

dc_1046_15

Magyar Tudományos Akadémia
Doktori pályázat

Tézisek

**Klonális Heterogenitás és Evolúció
Haematologiai Daganatokban**

Pajor László

Pécs
2015

<u>1. Témakör – Célkitűzések</u>	1
1.1. Bevezetés.....	1
1.2. Vizsgálati célkitűzések.....	2
<u>2. Vizsgálati eljárások – Módszerek – Források</u>	3
2.1. Sejt és szövetminták – Beteganyag.....	3
2.2. Citológia – Hisztológia – Immunhisztológia.....	3
2.3. In situ hibridizáció.....	3
2.4. Citometria.....	4
2.5. Kombinált feno- és genotípus vizsgálatok.....	5
2.6. PCR alapú vizsgálatok.....	5
2.7. Ph kromoszóma kimutatás kariotipizálással.....	6
2.8. Források.....	6
<u>3. Főbb következtetések – Új eredmények - Hasznosítás lehetőségei</u>	7
<u>4. A disszertáció tárgyát képező közlemények - Tudománymetria</u>	14
<u>5. Köszönetnyilvánítás</u>	17

Rövidítések

aALL	felnttkori ALL
aCGH	array comparative genomic hybridization
Ag-NOR	ezüstözött nukleoláris organizációs régió
ALL	acut lymphoblastos leukaemia
AML	acut myeloid leukaemia
BC	blastos crisis
CCA	konvencionális citogenetikai analízis
CEP	centromerikus próba
CML	chronicus myeloid leukaemia
CML-LBC	CML lymphoblastos crisis
CML-MBC	CML myeloblastos crisis
CNA	kópia szám változás
EBER	Epstein Barr kódolt RNS
EBNA	Epstein Barr nukleáris antigén
EBV	Epstein Barr vírus
ET	essentialis thrombocythaemia
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció
HCL	hajas sejtes leukaemia
HE	hematoxin-eosin
HeH	magas hiperdiploid
HeL	alacsony hiperdiploid
HRS	Hodgkin Reed Sternberg
HUMARA	humán androgén receptor assay
iFISH	interfázis FISH
iFISH-PV	perifériás vér iFISH
IgH/R	Immunglobulin nehézlánc gén / átrendeződés
IgV _H	IgH variábilis régió
iMN ₈	modális kromoszóma szám 8-paraméteres iFISH alapján

ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
KDe	kappa deletáló elem
KIIF	Kombinált Immunfenotípus Interfázis FISH
LMP-1	EBV latens membrán protein-1
LSI	lokusz specifikus próba (identifier)
MGG	May-Grünwald-Giemsa
ML	malignus lymphoma
MMR	major molekuláris válasz
MPN/B	myeloproliferatív neoplasia / betegség
MPN-NOS	MPN, közelebbről nem meghatározott
MRB	minimális reziduális betegség
pALL	gyermekkori ALL
PCR	polimeráz láncreakció
Ph ⁻⁺	Philadelphia kromoszóma negatív / pozitív
PTCL	perifériás T-sejtes lymphoma
RQ-PCR	valós idejű PCR
RQ-RT-PCR	valós idejű RT-PCR
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
TCR- γ/δ	T-sejt receptor gamma / delta
TKI	tirozin kináz inhibitor
UCSC	el nem kötelezett őssejt

1. Témakör - Célkitűzések

1.1. Bevezetés

Nukleinsavak hisztológiai és citológiai preparátumokban történő, mikroszkóppal vizsgálható manipulálását *in situ* molekuláris módszereknek nevezzük. Ezen módszerek nem mindegyike, de döntő többsége *in situ* hibridizáción (ISH) alapszik. A különböző ISH-s technikák alkalmazása képezi a molekuláris citogenetika alapját. Interfázis sejtek magjain végzett – nem feltétlenül, de gyakran – fluoreszcens ISH (FISH) a molekuláris citogenetikának azon válfaja, melyet interfázis citogenetikának (iFISH) nevezünk, 1986-óta. A konvencionális citogenetikai analízis (CCA) az iFISH-től döntően abban különbözik, hogy míg az előbbi – feloldásának határain belül – teljes genom vizsgálati módszer, az utóbbi célkérdésekre ad igen vagy nem választ. Figyelemre méltó különbség továbbá, hogy az iFISH sejtenyésztes nélkül ad genetikai és morfológiai információt – elkerülvén ezáltal a tenyésztés során potenciálisan fellépő nehézségeket illetve az ún. klonális szelekciót. A patológus szemszögéből különös jelentőséggel bír, hogy alkalmazásának nem szab határt a formalin fixálás és a paraffinba történő beágyazás. Az interfázis citogenetikát felhasználhatjuk numerikus és strukturális kromoszóma anomáliák, patogénikus transzlokációk illetve ezek kombinációi valamint – digitális képi technikákkal történő együttes alkalmazás esetén – sejtvonal specifikus, tehát szelektív genetikai eltérések vizsgálatára.

Diagnosztikus pathologusként különös feloldó erőt láttam az interfázis citogenetikában, mivel ez az egyetlen módszer jelenleg is, mely *in situ*, a morfológia valódi vagy virtuális megtartásával a fenotípus mellett genotípus információt ad. A pásztázó digitális mikroszkópia alkalmazásával pedig az automatizált, statikus citometriás korrelált, egysejt-szintű adatgyűjtés lehetősége adódik. Ez a technológia – az individualizált cél terápia korában, és amikor a tumorgenezis monoklonális dogmájának bástyája repedezik – új távlatot nyit a daganatok klonális heterogenitásának / evolúciójának kutatásában. 1988-ban illetve 1990-ben együtt illetve környezetében dolgozhattam a FISH–iFISH technológia kidolgozásában első mérföldköveket jegyző Jan G.J. Bauman-nal (University of Leiden) illetve Robert H. Singer-rel (University of Massachusetts), majd 1993-tól egy pan-európai (European Community Concerted Action) projekt (Automation Molecular Cytogenetic Analysis) vezetőségi tagjaként egy vadonatúj, interdiszciplináris – biomedicinális fejlesztési irány áramába kerülhettem Mindezek együttesen meghatározták a célkitűzéseimet, és lehetővé tették, hogy ezek mentén vizsgálódjak.

1.2. Vizsgálati célkitűzések

1.2.1. A hyperdiploid gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia szubklonális architektúrájának / klonális heterogenitásának vizsgálata.

1.2.2. A t(12;21)(p13;q22) pozitív gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia komplex analízise: Epidemiológia, prognosztika, reziduális betegség és pre-leukaemias sejtek.

1.2.3. Ph+/bcr-abl átrendeződés pozitív betegségek vizsgálata interfázis citogenetikával (iFISH).

1.2.3.1. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató acut és chronicus myeloproliferatív betegségek heterogenitásának vizsgálata.

1.2.3.2. Az interfázis citogenetika (iFISH) szerepének vizsgálata Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató ritka kórképek diagnosztikájában.

1.2.3.3. Az interfázis citogenetika (iFISH) lehetőségeinek vizsgálata chronicus myeloid leukaemia kezelésének molekuláris monitorizálásában.

