

Tricellulin és epigenetikus változások vizsgálata humán epitheliális hepatoblastomában

Doktori tézisek

Dr. Schlachter Krisztina

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, professzor emerita

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szekeres György, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sági Zoltán, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bodánszky Hedvig, egyetemi tanár

Dr. Simon Károly, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

Számos tanulmány a gyermekkori tumorok - köztük a májtumorok - növekvő incidenciájáról számol be. Ezeknek a májtumoroknak kétharmada malignus és 70%-a hepatocelluláris eredetű, mely hepatoblastoma (HB), vagy hepatocellularis carcinoma (HCC). A HB a leggyakoribb primer gyermekkori malignus májtumor a nyugati országokban, incidenciája 1.6-2 eset/millió gyermek, szemben a HCC 0.29-0.45 eset/millió gyermek incidenciájával. Magyarországon évente 2-3 eset fordul elő (Magyar Gyermek Tumor Regiszter). A hepatoblastoma az esetek 80%-ban unifokálisan jelenik meg, klinikailag általában tünetmentes, nagy hasi terimeként jelentkezik, hepatomegália észlelhető, ritkán akut has formájában jelentkezik, lázzal együttesen. Az alfa-fetoprotein (AFP) szint a betegek 90%-ban emelkedett, újszülöttek esetében viszont a fiziológiásan magasabb AFP szint megtévesztő lehet. Egy nemrég leírt diagnosztikus marker, a DLK1, specifikus és szenzitív markernek bizonyult HB-ban.

A HB feltételezhetően olyan hepatocytá prekurzor sejtekből ered, melyek a májfejlődés különböző stádiumait reprezentálják. A tumor szövettani megjelenése alapján képzett csoportok tükrözik ezen stádiumokat, melyekhez eltérő prognózis társul. Az epitheliális HB a leggyakoribb típus, melyben általában több szövettani komponens látható, így ezen belül leggyakoribb a kevert fetális/embrionális típus, azonban a két komponens elkülönítésére kevés marker áll a rendelkezésünkre.

A sejtkapcsolatok megváltozása a daganatok kialakulásának és a tumoros progresszióknak alapvető történése. Munkacsoportunk korábban már leírta a tight junction (TJ) fehérje claudin -1, 2 eltérő expresszióját HB különböző szövettani szubtípusaiban. Nem rendelkezünk azonban adattal a nemrég leírt, három epithelialis sejt kapcsolódási pontjánál elhelyezkedő fehérje, a tricellulin (TRIC) expressziójáról humán HB-ban. Ugyanakkor, hepatocellularis carcinomában, fibrolamelláris HCC-ben és cholangiocarcinomában (CC) eltérő irányú expresszióját írták le és a különböző expressziós szintek összefüggést mutattak a túléléssel is.

Az epigenetikus szabályozó mechanizmusok közül a hiszton metiltranszferáz aktivitással rendelkező enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) fehérje fokozott kifejeződését számos hám- és nem hám eredetű daganatban is leírták, expressziós szintje és a kimenetel között szoros összefüggés volt igazolható. Az EZH2 emelkedett szintje és

a rosszabb kimenetel között összefüggést találtak HCC-ben és CC-ban. Nem rendelkezünk adattal ezen fehérje HB-ban való expressziójáról.

A HCC diagnosztikájában az argináz-1 fehérje nagyon specifikus és szenzitív hepatocytá specifikus markernek tekinthető, mely segít a primer HCC és a metasztatikus adenocarcinomák elkülönítésében is. Nem rendelkezünk adattal azonban arról, hogy ezen marker a HB-ban is expresszálódik-e.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A daganatok pathogenezisében fontos szerepet játszó sejtkapcsolatok megváltozását munkacsoportunk korábban számos daganatban leírta. Nincs viszont információ az újonnan felfedezett tight junction fehérje, a tricellulin expressziójára vonatkozóan HB-ban, mely adattal szolgálhat ezen daganat patogenezisére vonatkozóan. Ugyancsak nincs ismeretünk a számos tumorban leírt epigenetikus szabályozó molekulának, az EZH2 fehérjének a hepatoblastoma különböző szövettani típusaiban való kifejeződéséről. Szintén nincs adatunk a HCC-ben nagy szenzitivitással és specifitással expresszálandó argináz-1 fehérje kifejeződéséről sem a HB-ban.

