

dc_1046_15

Magyar Tudományos Akadémia
Doktori pályázat

**Klonális Heterogenitás és Evolúció
Haematologiai Daganatokban**

Pajor László

Pécs
2015

1.TÉMAKÖR: KORRELÁLT FENOTÍPUS / GENOTÍPUS VIZSGÁLAT – KLONÁLIS HETEROGENITÁS / EVOLÚCIÓ HAEMATOLOGIAI DAGANATOKBAN 1.

1.1. In situ molekuláris technikák – Interfázis citogenetika. Történeti áttekintés	1.
1.2. Számbeli kromoszóma eltérések vizsgálata iFISH-sel	4.
1.3. Struktúrális kromoszóma rendellenességek vizsgálata iFISH—sel.....	14.
1.4. Klón specifikus genetikai vizsgálat iFISH-sel.....	15.
1.5. Tumor heterogenitás - klonális expanszió	17.
1.6. Átvezetés.....	17.

2. MÓDSZERTAN – BETEGANYAG 19.

2.1. A hiperdiploid gyermekkori pre-B acut lymphoblastos leukaemia szubklonális architektúrája	19.
2.1.a. Beteganyag	19.
2.1.b. iFISH próbák	19.
2.1.c. A FISH próbák processzálása és jelölése	20.
2.1.d. Hibridizációs eljárás	20.
2.1.e. A multiplex iFISH (MiFISH) jelek kiértékelése	21.
2.1.f. Statisztikai feldolgozás.....	22.
2.2. t(12;21)(p13q22) pozitív gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia:	
Epidemiológia, prognosztika és reziduális betegség.....	24.
2.2.a. Beteganyag és kontrol sejtek	24.
2.2.b. t(12;21) detektálása RT-PCR-rel	25.
2.2.c. Immuncitokémia szkennig mikroszkópos vizsgálatra	25.
2.2.d. Szkennig fluoreszcens mikroszkópia (SFM).....	26.
2.2.e. Sejtazonosítás és immunfenotipizálás SFM-mel	26.
2.2.f. Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció (iFISH)	26.
2.2.g. Relokalizáció és iFISH analízis.....	27.
2.2.h. Áramlási citometria	27.
2.2.i. DNS és RNS alapú, leukaemia klón specifikus molekuláris vizsgálatok	27.
2.2.j. Szkennig fluoreszcens mikroszkópia (SFM) a t(12;21)+ pre-B-pALL monitorizálásában	27.
2.2.k. A kvantitativ DNS, RNS és egysejtes kombinált minimális reziduális betegség (MRD) adatok összehasonlítása	28.
2.3. Ph+/bcr-abl átrendeződés pozitív betegségek vizsgálata iFISH-sel.....	29.
2.3.1. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató acut és chronicus myeloproliferatív betegségek heterogenitásának vizsgálata	29.
2.3.1.a. Beteganyag	29.
2.3.1.b. Molekuláris vizsgálatok.....	29.
2.3.1.b.1. RNS izolálás.....	29.
2.3.1.b.2. RT-PCR.....	29.
2.3.1.b.3. Human androgen receptor assay (HUMARA)	30.
2.3.1.b.4. Bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával.....	30.