1.2.4. Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív B-sejtek klonális evolúciójának vizsgálata T-sejtes lymphomákban

1.2.5. Citogenetikai aberrációk detektálásának automatizált vizsgálati lehetőségei interfázis magokban.

2. Vizsgálati eljárások – Módszerek – Források

2.1. Sejt és szövetminták – Beteganyag

Az automatizált reziduális leukaemia sejt detektálási tanulmányunkban REH, CD10+ és ETV6/RUNX1+ pre-B-pALL sejt vonalat, az automatizált iFISH jelminta analízisi tanulmányunkban Ph kromoszóma pozitív SD-1 CML-BC sejt vonalat, a citometriás FISH kvantitatív detektálás vizsgálatokban pedig K562 CML-BC és MG63 humán fibrosarcoma sejt vonalakat használtunk pozitív kontrollként. A többirányú kutatás alapvetően nagyszámú beteg vizsgálati anyag feldolgozásán alapszik. A POTE / PTE I.sz. Belklinikájának valamint a Gyermeklinikájának Onkológiai Osztálya betegei mellett a vizsgálatok kiterjedtek a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport centrumainak mindegyikére, továbbá a felnőtt hematoonkológiai ellátóhálózat egyes centrumaiban és szubcentrumaiban (az egész Dunántúl - kivéve Zalaegerszeg-; továbbá BAZ megye és SZTE) észlelt betegekre. Ennek során vizsgáltuk 214 pre-B-sejtes pALL /melyek negatívak voltak t(9;22)(q34;q11.2) (BCR-ABL1 gén fúzió), t(v;11q23) (MLL gén törés), t(12;21)(p13;q22) (ETV6-RUNX1 gén fúzió) és t(1;19)(q23;p13.3) (TCF3-PBX1 gén fúzió) genetikai aberrációkra/, 34 t(12;21)(p13;q22) pozitív pre-B-sejtes ALL, 17 Ph+ gyermek és felnőtt ALL, 64 ET, további 106 MPB, 40 B-sejtes illetve 365 T-sejtes ML, 50 nem lymphoma típusú malignoma, 68 (interferon- α éra) illetve 197 (tirozin kináz inhibitor éra) CML típusú betegségben szenvedő beteg csontvelő, vérsajt illetve nyirokcsomó anyagait.

2.2. Citológia – Hisztológia – Immunhisztológia

Nagyszámú anyagon végeztünk standard citológiai és hisztológiai processzálást és alapfestéseket követően morfológiai vizsgálatot. A hisztokémiai és citokémiai festéseket a NOR ezüstözése (AgNOR), myeloperoxidase, savi és alkalikus foszfatáz, naftil-acetát-eszteráz (pH 5.8 és 7.2), kloroacetát-eszteráz és Berlinin-kék reakciók míg az immuncitológiai-, hisztológiai palettát a CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD15, CD20, CD21, CD23, CD30, CD45-RA, CD45-RO (UCHL-1), CD79a, CD138, ALK-1, granzyme-B, BCL-6, cyclin D1, DBA44, von Willebrand factor (vWF), EBV latens membrán protein-1 (LMP-1), Epstein-Barr nucleáris antigén-2 (EBNA-2), kappa és lambda könnyűláncok, T-sejt intracelluláris antigen-1 (TIA-1), OCT2, OBF.1/BOB.1 márkerek vizsgálata jelentette.

2.3. In situ hibridizáció

Az rDNS expressziós FISH vizsgálatokban pGEM2 plazmidba szubklónozott, szortírozott 21-es kromoszóma könyvtárból izolált humán 28S rRNS gén 7.3 kb EcoRI fragmentjéből nyert

2.1 kb BgIII-Eco-RI DNS-ről átírt ssRNS próbákat használtunk. Az rRNS FISH vizsgálatokat citológiai körülmények között és sejtszuspenzióban valamint AgNOR jelöléssel kombinálva is elvégeztük.

A 4, 6, 10, 17, 18, X kromoszómák numerikus aberrációit - a rendelkezésünkre álló plasmid klónok alapján – CEP próbákkal, a 14-es és 21-es kromoszómák számbeli eltéréseit saját tervezésű BAC LSI próbákkal vizsgáltuk 214 pre-B-sejtes pALL beteg csontvelői blastjain, iFISH eljárással. A tervezéshez a <http://www.ensembl.org>, <http://genome.ucsc.edu/>, <http://projects.tcag.ca/efish/> és <http://bacpac.chori.org/> adatbázisokat használtuk. A próbákat 4 különböző színű fluorokrómmal jelöltük, így 2 x 4 fluoreszcens próba szettet nyertünk. Az ezekkel történő, egymást követő iFISH reakciókat komputer kontrolált, motorizált, relokalizációra képes, pásztázó fluoreszcens mikroszkópban értékeltük ki. Ez a 8 kromoszóma numerikus aberrációi vonatkozásában, egy-sejt szinten, korrelált adatbázist eredményezett.

A t(9;22)(q34;q11.2) Ph transzlokációt locus specifikus BCR / ABL egyszeres fúziós vagy extraszignálos egyszeres fúziós, míg a t(12;21)(p13;q22) transzlokációt ETV6 / RUNX1 extraszignálos egyszeres fúziós, kétszínű kereskedelmi iFISH próbákkal vizsgáltuk. Az MCL specifikus t(11;14)(q13;q32) transzlokációt cos6.7 és cosH1.5 kozmidokból felépített disszociációs próbával detektáltuk nyirokcsomóban. Üritett vizelet citológiai mintákon kromoszóma 3, 7, 17 CEP és 9p21 LSI próbákból álló gyári reagens használtunk.

In situ hibridizációt alkalmaztunk továbbá az Epstein-Barr (virus) encoded RNS (EBER) valamint a humán immunglobulin könnyűlánc mRNS detektálására gyári kettek felhasználásával, citológiai és hisztológiai körülmények között valamint sejtszuspenzióban, fluoreszcens és/vagy kromogénes előhívást alkalmazva.

2.4. Citometria

a. Áramlási citometria. DNS tartalom, fenotípus meghatározás valamint FISH szignálok izolált vagy kombinált áramlási citometriás vizsgálata háromparaméteres PAS II, 5 paraméteres FACSort és EP-ICS Profile valamint 8 paraméteres RELACS-III, míg a sejtszortirozás FACSort típusú berendezésekben történt. Az immunfenotipizálási paletta magában foglalta a transferrin receptor, az OKM-1, CD3, CD5, CD7, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD33, CD34, CD45, CD61, CDw65, HLA-DR, felszíni immunglobulin (sIg) könnyűláncok, felszíni és intracitoplasmikus μ -lánc, myeloperoxidase, lactoferrin, TdT markereket.

b. Statikus citometria. A fénymikroszkópos morfometriai vizsgálatokat valamint FISH szignálok kvantitatív detektálását – izoláltan vagy kombináltan – 2 CCD kamerával felszerelt

Zeiss Axioskop kombinált fény/epiilluminációs fluoreszcens illetve Zeiss Axiovert invert kombinált fény/fluoreszcens mikroszkóppal továbbá ATTOFLUOR, VIDAS és IMAN képanalizáló software-k alkalmazásával végeztük. Az automatizált iFISH szignál analízist Zeiss Axioplan2ie MOT automatizált fluoreszcens metszet szkennelő mikroszkóp valamint Metafer4 műveleti szoftver segítségével – i.) sejtmag szelekció, ii.) iFISH szignál detektálás és iii.) iFISH szignál távolságok 3D mérése - műveletek révén hajtottuk végre.