A fenti szempontok figyelembe vételével a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- A tricellulin expressziójának vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- Az EZH2 fehérje expressziójának vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- Az argináz-1 fehérje kifejeződésének vizsgálata humán epitheliális hepatoblastoma különböző differenciáltságú szövettani típusaiban.
- A β -catenin expressziójának vizsgálata a két epitheliális komponensben.
- Az immunhisztokémiai vizsgálatokkal kapott eredmények és a túlélési adatok összevetése, elemzése, kiértékelése.
- A HB tisztázatlan eredetének megértése céljából vizsgáltuk a tight junction proteinek (claudin-1 és TRIC) és EZH2 expresszióját az egyedfejlődés különböző időszakában humán fetális májmintákon.

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek és szövetminták

Mintáinkat a Semmelweis Egyetem II. számú Patológiai Intézetének és az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének archívumában 21, tisztán epitheliális HB diagnózissal lezárt esetekből választottuk. A 21 tumoros beteg életkora 3.6-189.8 hónap (átlagosan 45.9 hónap), a fiú/lány arány 11/10 volt. A 21 eset mindegyike a SIPOEL nemzetközi protokollnak megfelelően pre-operatív kemoterápián esett át. 12 fetális és 9 embrionális/fetális típus megoszlásban. Az utóbbi 9 esetből 5- ben a fetális komponens aránya kevesebb, mint 5% volt, míg 4 esetben ez az arány elérte a 30-50%- ot. Az előbbi esetekből csak embrionális területet, míg az utóbbiakból mind embrionális, mind fetális területet tudunk értékelni és a kiértékelésbe bevonni. Így összesen 16 fetális, 9 embrionális illetve 16 tumormentes, környező májminta állt rendelkezésünkre. Az 57 abortum átlag kora 19 hét volt, a legkorábbi terhességi hét 13 hetes volt, a legidősebb 23 hetes.

3.2. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatok

A beérkezett minták feldolgozása a rutin laboratóriumi protokoll szerint történt. A paraffin blokkba ágyazott (FFPE) mintákból 3-5 µm-es metszetek készültek, amelyeket haematoxylin eosinnal festettünk meg. Az immunhisztokémiai reakciókat HRP Multimer alapú biotin mentes detektálási technikával működő *Ventana Benchmark XT* (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) automatizált immunfestő automatában a gyártó protokolljának megfelelően állítottuk be. Az általunk vizsgált primer antitestek: argináz-1 (poliklonális nyúl, Sigma); β -catenin (monoklonális egér, Millipore); claudin-1 (poliklonális nyúl, Cell Marque); EZH2 (monoklonális egér, BD Transduction Laboratories™); tricellulin (poliklonális nyúl, Invitrogen).

3.3. Szöveti multiblokk (tissue microarray-TMA) készítése

A magzati májakon végzett immunhisztokémiai reakciókat 50 férőhelyes TMA blokkokon vizsgáltuk. Vizsgálatunkban a 3D Histech (1122, Budapest, Hungary) cég automatizált TMA Master készülékét használtuk.

3.4. Szemikvantitatív kiértékelés

Az immunreakciók kiértékelésénél 10 random kiválasztott nagy nagyítású látótérben (400X) 100-100 sejtet vizsgáltunk. A TRIC ellenes antitesttel végzett vizsgálatokban a reakciót lineáris vagy pontszerű membranózus festődés estében értékeltük pozitívként. Az EZH2 esetében a nukleáris reakciót értékeltük. Hasonló módon vizsgálva az előzőekhez, a β -catenin esetében a nukleáris, illetve a citoplazmatikus kifejeződést is értékeltük. Az Arg-1 értékelésénél a nukleáris vagy citoplazmatikus festődést tekintettük pozitívként. A reakcióerősség pontértékei a következők voltak: 0 pont – negatív reakció; 1 pont – gyenge reakció; 2 pont – közepes reakció; 3 pont – erős reakció. A pozitívan festődő sejtek százalékos arányát a következők szerint adtuk meg:

3 pont = 66-100%

2 pont = 31-65%

1 pont = 6-30%

0 pont = \leq 5%.