2.3.1.c. Sejtvonal specifikus genetikai analízis iFISH-sel és digitális mikroszkópiával	31.
2.3.1.d. Áramlási citometriás fenotipizálás	31.
2.3.1.e. Hisztológia–Citokémia – Immunhisztológia	32.
2.3.1.f. Képanalízis–Morfometria	32.
2.3.1.g. Áramlási citometriás sejtszortírozás	33.
2.3.1.h. Metafázis citogenetika	33.
2.3.1.i. Statisztikai analízis	33.
2.3.2. Ph+ /bcr-abl átrendeződést mutató ritka kórképek.....	34.
2.3.2.a. Betegtörténet – Beteganyag	34.
2.3.2.b. Citológia-Hisztológia-Immunhisztológia	35.
2.3.2.c. Molekuláris vizsgálatok	35.
2.3.2.c.1. RNS izolálás	35.
2.3.2.c.2. DNS extrakció paraffinba ágyazott anyagból.....	35.
2.3.2.c.3. M-bcr ill. m-bcr RT-PCR és szekvencia analízis-I	35.
2.3.2.c.4. IgH génátrendeződés és szekvencia analízis-II	35.
2.3.2.c.5. Szomatikus hipermutáció analízis.....	36.
2.3.2.c.6. Human androgen receptor assay (HUMARA).....	37.
2.3.2.c.7. Bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával	37.
2.3.2.c.8. Sejtvonal specifikus interfázis citogenetikai analízis	37.
2.3.2.d. Áramlási citometriás fenotipizálás	37.
2.3.3. Chronicus myeloid leukaemia molekuláris monitorizálása	38.
2.3.3.a. Beteganyag	38.
2.3.3.b. Molekuláris vizsgálatok	38.
2.3.3.b.1. RNS izolálás.....	38.
2.3.3.b.2. Reverz transzkripció (RT)	38.
2.3.3.b.3. Kvalitatív polimeráz láncreakció (PCR)	39.
2.3.3.b.4. Kvantitatív bcr-abl expresszió vizsgálat.....	39.
2.3.3.c. bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával	42.
2.3.3.d. Ph kromoszóma kimutatás kariotipizálással.....	42.
2.3.3.e. Automatizált iFISH analízis. Citometria	42.
2.4. Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív B-sejtek klonális fejlődése T-sejtes malignus lymphomákban	44.
2.4.a. Betegtörténet – Beteganyag	44.
2.4.b. Hisztológia és immunhisztológia	45.
2.4.c. EBER és human mRNS in situ hibridizáció paraffinos metszeteken	45.
2.4.d. Szuszpenzióban, paraffinos blokkból izolált magokon elvégzett EBER-FISH	46.
2.4.e. EBER-FISH pozitív paraffinos magok flow citometriás szortírozása.....	46.
2.4.f. Teljes genom amplifikáció paraffinos magokból extrahált DNS-en.....	46.
2.4.g. T-sejt receptor gamma (TCR- γ) génátrendeződés PCR vizsgálat	47.
2.4.h. IgH génátrendeződés és szekvencia analízis-II	47.
2.4.i. Szomatikus hipermutáció analízis	47.
<u>3. KLONÁLIS HETEROGENITÁS ÉS EVOLÚCIÓ HAEMATOLÓGIAI DAGANATOKBAN</u>	48.
3.1. A hiperdiploid gyermekkori pre-B acut lymphoblastos leukaemia szubklonális architektúrája	48.
3.1.a Bevezetés	48.

3.1.b. Eredmények	49.
3.1.c. Megbeszélés.....	59.
3.2. t(12;21)(p13q22) pozitív gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia:	
Epidemiológia, prognosztika és reziduális betegség.....	69.
3.2.a. Bevezetés	69.
3.2.b. Eredmények.....	71.
3.2.c. Diskusszió és következtetések	79.
3.3. Ph+/bcr-abl átrendeződés pozitív betegségek vizsgálata iFISH—sel	85.
3.3.1. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató akut és chronicus myeloproliferatív	
betegségek heterogenitásának vizsgálata	85.
3.3.1.a. Bevezetés	85.
3.3.1.b. Eredmények	87.
3.3.1.c. Diskusszió	93.
3.3.2. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató ritka kórképek	98.
3.3.2.a. Bevezetés	98.
3.3.2.b. Eredmények	99.
3.3.2.c. Diskusszió	111.
3.3.3. A chronicus myeloid leukaemia molekuláris monitorizálása	116.
3.3.3.a. Bevezetés	116.
3.3.3.b. Eredmények	118.
3.3.3.c. Diskusszió	122.
3.4. Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív B-sejtek klonális evolúciója T-sejtes	
lymphomákban	127.
3.4.a. Bevezetés	127.
3.4.b. Eredmények.....	128.
3.4.b.1. Patohisztológiai leletek	128.
3.4.b.2. Immunohisztológiai leletek	131.
3.4.b.3. Molekuláris leletek	132.
3.4.c. Diskusszió	136.
3.5. Citogenetikai aberrációk automatizált vizsgálata interfázis magokban	141.
3.5.1. Manuális iFISH kiértékelés	141.
3.5.2. Automatizált (gépi) iFISH kiértékelés.....	142.
3.5.2.1. Az automatizáció hardver és szoftver igénye.....	142.
3.5.2.2. A szoftver detektálási képességének 'kifejlesztése' ('training')	143.
3.5.2.3. Az automatizált vizsgálatok sorrendje	143.
3.5.3. Az iFISH automatizáció története és applikációi	144.
3.5.4. Perspektívák	147.
<u>4. FŐBB KÖVETKEZTETÉSEK – ÚJ EREDMÉNYEK</u>	149.
<u>5. IRODALOMJEGYZÉK.....</u>	156.
5.1 Hivatkozások listája	156.
5.2.1 Hivatkozások listája	160.
5.2.2. Hivatkozások listája	161.