2.5. Kombinált feno- és genotípus vizsgálatok

A sejtvonal specifikus in situ genetikai analízis, azaz kombinált feno- és genotípus vizsgálatok, relokalizációra képes munkaállomással felszerelt Axioskop fény / epi-illuminációs fluoreszcens mikroszkóp illetve automatizált, X-Y-Z mozgásban komputer vezérelt, relokalizálni képes, pásztázó fluoreszcens Axioplan MOT-2 mikroszkóppal és Metafer 4.0 szoftver segítségével történtek. HE illetve MGG festett vagy immunfluoreszcenciás eljárással jelölt citológiai preparátumok látótereit digitalizáltuk, majd a preparátumon különböző iFISH reakciókat végeztünk. A komputer vezérelt tárgyasztallal felszerelt mikroszkópban relokalizáltuk az eredeti rögzített látótérket, így fenotípus (morfológia vagy immunmarker) alapján szelektív interfázis citogenetikai vizsgálat volt elvégezhető.

2.6. PCR alapú vizsgálatok

a. Klonalitás vizsgálat. Natív, etanolban fixált vagy formol-paraffinos anyagból extrahált DNS-ből kiindulva T illetve B-sejt eredetű folyamatok klonalitásának vizsgálatára az immunglobulin nehézlánc (IgH) és a T-sejt receptor gamma (TCR- γ) génátrendeződés PCR vizsgálatát használtuk, a szubklónozott PCR terméket szekvenáltuk és a ‚germ-line’ géneket adatbázisokban azonosítottuk. Esetenként az IgH gén FR I – CDR III régiójának vizsgálata alapján szomatikus hipermutáció illetve ‚ongoing’ szomatikus hipermutáció analízis is történt. Flow szortírozott lymphoid és myeloid sejtekből izolált DNS-en – részben teljes genom amplifikációt követően – a humán androgén receptor génben előforduló polimorf mikroszatellita régió PCR amplifikációján alapuló X-chromosoma kötött klonalitási ‚assay’-t (HUMARA) is végeztünk.

b. DNS alapú, leukaemia klón specifikus PCR molekuláris vizsgálatok – MRB analízis. Monoklonális immunglobulin nehézlánc (IgH), T-sejt receptor (TCR) delta illetve kappa-deletáló elem (KDe) meghatározáshoz csoport (‘family’) specifikus primereket és PCR-t használtunk. A klonális génátrendeződések termékeit szekvenáltuk. A csiravonal V, D, J gének junkcionális régióiban a klón specifikus szakaszok azonosítására BLAST

(www.ncbi.nih.gov) és IMGT (www.imgt.cines.fr) szoftvereket használtunk. Az RQ-PCR vizsgálatot csiravonal reverz primerekkel és próbákkal valamint a 'forward', klón specifikus junkcionális régióra tervezett (Oligo 6 Primer Analysis Software) primerekkel végeztük el.

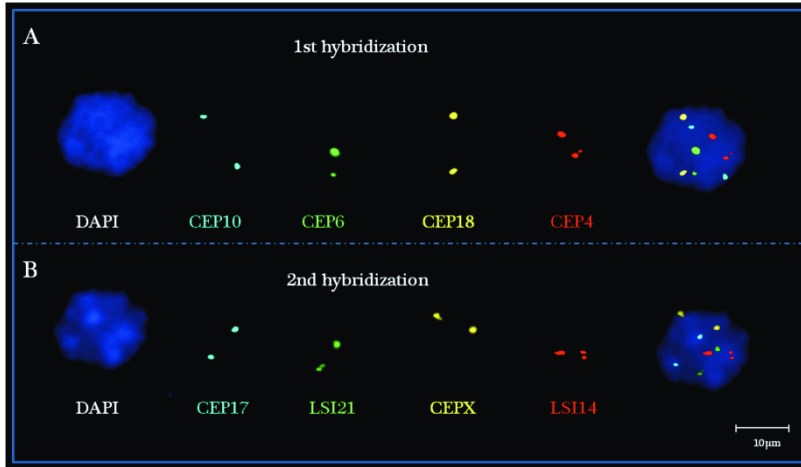
c. Kiméra mRNS expresszió vizsgálat. A t(12;21)(p13;q22) valamint a t(9;22)(q34;q11) kiegyensúlyozott transzlokációk következtében létrejövő ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) illetve BCR/ABL kiméra gén expresszióját RT-PCR eljárással vizsgáltuk. Az utóbbi esetében az m-bcr illetve az M-bcr típusú expressziót 5 különböző primer kombinációval is analizáltuk és esetenként szekvencia meghatározás is történt. Az M-bcr mennyiségi meghatározását 4 ½ nagyságrendnyi tartományban kompetitív – kvantitatív RT-PCR-rel hajtottuk végre (interferon- α terápia érá), melynek során a referencia gén (abl e2-e3) valamint a target gén (bcr e13 – abl e2) mRNS-t egy RT reakcióban fordítottuk át cDNS-sé. Az RNS minőségi kontrolljaként a β -aktin és az abl exon 2-3 transzkriptek RT-PCR amplifikációját használtuk. A kvantitatív BCR/ABL expresszió vizsgálatot (RQ-RT-PCR) a tirozin kináz inhibitorral kezelt CML-es betegek mintáin IPSOGEN Bcr-Abl Mbc Fusion Quant Kit-tel végeztük. Az ETV6/RUNX1 fúziós transzkript detektálására és kvantálására 'nested' RT-PCR és RQ-RT-PCR eljárásokat használtunk.

2.7. Ph kromoszóma kimutatás kariotipizálással.

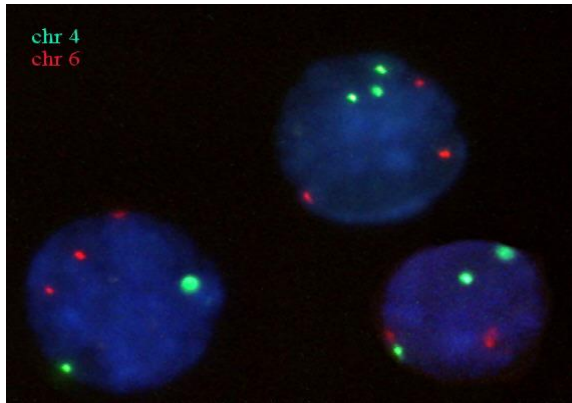
A heparinnal alvadásgátolt vérmintákat 37°C-on tenyésztettük 24 és 48 óráig. 60 perces kolchicin kezelést (0.375 μ g/ml) követően a mintákat hipotonizáltuk, (0.075M KCL, 37°C-on 30 percig), majd metanol/ecetsav (3:1) elegyében fixáltuk, tárgylemezre cseppentettük, levegőn szárítottuk. A G-sávozást Leishman-festékkel végeztük, a metafázisokat Ikaros kariotipizáló szoftverrel értékeltük.

2.8. Források

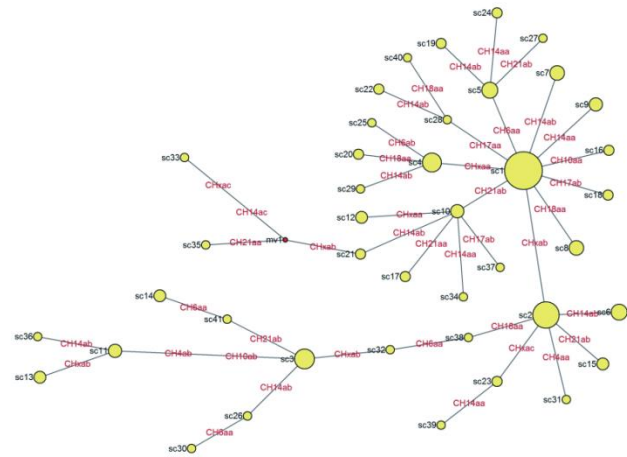
A vizsgálatok elvégzéséhez a témavezetőként nyert PECO-AMCA'93_PL 931079 CT 92-1307 és COPERNICUS '94 ERB 352 PL 94-1103, PHARE ACCORD H-9112-0125 nemzetközi (EC) valamint az ETT-07 632/93, ETT-051/POT/97, ETT-087/2003, ETT 2658/2006, OTKA T-025812, FKFP-0388/2000 és REG_DD_KFI_09-FISHPALL kutatási pályázatok nyújtottak támogatást. Nélkülözhetetlen segítséget kaptam a vizsgálatok elvégzéséhez a Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság-tól, a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoporttól, az osztályok vezetőitől valamint a POTE/PTE Pathologiai Intézet munkatársaitól.