Az összesített pontértékek (intenzitás+százalék) 0-6 között mozogtak. A 0 pontot negatívnak tekintettük immunhisztokémiai szempontból.

3.5. Sejttenyésztés

Az általunk vizsgált sejtvonalak az American Type Culture Collection (Manassas, VA) cégtől származnak: Hep3B hepatocellularis carciora (ATCC® HB-8064™), HepG2 hepatocellularis carciora (ATCC® HB-8065™), HEK-293 embrionális vese (ATCC-1573) és HUH-7 (ATCC HB- 8064) hepatocellularis carciora sejtvonal.

3.6. Immunfluoreszcens vizsgálatok

5 HB esetből és 10 foetális májmintán végeztünk immunfluoreszcens vizsgálatot Alexa Fluor 488 (donkey anti mouse IgG, donkey anti rabbit IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, LOT: 41225A, 556439) és Alexa 568 (goat anti rabbit IgG, goat anti mouse IgG, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA, LOT: 633194, 84E1-1) jelölt szekunder antitestekkel.

3.7. Statisztikai analízis

A különböző csoportok közötti immunhisztokémiai score értékek összehasonlítására Kruskal-Wallis ANOVA tesztet alkalmaztuk. A hepatoblastoma minták és a környező, nem tumoros minták közötti különbséget a Mann-Whitney U teszt segítségével értékeltük. A klinikai paraméterek vizsgálata esetén Fisher- féle exact tesztet alkalmaztunk. A túlélési analízist (teljes túlélés és eseménymentes túlélés) Kaplan-Meier módszerrel végeztük, a kapott túlélési görbék összehasonlításához log-rank tesztet végeztünk. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 9.0 segítségével végeztük (StatSoft Inc., OK, USA). Az eredmények értékelésekor $p < 0,05$ változást tekintettünk statisztikailag szignifikáns különbségnek.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Argináz-1, β -catenin, EZH2 és tricellulin vizsgálata a tumormentes, környező májmintákon immunhisztokémiai módszerrel. Az argináz-1 erős nukleáris és/vagy citoplazmatikus festődést mutatott a hepatocyták 100%-ban, jelezve ezzel a nagymértékű specificitását ezen sejtekre. A portális traktus képletei (beleértve a biliáris traktust, artériákat és vénákat) nem mutattak festődést.

A **β -catenin** a tumormentes, környező májban nem mutatott nukleáris/citoplazmatikus festődést, a hepatocytákban és a biliáris képletekben egyforma erősségű membranózus expressziót láttunk.

Az **EZH2** elleni antitesttel sem a hepatocyták, sem a biliáris traktus képletei nem mutattak festődést az általunk vizsgált májminták egyikében sem.

A **tricellulin** membranózus expresszióját a minták 100%-ban észleltük, leginkább pontszerű akkumulációként megjelenve három sejt találkozásánál. A tricellulin immunreakciók intenzitása változó volt a különböző tumormentes, környező májminták között. Ugyanakkor általában a hepatocyták apikális pólusa és a biliáris hámsejtek intenzívebb reakciót mutattak.

4.2. Argináz-1, β -catenin, EZH2 és tricellulin vizsgálata hepatoblastoma különböző differenciáltságú komponenseiben immunhisztokémiai módszerrel. Az **Arg-1** esetében nem mutatkozott különbség a fetális és embrionális komponens között, mindkét típusban a tumorsejtek sejtmagjában és/vagy citoplazmájában expresszáldott a fehérje. Szintén nem volt különbség az immunreakció százalékos aránya vagy az intenzitása tekintetében a hepatoblastoma tumoros minták és a tumormentes, környező májminták között.