5.2.3. Hivatkozások listája	162.
5.2.4. Hivatkozások listája	164.
5.3.1 Hivatkozások listája	165.
5.3.2 Hivatkozások listája	167.
5.3.3 Hivatkozások listája	173.
5.3.4 Hivatkozások listája	181.
5.3.5 Hivatkozások listája	184.
<u>6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</u>	190.

Rövidítések

aALL	felnttktori ALL
aCGH	array comparative genomic hybridization
Ag-NOR	ezüstözött nukleoláris organizációs régió
ALL	acut lymphoblastos leukaemia
AML	acut myeloid leukaemia
BC	blastos crisis
B-ML	B-sejtes malignus lymphoma
CALLA	common acute lymphoblastic leukaemia antigen
CCA	konvencionális citogenetikai analízis
CEL/HES	chronicus eosinophilsejtes leukaemia / hypereosinophilia szindróma
CEP	centromerikus próba
CGL	chronicus granulocytás leukaemia
cHL	klasszikus Hodgkin lymphoma
CIN	kromoszóma instabilitás
CLL	chronicus lymphoid leukaemia
CML	chronicus myeloid leukaemia
CML-LBC	CML lymphoblastos crisis
CML-MBC	CML myeloblastos crisis
CNA	kópia szám változás
DI	DNS index
DLBCL	diffúz nagy B-sejtes lymphoma
EBER	Epstein Barr kódolt RNS
EBNA	Epstein Barr nukleáris antigén
EBV	Epstein Barr vírus
ET	essentialis thrombocythaemia
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FL	folliculáris lymphoma
HCL	hajas sejtes leukaemia
HD	hiperdiploid
HE	hematoxin-eosin
HeH	magas hiperdiploid
HeL	alacsony hiperdiploid
HORU	higher order repeat unit
HRS	Hodgkin Reed Sternberg
HUMARA	humán androgén receptor assay
iFISH	interfázis FISH
iFISH-PV	perifériás vér iFISH
IFN- α	interferon- α
IgH/R	Immunoglobulin nehézlánc gén / átrendeződés
IgV _H	IgH variábilis régió
iMN ₈	modális kromoszóma szám 8-paraméteres iFISH alapján
I-PEP	improved primer extension preamplification
ISH	in situ hibridizáció
KDe	kappa deletáló elem
KIIF	Kombinált Immunfenotípus Interfázis FISH
LBC	large B-cells
LCSC	lymphoid committed stem cell
LMP-1	EBV latens membrán protein-1