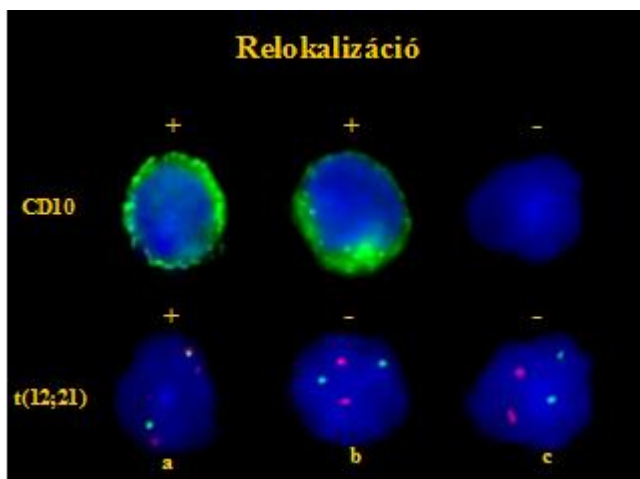
1. ábra: A target sejt egymást követő, 2 x 4 iFISH jelölése. A az első próbaszet (CEP szet) – CEP4 (vörös), CEP6 (zöld), CEP10 (aqua), CEP18 (arany); B ugyanazon target rehibridizációja a 2. próbaszettel (LSI & CEP szet) – LSI14 (vörös), LSI21 (zöld), CEP17 (aqua), CEPX (arany). Negatív kontrol mag, DAPI háttér magfestés, 63x (27).



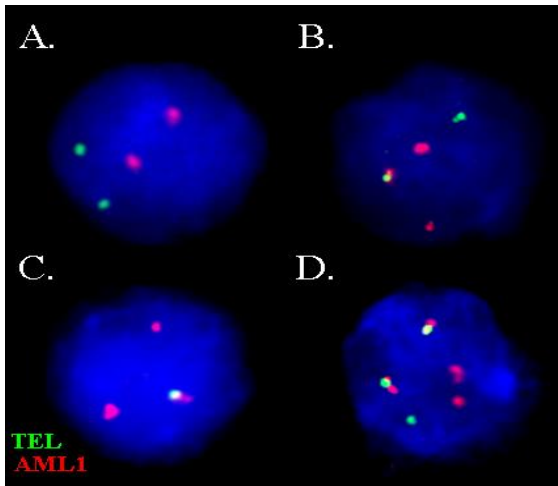
2. ábra: 4-es és 6-os kromoszómák numerikus aberrációinak detektálása valamint a klonális progresszió demonstrálása (peri)centromerikus próbákkal és kétszínű FISH-sel pALL-ben (5).



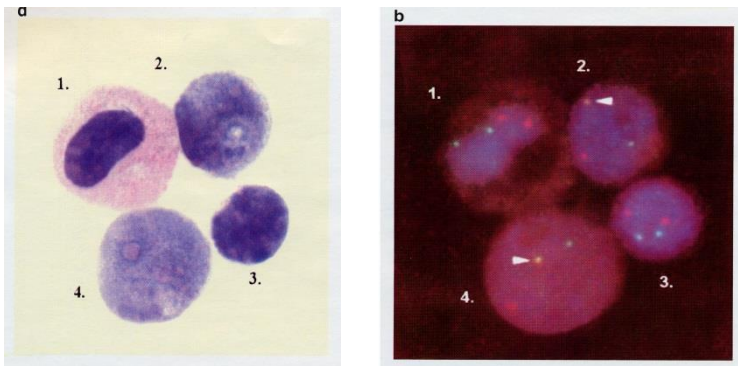
3. ábra: Az egysejtes reprezentánsok kizárása utáni egyedi kariotípust mutató szubklónok evolúciós modellje (Steiner-fa) pALL-ben (ID_17) (27).



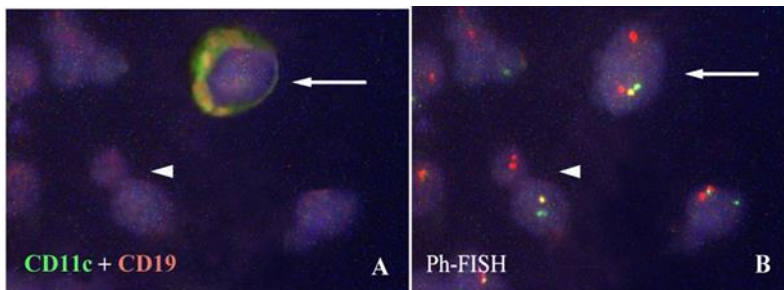
4. ábra: a. CD10+ / t(12;21)+ acut lymphoblastos leukaemia (pre-B-ALL) sejt; b. CD10+ / t(12;21)- normal haematogonium; c. CD10- / t(12;21)- differenciált normál sejt. Konzekutív immunfluoreszcencia és iFISH, az objektumok 3D vezérelt mikroszkópos relokalizációjának alkalmazásával (19).



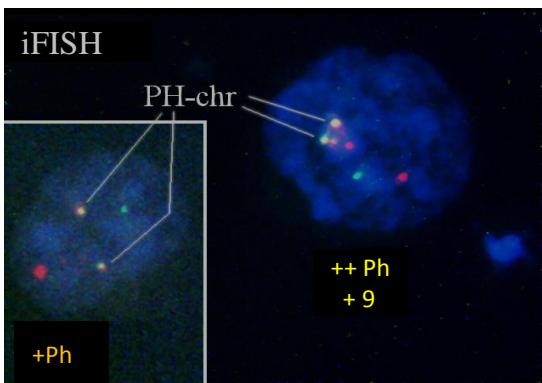
5. ábra: iFISH mintázat t(12;21) ETV6/RUNX1 (korábban TEL/AML1) transzlokáció specifikus ETV6 (TEL) – zöld (SpGreen) és RUNX1 (AML1) – piros-ES (SpOrange) extraszignális próbákkal A normal sejtben – 2P és 2Z jel, B primordialis / prekursor leukaemia sejtben (monoallelikus átrendeződés) – 1F, 1(+1)P és 1Z jel, C és D leukaemias sejtekben (monoallelikus átrendeződés + a normal ETV6 (TEL) deléciója /1F és 1(+1)P jel vagy a fúziós (F) gén duplikációja /2F, 1(+2)P és 1Z jel) (saját vizsgálat, nem publikált ábra).



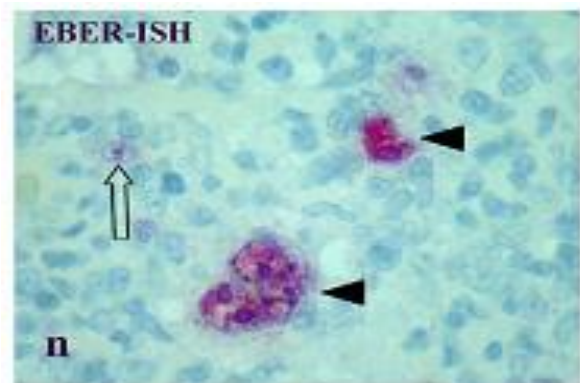
6. ábra: Sejtvonal-specifikus citogenetika morfológiával (A) és iFISH-sel (B) Ph⁺ ALL-ben (8).