Citoplazmatikus és/vagy nukleáris **β -catenin** expressziót a minták 95%-ban (20/21 eset) találtunk, szemben a tumormentes, környező májmintákkal, ahol csak membranózus reakciót tapasztaltunk. A nukleáris β -catenin expresszió tekintetében szignifikáns eltérést találtunk a két komponens között: az embrionális komponens sejtek szignifikánsan magasabb immunhisztokémiai pontértékkel (nagyobb százalékos pozitivitással) rendelkeztek a fetális sejtekhez viszonyítva. Mindkét komponensben diffúz citoplazmatikus festődés is észlelhető volt a nukleáris festődés mellett, az

embrionális tumor sejtek nagyobb arányban és intenzitással expresszálták citoplazmájukban is a β -catenint, ugyanakkor statisztikai analízissel nem találtunk szignifikáns különbséget. Mivel a tumormentes, környező májmintákban nem találtunk a β -catenin mutációját jelentő citoplazmatikus vagy nukleáris festődést, így érthető a szignifikáns különbség jelenléte a normál májminták és a tumoros komponensek között.

Nukleáris **EZH2** reakciót mind az embrionális, mind a fetális sejtekben észleltünk, a hepatoblastoma minták mindegyikében (21/21 eset). Mindkét komponensben a reakció intenzitása a közepes és nagyon intenzív között mozgott. Ugyanakkor, a tumormentes, környező májminták egyikében sem találtunk festődést az EZH2 elleni antitesttel. Ezekben a mintákban sem a portális triászt alkotó hepatikus artériákat és portális vénákat bélelő endothél sejtek, sem pedig a biliáris epithelilális sejtek nem mutattak festődést. Mind a festődő sejtek százalékos aránya, mind a festődés intenzitása szignifikánsan magasabb volt az embrionális sejtekben a fetális sejtekkel összehasonlítva. Mindkét tumor szubtípus szignifikánsan magasabb immunhisztokémiai score értéket mutatott a tumormentes, környező májhoz viszonyítva.

Membranózus vagy pontszerű **TRIC** expressziót a minták 90%-ban találtunk (19/21 eset). A jól differenciált fetális szubtípus sejtjeiben intenzív és kiterjedt expressziót láttunk a tumorsejtek membránja mentén, néhol lineáris membranózus, máshol pedig pontszerű megjelenés formájában. Az embrionális komponens sejtjeiben kevésbé intenzív reakciót találtunk, illetve a festődő sejtek százalékos aránya is kevesebbnek bizonyult a fetális sejtek TRIC expressziójához képest. Az embrionális sejteken pontszerű akkumulációként expresszáldott a fehérje, a festődés leginkább a sejtek által alkotott pszeudorozetták luminális pólusára terjedt ki. Megfigyeltük továbbá, hogy a 21 hepatoblastoma minta kis részében, 5 esetben (24%) az elvárt membranózus TRIC expresszió helyett a tumorsejtek 2-3%-ban nukleáris lokalizációt mutatkozott. A minták megoszlását tekintve 4 fetális és 1 embrionális szubtípusúak voltak.

4.3. EZH2 és tricellulin vizsgálata hepatoblastoma tüdőáttétjében. Egy esetünk rendelkezésre álló távolt tüdőáttétjében az EZH2 és tricellulin fehérjék expressziója kimutatható volt, a festődési mintázat a primer tumorban látottakkal megegyezett.

4.4. Tricellulin vizsgálata hepatoblastoma mintákon immunfluoreszcens módszerrel. A rendelkezésre álló öt fagyasztott HB mintánk, melyek mind tisztán fetális

szubtípusúnak bizonyult, a tumorsejtek membránjuk mentén, főleg az apikális póluson expresszálták a fehérjét.