dc_1046_15

LSI	lokusz specifikus próba (identifier)
MCL	köpenysejtes lymphoma
MDS	myelodysplasticus szindróma
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MiFISH	multiplex iFISH
ML	malignus lymphoma
MM	myeloma multiplex
MMR	major molekuláris válasz
MN	modális szám
MPN/B	myeloproliferatív neoplasia / betegség
MPN-NOS	MPN not otherwise specified
MRB	minimális reziduális betegség
MZL	marginalis zóna lymphoma
pALL	gyermekkori ALL
PCR	polimeráz láncreakció
Ph ⁺	Philadelphia kromoszóma negatív / pozitív
PTCL	perifériás T-sejtes lymphoma
PV	polycythaemia vera
Q-PCR	kompetetív, kvantitatív PCR
Q-RT-PCR	kompetetív, kvantitatív RT-PCR
RQ-PCR	valós idejű PCR
RQ-RT-PCR	valós idejű RT-PCR
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
SCF-R	őssejt faktor receptor
sDNS	szatellita DNS
SFM	scanning fluorescence microscope
TCR- γ/δ	T-sejt receptor gamma / delta
TKI	tirozin kináz inhibitor
UCSC	el nem kötelezett őssejt

1. TÉMAKÖR: KORRELÁLT FENOTIPUS / GENOTIPUS VIZSGÁLAT – KLONÁLIS HETEROGENITÁS / EVOLÚCIÓ HAEMATOLOGIAI DAGANATOKBAN

A XIX. században kifejlődött fénymikroszkópos morfológia a tumorok patológiai vizsgálatában ma is alapvető, így nélkülözhetetlen. Az immunfenotipizálás kb 30 - 40 évvel ezelőtti bevezetésével (áramlási citometria, immunhisztológia) a tumorsejt karakter újabb szintje vált vizsgálhatóvá, mely – legalábbis a széleskörűen alkalmazott immunhisztológia vonatkozásában – *in situ* korrelált morfológiai és fenotípus megítélést tett lehetővé. A múlt század utolsó évtizedétől kifejlődő genom vizsgálati eljárások jelentős része homogénnek vélt tumorsejt mintákból extrahált DNS ill RNS vizsgálaton alapult. Ez nem csak az inhomogenitásból eredő tévedés lehetőségét jelentette, de alkalmazásukkal elveszik a fenotípushoz direkt asszociált genotípus vizsgálatának lehetősége is.

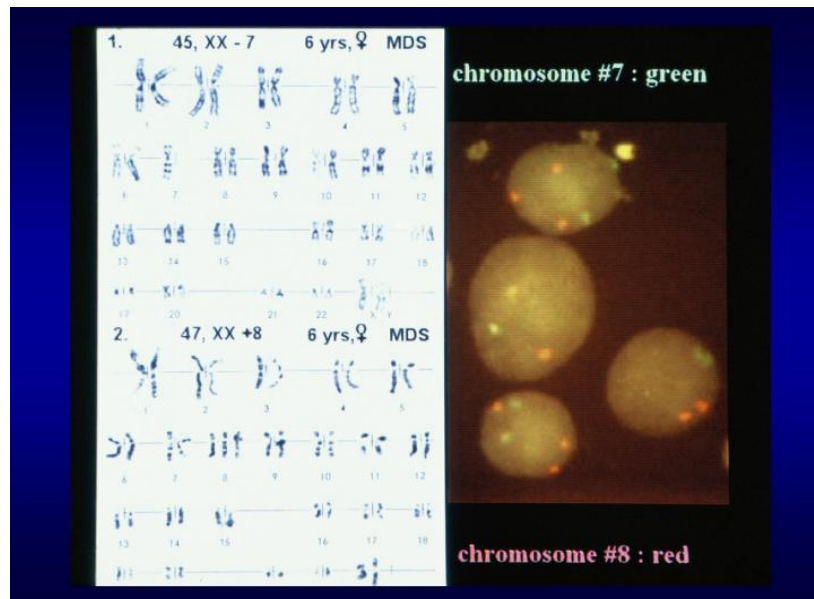
A morfológia / fenotípus illetve a genotípus közvetlen, korrelált vizsgálata a technika mai állása mellett sem lehetséges minden esetben, kivitelezésükben azonban esszenciálisak az *in situ* molekuláris technikák. Ezek típusait és alkalmazhatóságukat az alábbiak foglalják össze.