7. ábra. Immunfenotípus (A) szelektív iFISH (B, Ph kromoszóma) együtt előforduló, klonális kapcsolatot mutató CML-ben és HCL-ben (9).



8. ábra: Ph-kromoszóma és klonális progressió detektálása bcr és abl specifikus fúziós próbákkal és iFISH-sel chloromában (4).



9. ábra: Nyugvó és HRS típusú EBV⁺ sejtek EBER-ISH-val PTCL-ben (18).

3. Főbb következtetések – Új eredmények - Hasznosítás lehetőségei

3.1.

a. 150 pre-B pALL (kb 2 ½ évnyi m.o.-i beteganyag) numerikus kromoszóma aberrációit az összes kromoszóma vonatkozásában centromerikus próbákkal és iFISH eljárással vizsgálva megállapítottuk, hogy a leggyakoribb genetikai alcsoport, a hiperdiploid pre-B pALL kialakulásában leggyakrabban a 4-es, 6-os, 10-es, 14-es, 17-es, 18-as, 21-es és X kromoszómák nyerése szerepel.

b. Új eljárásként kidolgoztuk a mikroszkópos relokalizációt valamint a konzekutív, 2 x 4 színű iFISH eljárást alkalmazó technológiát, mellyel a 8 kromoszóma kópia szám változásainak (CNA) jellemzésére, először, egysejt-szintű, korrelált 8-paraméteres (8P) adatbázist hoztunk létre 214 pre-B pALL kezeletlen csontvelői blastjainak vizsgálatával.

c. Az adatbázis alapján megállapítottuk, hogy masszív szubklonális heterogenitás áll fenn a leggyakoribb gyermekkori malignomában. Az alacsony illetve a magas hiperdiploid (HeL ill. HeH) pre-B pALL-ben kromoszóma szám szerint átlagosan 6.9 ill. 10.2, míg egyedi kromoszóma konstelláció alapján 15.3 ill. 26.7 szubklón volt azonosítható. Ennek háttérében szignifikáns kromoszóma instabilitást igazoltunk. A szubklonális heterogenitás az eddigi vizsgálati eljárásokkal – kariotipizálással - nem volt detektálható.

d. A szubklónok gauss-i mellett bimodális gyakoriság eloszlást is mutatnak, mely szubklonális szinten is szelekciós nyomás fennálltára utal.

e. A domináns szubklón kromoszóma száma alapján meghatározott iMN₈ index (modális kromoszóma szám 8-paraméteres iFISH alapján) jól jellemzi a hiperdiploid státuszt (HeL vs HeH).

f. A korrelált 8P adatbázis 'hálózat' / network és Steiner-fa analízise alapján megállapítottuk, hogy a kromoszóma nyerések 80 – 90 %-a- a HeL és a HeH csoportban is - szekvenciálisan történik.

g. A korrelált 8P adatbázis 'csoport' / cluster analízise alapján a kromoszóma nyerések szigorú hierarchiáját bizonyítottuk: a 'csoport'-fa alapját mindig a 21-X-14-es kromoszómák képezik, a 10-18-as valamint a 4-6-os kromoszómák egy-egy rákövetkező csoportot alkotnak, míg a 17-es kromoszóma az utóbbiak közül egyikhez sem tartozott konzekvensen.

h. A tetraszómiás kromoszóma képződéstől eltekintve nagyrészt ismeretlen patogenezisű hiperdiploid pre-B pALL új és átfogó patomechanizmus modelljét irtuk le. Ezen genetikai

tipizálás alapján a kromoszóma szegregációs mechanizmusok vizsgálata olyan specifikus hibákat tárhat fel, amely új target terápia alapját képezhetik.

i. A 8P korrelált adatbázis alapján olyan egyszerű triplex iFISH eljárást dolgoztunk ki, mellyel a pre-B pALL hiperdiploid státusza nagy pontossággal meghatározható. Ezzel kapcsolatban m.o.-i (SZTNH -45953/13) illetve nemzetközi (PCT/IB_2014/067116) szabadalmi eljárás van folyamatban.

3.2.

a. Megállapítottuk 130 pre-B pALL vizsgálata alapján, hogy ebben a földrajzi térségben (korábbi adat nem állt rendelkezésre) az ETV6/RUNX1 fúziót eredményező t(12;21)(p13q22) genetikai aberráció gyakorisága 20.5 %. Az áramlási citometriás DNS index (DI) alapján ezen transzlokációt mutató leukaemiák 95 %-a diploid. Bár a transzlokáció pozitív betegek az alacsony rizikó csoportba sorolódtak, az 5 éves eseménymentes túlélésük nem különbözött szignifikánsan a transzlokáció negatív pre-B pALL betegektől.

b. Az ETV6/RUNX1 pozitív pre-B pALL-ben a minimális rezidualis betegség (MRD) meghatározására Kombinált Immunfenotípus Interfázis FISH (KIIF) pásztázó fluoreszcens mikroszkópos (SFM) eljárást dolgoztunk ki, mely a CD10 (immunfluoreszcencia) és t(12;21) transzlokáció (iFISH) konzekutív jelölését és detektálását jelentette. Az eljárással a CD10+ / t(12;21)- haematogóniumok illetve a CD10+ / t(12;21)+ leukaemiás sejtek 9×10^{-4} szinten elkülöníthetőek, tehát a leukaemiás sejtek a döntéshozói szempontból általánosan elfogadott 10^{-3} szintnél alacsonyabb gyakoriság esetén is 100 %-os biztonsággal azonosíthatók voltak

c. Az ETV6/RUNX1+ pre-B pALL betegek klinikai MRB vizsgálata során a kezelés 33. napjától, a betegek csontvelő mintáiban, 10^{-3} szintnél gyakoribb leukaemiás sejtek kvantitatív RNS, illetve klón-specifikus DNS PCR módszerekkel nem voltak kimutathatóak. Ugyanakkor a kezelés 33. napjától a betegek 36 %-ában mutattunk ki KIIF módszerrel $10^{-3} - 10^{-2}$ szintnél gyakoribb CD10+ / t(12;21)+ sejteket. Ezek azonban csak monoallelikus aberrációt mutattak, 10^{-5} , 10^{-6} érzékenységgű RNS alapú RQ-RT-PCR valamint DNS alapú, klón specifikus RQ-PCR eljárásokkal nem voltak detektálhatóak, ezért nem leukaemias reziduális sejteknek, hanem csontvelői leukaemia prekursor sejteknek feleltek meg.

d. Első alkalommal mutattunk ki és vizualizáltunk kezelt t(12;21)+ pre-B pALL betegeknél *in utero* keletkező leukaemia prekursor sejteket a csontvelőben, melyek csak az új eljárásaként kidolgozott KIIF eljárással voltak 'láthatóak'. A prekursor sejtek jelenléte kezelt betegeknél összefüggést mutathat a recidiva hajlammal ezért ezek vizsgálata prediktív a betegség lefolyását illetően.