4.5. AZ EZH2 és nukleáris β -catenin asszociációja. Az EZH2 expresszióját a HB minták 100%-ban, míg nukleáris β -catenin expressziót a minták 81%-ban találtunk. Mindkét fehérje esetében a terület százalékos pozitivitás és a festődés intenzitása is az embrionális komponensben mutatkozott magasabbnak. Mindkét esetben a fehérjék expressziója szignifikánsan magasabb volt a jól differenciált fetális komponenshez viszonyítva. Szintén hasonló módon, egyik fehérje sem mutatott festődést a tumormentes, környező májban.

4.6. Utánkövetéses vizsgálat. A 21 betegből a vizsgálatunk lezárásának időpontjáig 5 beteg (24%) hunyt el, minden betegnél a betegség progrediálását állapították meg a halál okaként. Csak a szövettani típust tekintve, nem volt szignifikáns különbség a fetális (n=12) és az embrionális/fetális (n=5) esetek teljes túlélésében (OS) és az eseménymentes túlélés (EFS) tekintetében sem. A tricellulint alacsony, azaz a medián alatt expresszáló hepatoblastoma esetek szignifikánsan rövidebb OS-el rendelkeznek Kaplan-Meier analízisben a tricellulint magas, a medián fölött expresszáló esetekhez képest. Az EZH2-magas csoportban az OS 87.14, az EFS 63.98 hónap volt, míg az EZH2-alacsony csoportban az OS 98.88, míg az EFS 94 hónapnak bizonyult, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak, feltehetőleg az alacsony mintaszám miatt. Az argináz-1 és β -catenin expresszió nem mutatott összefüggést az OS-el és az EFS-el sem.

4.7. Tricellulin vizsgálata sejtvonalakban. A hepatoblastoma mintákban észlelt nukleáris TRIC lokalizáció további vizsgálata révén immunfluoreszcens festéssel vizsgáltunk 4 különböző sejtvonalat, melyekben jól ismert a tricellulin jelenléte.

A HUH-7 és HEK 293 sejtekben nem találtunk erős TRIC membranózus festődést, leginkább gyenge, citoplazmatikus lokalizációt láttunk. A citoplazmatikus festődés a HEK 293 sejtvonal esetében erősebbnek bizonyult. A Hep3B hepatocelluláris carcinoma sejtvonalon szintén nem láttunk membranózus TRIC expressziót, a tumorsejtek citoplazmájukban expresszálták a fehérjét. Ezzel szemben, a sokak által hepatoblastoma sejtvonalnak is mondott HepG2 sejteken a sejtek 100%-ban erős, diffúz, egyenletes intranukleáris TRIC festődést tapasztaltunk.

4.8. Fetális májak vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel. A **claudin-1** fehérje esetében minden mintánkban a 14. héttől kezdődően erős, illetve közepes festődési intenzitású membranózus festődést kaptunk, a fetális májakban is az epeutak és a hepatocyták apikális pólusa kifejezetten erősen festődtek az antitesttel. A reakció kiterjedésében nem mutatkozott különbség a különböző idős foetus-okban, a CLDN-1 minden esetben lineárisan körülrajzolta a hepatocytákat, annak „lépesméz-szerű” mintázatot adva.

Az **EZH2** megjelenése a legkorábbi, 14 hetes mintában is már megfigyelhető volt, a hepatocyták és a hemopoetikus sejtek is nagymértékben kifejezték a fehérjét. A fetális májmintákban –hasonlóan a gyermek és felnőtt májakhoz- nem mutattak festődést az epüti képletek. Megfigyelhető volt a 23 hetes mintákban a pozitívan festődő hepatocyták számának csökkenése. A felnőtt és gyermek májak teljesen negatívnak bizonyultak az antitesttel

Sikerült kimutatni a **TRIC** membranózus mintázatát a 14, 18, 19, 20, 21, 22 és 23 hetes foetus-okban. A legkorábbi mintáktól kezdve mind a hepatocyták, mind az epüti képletek expresszálták a fehérjét.

4.9. Fetális májak vizsgálata immunfluoreszcens módszerrel. 10 esetben végeztünk immunfluoreszcens vizsgálatot EZH2 és TRIC fehérjékkal. Az EZH2 vizsgálatakor a fetális májmintákon jól látszik a fehérje egyenletes eloszlása a nucleus-ban. Jól láttuk a TRIC membranózus megjelenését a különböző kori magzati májmintákon.