1.1. *In situ* molekuláris technikák – Interfázis citogenetika. Történeti áttekintés

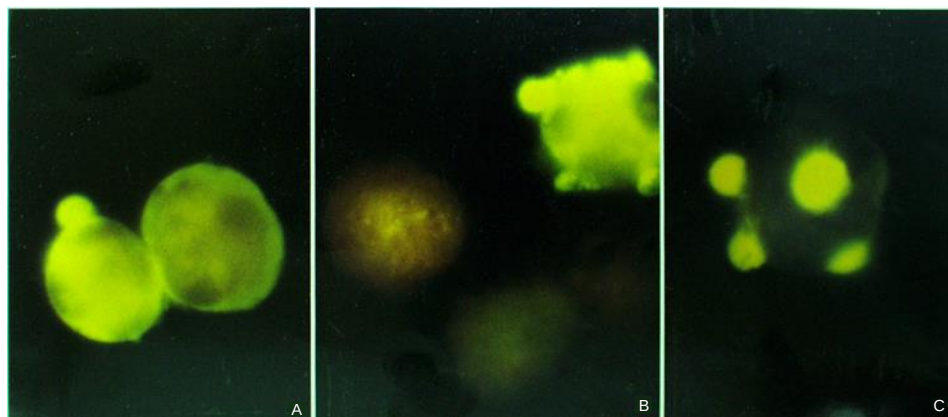
Nukleinsavak hisztológiai és citológiai preparátumokban történő, mikroszkóppal vizsgálható manipulálását *in situ* molekuláris módszereknek nevezzük. Ezen módszerek nem mindegyike, de döntő többsége *in situ* hibridizáción (ISH), azaz specifikus nukleinsav szekvenciáknak komplementer továbbá jelölt, tehát vizualizálható, próba DNS vagy RNS szekvenciákkal történő reasszociációján 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 FISH-nek / citogenetikának (iFISH) nevezünk. A konvencionális citogenetika az iFISH-től döntően abban különbözik, hogy míg az előbbi – feloldásának határain belül – a teljes genom és annak eltérései áttekintését jelenti, az utóbbi célkérdésekre ad igen vagy nem választ. Figyelemre méltó különbség továbbá, hogy az iFISH sejtenyésztés nélkül ad genetikai és morfológiai információt – elkerülvén ezáltal a tenyésztés során potenciálisan fellépő nehézségeket: a kellő számú és minőségű metafázisok hiányát illetve az ún. klonális szelekciót (1.1.1. ábra). A patológus szemszögéből különös jelentőséggel bír, hogy alkalmazásának nem szab határt a formalin fixálás és a paraffinba történő beágyazás, ezért archivált anyagok metszetein illetve azokból izolált sejtmagokon is elvégezhető.

Az interfázis citogenetikát felhasználhatjuk numerikus és strukturális kromoszóma anomáliák, patognomikus transzlokációk valamint – digitális képi technikákkal történő együttes alkalmazás esetén – sejtvonal specifikus genetikai eltérések vizsgálatára. Az interfázis citogenetika, a fénymikroszkópia és az immun-citológia/hisztológia digitális képi technikákkal történő együttes alkalmazása alkalmas arra, hogy ugyanazon sejtobjektumról morfológiai, immunfenotípus és genotípus információkat szolgáltatson, mely mérföldkő lehet a patomorfológiai diagnosztikában.