3.3.1.

a. Jelen tanulmány vizsgálta az irodalomban legnagyobb, 17 klinikailag Ph⁺ acut lymphoblastos leukaemia (ALL) beteganyagot kombinált morfológia és FISH technikával, annak érdekében, hogy a biztosan el nem kötelezett összejt (UCSC) eredetű, klinikailag nem ismert chronicus myeloid leukaemia lymphoblastos krizist (CML-LBC) elkülönítsük a *de novo* Ph⁺ ALL-tól. Az utóbbi sejtvonal érintettségével kapcsolatban (UCSC vs LSC /lymphoid összejt/) – változatos módszerek alkalmazása alapján – ellentmondásos adatok léteztek az irodalomban. Az elkülönítés a BCR-ABL töréspont régió alapján, RT-PCR eljárással, nem volt lehetséges. A 17 Ph⁺ ALL között 6 gyermek (pALL) és 11 felnőtt (aALL) szerepelt, 9 betegség (4 pALL és 5 aALL) az m-bcr, míg 8 betegség (2 pALL, 6 aALL) az M-bcr típusú kiméra expressziót illetve átrendeződést mutatta.

b. A sejtvonal érintettség sejtvonal specifikus, iFISH eljárással végzett vizsgálatának azért van különös jelentősége, mert - a klinikai lefolyás alapján bizonyítottan – a *de novo* Ph⁺ ALL vs CML-LBC között a legújabb, 65 illetve 33 kbp feloldású oligonukleotid komparatív genomikus hibridizáció (aCGH) sem tudott differenciálni: mindkettőben a genomikus profil legjellemzőbbje a CDKN2A (p16) és az IKZNF1gén lokuszok valamint a 14q32 régióban az IgH, továbbá a TCR lokuszok vesztései.

c. Csak azon betegeknél találtunk többsejtvonal érintettséget, akik a remisszió után chronicus fázisba konvertálódtak és ezért ezek valójában CML-LBC-nek feleltek meg. Fordítva, az UCSC eredetű *de novo* Ph⁺ ALL létezésére nem találtunk bizonyítékot, de a vizsgálatunk BCR-ABL töréspont heterogenitást kimutatott a LSC eredetű Ph⁺ pALL-ben illetve aALL-ben, egyaránt.

d. A prognózis és a kezelési stratégia a CML-LBC-ben valamint a *de novo* Ph⁺ ALL-ben még a tirozin kináz gátlók (TKI) korszakában is eltérő, ezért a sejtvonal érintettség korrekt vizsgálata fontos és a klinikai / terápiás döntéshozatal alapját kell képezze. Hasonló problémakör a Ph⁺ *de novo* acut myeloid leukaemia (AML) valamint a CML-MBC (CML-myeloblastos crisis) differenciálása. Ez azonban az AML-ek mindösze 1 %-át kitevő előbbi kórforma esetében az IgH és TCR lokuszokban aCGH módszerrel leirt egyedi vesztések alapján lehetségesnek látszik. Ennek alapján a Ph⁺ *de novo* AML a jövőbeni WHO klasszifikációkban külön entitásként szerepelhet.

e. Tanulmányunk keretében a 64, klinikai - laboratóriumi paraméterek vonatkozásában essentialis thrombocythaemiának (ET) mindenben megfelelő beteg bcr-abl átrendeződés (Ph)

és expresszió molekuláris valamint csontvelői morfometriai vizsgálata alapján a bcr-abl mRNS+ (bcr+) ET létezik, aránya alacsony, 6.3 %-nak bizonyult.

f. Vizsgálataink szerint a bcr⁺ ET el nem kötelezett őssejt eredetű, CML típusú progressziót nem mutat, a csontvelői morfometriai indexek ET típusúak. Így az adatok nem utalnak arra, hogy a bcr+ ET a CML *form fruste* állapota lenne, hanem az ET egy variánsának felel meg. A Ph⁺ ET állapot a csontvelői morfológiában erőteljes eltolódást idéz elő CML irányába.

g. A végső és teljes genetikai különbség a bcr⁺ ET, a Ph⁺ ET valamint a CML között még feltárássra vár, de egy közös genetikai jellegük biztosan van: mindháromban, még az elsöben is, van egy Ph kromoszóma pozitív klón. Ez arra utal, hogy myeloproliferatív neoplasiára hajlamosító millióben több, mint egy genetikai mutáció, következményes szubklonális heterogenitás is kialakulhatnak és azonosíthatóak. A domináns ('driving') vs nyugvó ('passenger') mutációkra eső – akár terápia asszociált - szelekciós nyomás határozhatja meg a domináns klónt és a klinikopathologiai képet.

3.3.2.

a. Az irodalmi adatok nagy többsége szerint a CML-es betegekben egy labilis, Ph⁺, de nem expresszáló progenitor kompartment is létezik, ezt a tirozin kináz inhibitorral indukált major molekuláris válasz (MMR) állapotot vizsgáló tanulmányok is megerősítik, mind az őssejt, mind a progenitor sejtpopuláció vonatkozásában. Tanulmányunk szerint a Ph⁺ (kariotipizálás), bcr-abl⁺ (iFISH) CML típusú myeloproliferatív neoplasiában az egész neoplastikus haemopoetikus állományra kiterjedő, alternáló jellegű, a p230, p210 mRNS-t egyaránt érintő expresszió hiány ('silencing') állhat fenn.

b. A nem-expresszáló Ph⁺ állapot tovább stratifikálhatja a CML típusú betegség többlépcsős patogenezisét. Emellett arra utal, hogy a legújabb TKI kezelési modulok molekuláris monitorizálásánál a DNS alapú módszereket kell előnyben részesíteni a relapszus predikciójában.

c. Kombinált feno- és genotípus vizsgálatok alapján klonális kapcsolatot (Ph pozitivitást) mutató CML és hajas sejtes leukaemia (HCL) együttes előfordulását írtuk le.

d. Az ennek kapcsán folytatott B-sejtes ML és MPN kapcsolatának vizsgálata során megállapítottuk, hogy MPN-ákban sokkal gyakrabban (32%) detektálható morfológiailag fokozott mennyiségű érett lymphoid populáció a csontvelőben, mint amilyen arányban – szigorú kritériumok alapján – monoklonális IgH génátrendeződés (IgH-R) PCR-rel kimutatható. Az IgH-R⁺ klonális B-sejt populáció (5 %) illetve a klinikopatológiailag

manifest B-ML (2.5 %) közel 2 nagyságrenddel gyakoribb MPN-ban, mint az az európai nem Hodgkin ML incidenciából következne. Ez azt jelenti, hogy MPN-ákban, különösképpen a több fejlődésben levő formát inkorporáló MPN-NOS-ban IgH-R+ monoklonális B-sejt populáció kialakulására predispozíció létezik. Ennek az lehet az alapja, hogy a B lymphocyták egy változó, de szignifikáns frakciója a MPN klónhoz tartozik, tehát a többlépcsős cancerogenesis során legalább 1 genetikai aberrációt már akvirált. Addicionális, lymphoma specifikus mutáció, tehát klonális szelekció és fejlődés így nagyobb valószínűséggel alakul ki, mely a MPN-val klonális kapcsolatot mutató B-sejtes ML-hoz vezethet.

e. Szomatikus hipermutáció analízis szerint az IgH-R+ monoklonális B-populáció illetve B-sejtes ML MPN-ban egyaránt lehet pre- valamint postfolliculáris eredetű és a CML típusú MPN-ában ismert LBC jellegű progressziótól eltérő patomechanismusú folyamatot képvisel.

f. Monoklonális B-sejtes populáció felismerése és értelmezése MPN típusú betegségek csontvelő mintáiban komplex molekuláris módszertant igényel.

