az Xp11-13 locuson lokalizálódó amlikon CGH-val történt felfedezését, amely jelentős mértékben hozzájárult ahhoz, hogy magyarázatot kapjunk arra, ennél a daganatnál az androgén-depletiós kezelés miért nem tekinthető végleges terápiának (33). A különböző stádiumú tumorok genetikai eltéréseinek és klinikai paramétereinek összehasonlításával a tumor kialakulásával és progressziójával összefüggő eltéréseket ismerhetjük meg (30–32, 34). Az ugyanazon betegből származó primer és metasztatikus tumorpárok CGH-adatainak összehasonlításával a primer és a metasztatikus sejtek klonális kapcsolatát, valamint a tumorprogresszióval összefüggő genetikai eltéréseket tárhatjuk fel (32).

A FISH alkalmazása abban az értelemben mindig célzott, hogy specifikus DNS-próbákat alkalmazva adott elváltozás fennállására vagy hiányára kérdezzünk rá, tehát előzetes ismerettel vagy elképzeléssel kell rendelkezünk a kimutatni szándékozott genetikai eltérésről. A FISH elvén alapuló CGH-val a tumorgenomban jelen lévő genetikai eltérések azok előzetes ismerete nélkül is kimutathatók, s a két módszer együttes alkalmazásával akár betegség-specifikus új, korábban ismeretlen génelváltozások azonosíthatók.

IRODALOM

1. Pardue LM, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* 1969;168:1356-8.
2. Fox JL, Hsu PH, Legator MS, et al. Fluorescence in situ hybridization: powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin Chem* 1995;41(11):1554-9.
3. Balázs M, Mayall BH, Waldman FM. Interphase cytogenetics of a male breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;55(2):243-7.
4. Luke S, Shepelsky M. FISH: recent advances and diagnostic aspects. *Cell Vis* 1998;5(1):49-53.
5. van Dekken H, Pizzolo JG, Reuter VE, Melamed MR. Cytogenetic analysis of human solid tumours by in situ hybridization with a set of 12 chromosome specific DNA probes. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54(3-4):103-7.
6. Balázs M, Matsumura K, Moore D, et al. Karyotypic heterogeneity and its relation to labelling index in interphase breast tumor cells. *Cytometry* 1995;20(1):62-73.
7. Amalfitano G, Chatel M, Paquis P. Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;16(1):6-9.
8. Balázs M, Ádám Zs, Bégány Á, et al. Involvement of chromosome losses in the progression and metastasis formation of a human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109(2):114-8.
9. Takahashi S, Alcaraz A, Brown JA, et al. Aneuploidy of chromosomes 8 and Y detected by fluorescence in situ hybridization are prognostic markers for pathological stage C (pt3N0M0) prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996;2(1):137-45.
10. Afify A, Mark HF. Fluorescence in situ hybridization assessment of chromosome 8 copy number in stage I and stage II infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97(2):101-5.
11. Zhuang Z, Park WS, Pack S, et al. Trisomy 7 harbouring non random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1998;20(1):66-9.
12. Lempert C, Kafko M, Scalise A, et al. The value of interphase fluorescence in situ hybridization in the study of patients with lymphoproliferative disorders: further evidence for a higher sensitivity of detecting chromosomes 7 and 8 aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;105(2):193-7.
13. Esa A, Trakhtenbrot L, Hausmann M, et al. Fast FISH detection and semi automated image analysis of numerical chromosome aberrations in haematological malignancies. *Anal Cell Pathol* 1998;16(4):211-22.
14. Aviram G, Daniely M, Chaki R, et al. Advanced FISH with directly labeled X, Y and 18 DNA probes as a tool for rapid prenatal diagnosis. *J Reprod Med* 1999;44(6):497-503.
15. Liu J, Tsai YL, Zheng XZ, et al. Potential use of repeated fluorescence in situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 1998;70(4):729-33.
16. Carter NP, Ferguson Smith MA, et al. Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 1992;29(5):299-307.
17. Speicher MR, Gwyn J, Ballard S, et al. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12(4):368-75.
18. Zhang FF, Murata Collins JL, et al. Twenty four color spectral karyotyping reveals chromosome aberrations in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(3):318-28.
19. Tosi S, Cabot G, Giudici G, et al. Detection of the breakpoint cluster region ABL fusion in chronic myeloid leukaemia with variant Philadelphia chromosome translocations by in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;89(2):153-6.
20. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, et al. Detection of bcr/abl fusion in chronic myelogenous leukaemia by in situ hybridization. *Science* 1990;250(4980):559-62.
21. Thiele J, Schmitz B, Gross H, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) reveals that in chronic myelogenous leukaemia (CML) following interferon alpha therapy, normalization of megakaryocyte size is associated with the loss of bcr/abl translocation. *Histopathology* 1997;31(3):215-21.
22. Levy B, Dunn TM, Hirschhorn K, et al. Jumping translocations in spontaneous abortions. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88(12):25-9.
23. Sakamoto M, Ono J, Okada S, et al. Alteration of the LIS1 gene in Japanese patients with isolated lissencephaly sequence or Miller Dieker syndrome. *Hum Genet* 1998;103(5):586-9.
24. Isola J, Chu L, DeVries S, et al. Genetic alterations in ERBB2 amplified breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(12):4140-5.
25. Szöllösi J, Balázs M, Feuerstein BG, et al. ERBB2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER2 overexpression, and intratumour heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55(22):5400-10.
26. Ram TG, Schelling ME, Hosick HL. Blocking HER2/HER3 function with a dominant negative form of HER3 in cells stimulated by heregulin and in breast cancer cells with HER2 gene amplification. *Cell Growth Differ* 2000;11(3):173-83.
27. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, et al. Assessment of HER2 status in breast cancer, why, when and how? *Eur J Cancer* 2000;36(2):170-6.
28. Damjanovich J, Ádány R, Berta A, Balázs M. Mutation of the RB1 gene caused unilateral retinoblastoma in early age. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119(1):1-7.
29. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumours. *Science* 1992;258(5083):818-21.
30. Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, et al. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998;152(5):1107-23.
31. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, et al. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 1999;155(3):683-94.
32. Hovey RM, Chu L, Balázs M, DeVries S, et al. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res* 1998;58(16):3555-60.
33. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995;9(4):401-6.
34. Ádám Zs, Ádány R, Ladányi A, Tímár J, Balázs M. Assessment of chromosomal alterations in association with the metastatic behaviour of three subsequent melanoma cell lines. *Clinical and Experimental Metastasis* 2001 (in press).
35. Tóida M, Balázs M, Mori T, et al. Analysis of genetic alterations in salivary gland tumors by comparative genomic hybridization.