Az ISH végzése során a target valamint a próba egyaránt lehet DNS vagy RNS. Az olyan ISH esetében, ahol a target RNS, általában gén expresszió vizsgálatról, mRNS hibridizációról van szó. Ez – bár a DNS alapú hibridizációnál az RNS rendkívüli instabilitása miatt jóval speciálisabb körülményeket igényel – standardizálható (2). Elsősorban a tömegesebb RNS (rRNS, haemoglobin, B-sejt könnyűlánc, vírus asszociált) ISH-s szignálok kvantitálhatók flow citometriásan vagy digitális mikroszkópia segítségével és a nem *in situ*, tehát extrahált nukleinsav vizsgálati körülmények között a 90-es évek közepe óta hatalmas karriert befutó DNS chip technológiák egyik alapját képezik (1.1.2. ábra; 3, 4, 5, 6, 7, 8). A sejt – mikroszkóp alapú vizsgálati rendszerekben azonban annak, hogy a DNS alapú, interfázis magban elvégzett ISH jelentősen nagyobb karriert látszik befutni nem csak az az oka, hogy a nem radioaktív RNS hibridizáció során a legújabb amplifikációs technikákat is felhasználva sem sikerül megbízhatóan detektálni az alacsony kópia számú RNS tartományt (9). Az ok sokkal inkább az, hogy a gén expressziót sokkal egyszerűbb a végtermék, a protein szintjén, immunhisztológiailag vizsgálni a patológiai diagnosztikában. A transzkripció valamint a transzláció külön-külön vagy szimultán történő vizsgálata csak nagyon speciális, általában experimentális körülmények között igényelt. Celluláris DNS szekvenciák citológiai-hisztológiai körülmények között történő feltüntetése azonban csak iFISH-sel lehetséges.



1.1.1. ábra Két különböző időpontban elvégzett metafázis citogenetikai vizsgálat 7-es monosomiát és 8-as disomiát (1) illetve 7-es disomiát és 8-as trisomiát (2) mutatott. A jobb ábrarészlet mutatja az MDS-es gyermek csontvelő sejtjein a 7-es (zöld) illetve a 8-as (piros) kromoszóma specifikus próbákkal elvégzett kétszínű FISH vizsgálat eredményét, mely szerint a -7 és a +8 rendellenesség két különböző klónban volt jelen (1).



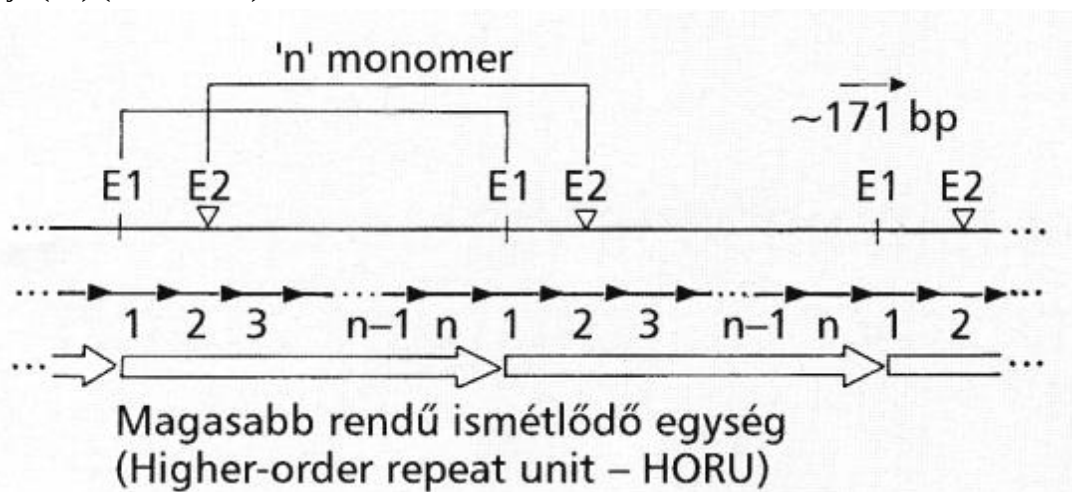
1.1.2. ábra A humán 28S rRNA antisense próbával hibridizált kontrol (A) valamint hemin (B) és forbol-mirisztát-acetát (PMA) (C) kezelt sejtek fluoreszcens mikroszkópos képe. x720 (6).