3.3.3.

a. CML-ben, a legújabb TKI terápiás korszakban, a legutóbbi, nemzetközi CML monitorizálási irányelvekben sem jutott a bcr-abl expresszió vs tumortömeg (Ph+ / bcr-abl-R+ sejttömeg) vs betegség reprezentáció összefüggéseinek kérdésköre nyugvópontra. A bcr-abl expresszió prediktív ereje a betegség progresszió vonatkozásában kérdéses.

b. 68 kezeletlen és IFN- α kezelt beteg 155 perifériás vérmintájának (PV) kvantitativ bcr-abl expresszió és iFISH vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a kezeletlen CML tumorsejtek a bcr-abl expresszió vonatkozásában nagyfokú, 10^3 nagyságrendű heterogenitást mutatnak, a tumortömeg és az expresszió mértéke gyengén korrelál.

c. Először csak a major citogenetikai válasz (iFISH-PV, $1\% \leq \text{bcr-abl-R+ sejt} \leq 33\%$) kategóriában csökkent szignifikánsan a bcr-abl expresszió a kezeletlen állapothoz képest. Az átcsapási pont, szignifikáns bcr-abl expresszió csökkenés formájában, a kezelt betegek között ugyancsak a major citogenetikai válasz (iFISH-PV) elérésénél, a major és minor citogenetikai válasz között volt detektálható, de ilyen expresszió csökkenés major és komplett citogenetikai válasz között nem volt azonosítható.

d. A tanulmány lezárásáig a legnagyobb publikált, q-RT-PCR-rel mért és iFISH-PV-vel jellemzett bcr-abl expresszió és tumortömeg korrelációjára vizsgált kezeletlen ill. IFN- α kezelt CML-es beteganyag analiziséből levont következtetés, miszerint a perifériás iFISH

tumortömeg prediktív a bcr-abl expresszió szempontjából, egybecseng a TKI kezelt betegekben nyert adatainkkal.

e. 197 kezeletlen illetve TKI-ral kezelt CML-es beteg csontvelő és vérmintáinak vizsgálata során megállapítottuk, hogy 15 %-os csontvelői iFISH határértéket meghatározva az iFISH 96,8 % pozitív és 93,8 % negatív prediktív értékkel képes major citogenetikai válasz (Ph+ metafázis arány 0-35 %) meghatározására (konkordancia: 96.8 %). Ugyancsak szoros korreláció mutatkozott a kariotipizálási citogenetikai válasz és a perifériás vérsejtek iFISH pozitivitása között ($r = 0.90$, $n = 177$). A periférián 15 %-os határértéket megállapítva az iFISH 96.3 % pozitív, és 97,9 % negatív prediktív értékkel képes major citogenetikai választ meghatározni (konkordancia: 97,2 %). Az utóbbi különösen azért fontos, mert a legújabb monitorizálási irányelvek szerint CML-ben a komplett citogenetikai válasz és a betegség progresszió szempontjából a perifériás iFISH érték sokkal inkább prediktív, mint a bcr-abl expresszió / major molekuláris válasz.

f. Ehhez a manuális iFISH értékelésnél akár 1 nagyságrenddel nagyobb sejtmennyiség vizsgálatára képes, a jelentős interobserver variabilitást elkerülő, alacsony Ph+ sejtarány mellett is megbízhatóan értékelő, automatizált, 3D iFISH mintázat alapján értékelő mikroszkópos eljárást dolgoztunk ki, elsőként.

3.4.

a. 365 perifériás T-sejtes lymphoma (PTCL) vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy – vélhetően a másodlagos immundeficiencia hatására – a szunnyadó EBV-t tartalmazó B-sejt kompartment közel 2 nagyságrendnyi expanziója alakul ki, mely akár HRS-szerű sejteket is magában foglaló aktivációhoz vezethet. Ezen HRS-szerű sejtelemek aktivált B-sejt ($CD15^-$, $CD20^+$, $CD30^+$, $CD45^+$) vagy cHL-HRS sejt ($CD15^{-/+}$, $CD20^{-/+}$, $CD30^+$, $CD45^-$) fenotípust mutathatnak. EBER nuclearis FISH pozitivitás alapján PTCL-kből szortírozott HRS-szerű sejtek IgV_H FR I – CDR III régiójának, κ/λ mRNS expressziójának valamint az IgH konzervált oktamer promotor illetve enhancer régió specifikus transzkripció faktor és ko-faktor vizsgálata alapján azt találtuk, hogy legalábbis egyes esetekben ezen sejtek az összes ismert fenotípus és genotípus jegy alapján megkülönböztethetetlenek cHL HRS tumorsejtjeitől.

b. Ez a jelenség az immunszuppresszió indukálta, cHL irányú B-sejtes klonális evolúció *in vivo* pathologiai modeljét reprezentálja. A leírt folyamat cHL kialakulásának korai, a citokin függő jellegzetes aspecifikus háttér kifejlődése előtti stádiumát képviselheti, melyre – extrapolálva az *in situ* tumor fogalmát – az *in situ* cHL elnevezést ajánljuk.

3.5.

a. Analitikai citometriai eljárásokat alkalmazva kidolgoztuk kromoszóma transzlokáció /t(9;22)(q34;q11.2)/ interfázis citogenetikai (iFISH) jelölésének automatizált, a három dimenziós (3D) iFISH jelmintázat értékelésén alapuló detektálását (l. 3.3.3.f. pont).

b. Kidolgoztuk és analitikai citometriás jellemzését adtuk a kombinált immunfenotípus és iFISH-sel jelölt genetikai (numerikus és strukturális) aberráció, tehát sejtvonal specifikus citogenetikai analízis, automatizált mikroszkópos vizsgálatát (l. 3.2.b. pont).

c. Ezen eredmények kapcsán áttekintettük az iFISH manuális kiértékelésre adott ECA (European Cytogeneticists Association) valamint ACMG (American College of Medical Genetics) ajánlásokat és szabályokat, továbbá a manuális kiértékelés nehézségeit.

d. A fentiek miatt foglalkoztunk az automatizált iFISH analízis körülményeivel, hardver és szoftver igényeivel, a szoftver detektálási képességének 'kifejlesztésével' (training), az automatizált vizsgálati paraméter meghatározások sorrendjével, az automatizáció történetével, applikációival és perspektíváival. Ennek kapcsán konszenzus standardizációs irányelveket körvonalaztunk.