5. Következtetések és új megállapítások

1. Elsőként mutattuk ki a TRIC expresszióját humán epitheliális hepatoblastomában.
2. Igazoltuk, hogy a TRIC fehérje a HB két eltérő differenciáltságú fetális, és embrionális szubtypusában is expresszálódik, a fetális szubtypusban szignifikánsan magasabb expressziós szintet mutatott az embrionális szubtypushoz viszonyítva. Ez arra utal, hogy a TRIC fehérje a két epitheliális szubtypus differenciációs markerének tekinthető.
3. A TRIC-t fokozottan expresszáló esetekhez szignifikánsan jobb teljes túlélés társult a TRIC-t alacsony mértékben expresszáló mintákhoz képest. Így a TRIC expressziós szintje segíthet a prognózis előrejelzésében.
4. Kimutattuk a nukleáris TRIC jelenlétét humán hepatoblastoma mintákon, és hepatocelluláris sejtvonalon.
5. Elsőként mutattuk ki az EZH2 fehérje eltérő expressziós szintjét a fetális, és az embrionális szubtypusban. Az embrionális sejtek szignifikánsan magasabb mértékben fejezték ki a fehérjét, mely az EZH2-nek az epigenetikus szabályozó mechanizmusokban betöltött szerepét hangsúlyozza. Az EZH2 a két epitheliális szubtypus differenciációs markerének tekinthető.
6. Más szerzőkhöz hasonlóan a β -catenin abnormális expresszióját észleltük HB eseteinkben, mely megerősíti és igazolja mintáinkban is az ismert Wnt/ β -catenin útvonal károsodását. A β -catenin nukleáris expressziójában különbséget találtunk a HB két szubtypusa között, mely szignifikánsan magasabb volt az. embrionális sejteben.
7. Észleltük a nukleáris β -catenin és EZH2 fehérjék együttes expresszióját a minták nagy százalékában. Ez jelezheti és utalhat a Wnt/ β -catenin útvonal epigenetikus reguláció miatt bekövetkező aktivációjára hepatoblastoma mintákban.
8. Elsőként írtuk le az argináz-1 fehérje igen magas expresszióját a fetális és az embrionális szubtypusban. Nem találtunk különbséget a fehérje kifejeződésében a két szubtypus tekintetében, így ez a fehérje nem alkalmas a két szubtypus elkülönítésére. Ugyanakkor, hasznos marker lehet a hepatoblastoma diagnosztizálásában.

9. Elsőként írtuk le humán foetusok májmintáin a tight junction fehérje claudin-1 és tricellulin expresszióját. Mindkét fehérje a magzati fejlődés korai időszakában, a 14. gesztációs héten már kimutatható. Ez jelzi mindkét fehérje fontos funkcióját a máj normális fejlődésének biztosításában.
10. Elsőként írtuk le az EZH2 humán foetusok májmintáiban való expresszióját. A fehérje is az egyedfejlődés korai, 14 hetes időszakában már megjelenik.

6. Saját publikációk jegyzéke

Megjelent közlemények impact factora (IF): 7,711

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények: (IF: 5,151)

Schlachter K., Gyugos M., Halasz J., Lendvai G., Baghy K., Garami M., Gyongyosi B., Schaff Z. and Kiss A. (2014) High tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma. *Histopathology*, 65: 631-41.

IF: 3.301

Hajosi-Kalcakosz S., Dezso K., Bugyik E., Bodor C., Paku S., Pavai Z., Halasz J., Schlachter K., Schaff Z. and Nagy P. (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol*, 7: 86.

IF: 1.850

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 2,560)

Gyugos M., Lendvai G., Kenessey I., Schlachter K., Halasz J., Nagy P., Garami M., Jakab Z., Schaff Z. and Kiss A. (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*, 464: 419-27.

IF: 2.560