4. A disszertáció tárgyát képező közlemények

1. **Pajor, L.**, Bauman, J. G. J.: Flow cytometric measurement of rRNA levels detected by fluorescent in situ hybridization in differentiating K-562 cells. *Histochemistry*, 1991, 96, 73-81.
2. **Pajor, L.**, Honeyman, T. W.: Combined light and fluorescent microscopical imaging of nucleolar organizer regions and cellular rRNA as detected by fluorescent in situ hybridization. *Cytometry*, 1995, 19, 171-176.
3. Szuhai K, Méhes G, Kosztolányi Gy, Kajtár P, Lendvai G, Szanyi I, **Pajor L**: Interfázis citogenetika alkalmazása a DNS-tartalom változásának megítélésére gyermeki akut lymphoid leukaemiában (ALL). *Orvosi Hetilap*, 1997, 138, 3111-3119.
4. **Pajor, L.**: Az interfázis citogenetika alkalmazási lehetőségei az onkopatológiai diagnosztikában. *Orv Hetil*, 1998, 139, 2939-2946.
5. **Pajor L**, Szuhai K, Méhes G, Kosztolányi G, Jáksó P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtár P: Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Cytometry*. 1998, 34, 87-94.
6. Jakab Zs, Balogh E, Kiss Cs, **Pajor L** and Oláh É: Biclinal Chromosomal Aberrations in a Child with Myelodysplastic Syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1999, 108. 13-18.
7. Lacza A, Jáksó P, Kereskai L, Szuhai K, Méhes G, **Pajor L**: A t(12;21) incidenciája és megoszlása a gyermeki akut lymphoblastos leukaemia prognosztikai csoportjaiban. *Orvosi Hetilap*, 2000, 141, 1495-1500.
8. **Pajor L**, Vass JA, Kereskai L, Kajtár P, Szomor A, Egyed M, Iványi J, Jáksó P.: The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl rearrangement. *Leukemia*, 2000, 14, 1122-1126.
9. **Pajor L**, Vass JA, Kereskai L, Szuhai K, Molnár L, Jáksó P: Silent Philadelphia chromosome: a distinct developmental stage in a Philadelphia chromosome positive chronic myeloproliferation? *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000, 118,14-19.
10. Vass JA, Kereskai L, **Pajor L**: Krónikus myeloid leukaemia komplex molekuláris monitorizálása. *Orvosi Hetilap*. 2000, 141, 2279-2285.
11. **Pajor L**, Lacza A, Jáksó P, Kajtár B: Characteristics of TEL/AML-1 positive acute lymphoblastic leukemia in Hungarian children. *Med Pediatr Oncol.* 2001, 37, 409-411.
12. **Pajor L**, Kereskai L, Tamáska P, Vass JA, Radványi G. Coexistence of chronic myeloid leukaemia and hairy cell leukemia of common clonal origin. *Cancer Genet Cytogen.* 2002, 134, 114-117.
13. Kereskai L, Vass JA, Kneif M, **Pajor L**: Correlation Between BCR-ABL Expression and Tumor Burden is Restricted to the Transition from Minor to Major Cytogenetic Response in Interferon Treated CML Patients. *Pathology Oncology Research.* 2003, 9, 174-179.
14. **Pajor L**, Kereskai L, Zsdrál K, Nagy Z, Vass JA, Jáksó P, Radványi G.: Philadelphia chromosome and/or bcr-abl mRNA-positive primary thrombocytosis: morphometric evidence for the transition from essential thrombocythaemia to chronic myeloid leukaemia type of myeloproliferation. *Histopathology.* 2003, 42, 53-60.
15. **Pajor L**, Lacza A, Kereskai L, Jáksó P, Egyed M, Iványi JL, Radványi G, Dombi P, Pál K, Losonczy H: Increased incidence of monoclonal B-cell infiltrate in chronic myeloproliferative disorders. *Modern Pathology*, 2004, 17, 1521-1530.

16. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneifné, Alpár D, **Pajor L**: Automated Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) Analysis of t(9;22)(q34;q11) in Interphase Nuclei. *Cytometry Part A* 2006, 69, 506-514.
17. Kajtár B, Méhes G, Jáksó P, Kereskai L, Iványi JL, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, Dömötör M, **Pajor L**: A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorozása *Orvosi Hetilap*. 2006, 147, 963-970.
18. **Pajor L**, Kajtár B, Jáksó P, Lacza A, László R, Radványi G, Mórocz I, Tóth A, Varga G: Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation of Hodgkin's and Reed-Sternberg cell pheno-and genotype may develop in peripheral T-cell lymphoma. *Histopathology*. 2006, 49, 553-557.
19. Alpár Donat, Béla Kajtár, Mária Kneif, Pál Jáksó, Renáta László, László Kereskai, **László Pajor**: Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence insitu hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 173, 23-30
20. Jáksó P, Kereskai L, Molnár L, **Pajor L** : Lineage specific clonality analysis of chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndrome by human androgen receptor assay. *Pathology Oncology Research*. 2007, 3, 114-122
21. Pajor G, Sule N, Alpar D, Kajtar B, Kneif M, Bollmann D, Somogyi L, **Pajor L**: Increased efficiency of detecting genetically aberrant cells by UroVysion test on voided urine specimens using automated immunophenotypical pre-selection of uroepithelial cells. *Cytometry Part A*. 2008, 73, 259-265.
22. László R, Alpár D, Kajtár B, Lacza A, Ottóffy G, Kiss C, Bartyik K, Nagy K, **Pajor L**: Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up. *Pediatr Blood Cancer*. 2010, 54, 158-160.
23. Smuk G, Illés A, Keresztes K, Kereskai L, Márton B, Nagy Z, Lacza A, **Pajor L**: Pheno- and genotypic features of Epstein-Barr virus associated B-cell lymphoproliferations in peripheral T-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res*. 2010, 16, 377-383.
24. Pajor G, Somogyi L, Melegh B, Alpár D, Kajtár B, Farkas L, Kneif M, Bollmann D, **Pajor L**, Süle N: Urovysion: Considerations on modifying current evaluation scheme, including immunophenotypic targeting and locally set statistically derived diagnostic criteria. *Cytometry A*. 2011, 79A, 375–382.
25. Pajor G, Alpár D, Kajtár B, Melegh B, Somogyi L, Kneif M, Bollmann D, **Pajor L**, Süle N: Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-FISH assay applying a user-trainable workstation. *Microsc Res Tech*. 2012, 75, 814–820.
26. Pajor G, Kajtár B, **Pajor L**, Alpár D: State-of-the-Art Fishing: Automated Analysis of Cytogenetic Aberrations in Interphase Nuclei. *Cytometry Part A*, 2012, 81A, 649–663.
27. Alpár D, Pajor G, Varga P, Kajtár B, Pótó L, Mátics R, Vojcek A, Ottóffy G, Szuhai K, **Pajor L**: Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2014, 61, 2208-2214.

Scientometriai adatok

I. Impakt faktor

1. Összes tudományos közlemény :	137,700
2. Kandidatúrában nem szereplő tudományos közlemény:	131,873
3. Kandidatúrában nem szereplő első és utolsó szerzős tudományos közlemény:	57,049
4. MTA doktori disszertáció tárgyát képező tudományos közlemény:	50,573

II. Hivatkozások

1. Független:	680
2. Összes:	774
3. Kandidatúrában nem szereplő első – utolsó szerzős közlemény, független	238
4. Kandidatúrában nem szereplő első – utolsó szerzős közlemény, összes	294

5. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Prof.Dr. Romhányi Györgynek, Kórbonctan tanáromnak, akitől a mély tudományos igényű orvosi gyakorlat szellemiségét kaptam, Prof.Dr.Kelényi Gábornak, akitől a vizsgálataim tárgyának többségét képező haemopathológiát tanulhattam. Kutatási irányom kialakításához meghatározó technológiai ismereteket nyertem Jan GJ Bauman-tól (Rijswijk, TNO, Hollandia), az *in situ* molekuláris technológiák hajnalán. Ton Raap (Leiden, LUMC, Hollandia) révén kerülhettem egy vadonatúj, pán-európai, interdiszciplináris – biomedicinális fejlesztési irány (AMCA - Automation Molecular Cytogenetic Analysis) fősodrába. A nagyszámú kollaboratív vizsgálati lehetőségért köszönettel tartozom a Magyar Pathologusok Társasága valamint a Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság mindenkori Vezetőségének, a MPT Dunántúli Szekciójában továbbá a MHTT Myeloproliferatív Munkacsoportjában résztvevőknek, a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport centrumai és a felnőtt onkohematológiai ellátó hálózat centrumai valamint szubcentrumai vezetőinek, különösképpen szerzőtársaimnak és a munkálatok mindenkori támogatásáért a POTE / PTE Pathológiai Intézet munkatársainak. Hálás szívvel gondolok családomra és külön köszönettel tartozom a nyugodt háttérrel biztosító feleségemnek.