Bár elsőként 1969-ben, egymástól függetlenül, *Pardue* és *Gall* valamint *John* és *munkatársai* számoltak be génszekvenciáknak (rDNS) interfázis magokon ISH-val történő sikeres kimutatásáról, a módszert csak 1986-tól, *Cremer* nyomán nevezik interfázis citogenetikának (10, 11, 12). A történelminek tekinthető közlésben a szerzők az iFISH napjainkig is érvényes egyik legproblematiszabb jellegét is világosan megfogalmazták: ‘... *the major technical problems in the hybridization technique is that of denaturing the cellular DNA without destroying the morphology*’ (10). A kezdeti időkben a hibridizációs termék előhívására csak a radioizotópos jelölés állt rendelkezésre, mely ugyan nagy érzékenységet, de alacsony térbeli feloldást biztosított. Ez az oka, hogy több mint egy évtized kellett a módszer orvosi-biológiai-diagnosztikai alkalmazása igazi fellendülésének kezdetéhez. A lökést a hibridtermék fluoreszcens jelölésének kidolgozása adta meg. Ez kezdetben a kémiai módosított nukleotidok direkt fluoreszcens jelölését jelentette (1980), majd a polinukleotidok biotin jelölésének kidolgozásával, (1981), a vizualizálás spektruma valóban szélessé vált (13, 14). A fluoreszcens próba technológiában újabb mérföldkövet jelentett a kétszínű, majd a háromszínű detektálás, a ‘combinatorial color-coding’ (M-FISH), a ‘ratio color-coding’ majd a ‘COmbined Binary RAtio (COBRA)’ jelölés (15, 16, 17, 18, 19). 1986-ra a kimutathatóság alsó határa 50 kilobázisra (kb) csökkent (20), majd – elsősorban az anyagfeltárási technikák fejlődésének eredményeképpen – sor került a módszer rutin paraffinos anyagokon történő alkalmazásának bevezetésére is (21). A 90-es években nem sikerült a fenti érzékenységet hagyományos mikroszkópia segítségével meghaladni, viszont a nagy érzékenységre képes kamerák (digitális mikroszkópia) alkalmazásának bevezetésével a szenzitivitás, a néhány száz kb-ra tehető feloldás mellett, 1-5 kb-ra csökkent (22, 24). A legújabb idők kihívását a genomban egy kópiában előforduló szekvenciákban kialakuló pontmutációk iFISH-sel történő detektálása jelenti. Az utóbbiak azonban részben experimentális körülményeket jelentenek illetve fejlesztés alatt álló területek. A patológiai diagnosztika jelentős alkalmazási területre talált az 50-100 kb érzékenységi nagyságrend szintjén is, melynek főbb vonulatai az alábbiak.

1.2. Számbeli kromoszóma eltérések vizsgálata iFISH-sel

A magasabb rendű eukaryoták genomjának 10-20%-át, a sajátos bázisösszetételének betudhatóan a genom fő tömegét adó DNS-től denzitása alapján elkülönülő, azt „kísérő”, szatellita DNS (sDNS) alkotja (22). Az sDNS különböző osztályainak közös vonása, hogy rövidebb-hosszabb alapegységeik (monomer) ezerszer-milliószor ismétlődnek a genomban, ezért tandem (repeat) szekvenciáknak nevezik őket. A humán sDNS egyik formája az alfa-

szatellita DNS (α -sDNS), mely a kromoszómák (peri)centromerikus régiójára lokalizálódó, nem α -sDNS-tól mentes, a teljes genom mintegy 2-5%-át kitevő repetitív DNS (25). Az α -sDNS alapegységét az elsőként az afrikai zöld majmok genomjában megtalált, 172 bp alfoid monomerhez szekvenciájában és organizációjában is nagyon hasonló 171 bp hosszú monomer alkotja (26) (1.2.1. ábra).



1.2.1. ábra: A kromoszómaspecifikus alfa szatellita DNS hierarchikus szerveződése. Az E1 és E2 hipotetikus restriktációs endonukleázok, melyek a magasabb rendű repetitív egységen belül egyszer hasítanak (26)

Leglényegesebb vonása a speciális, magasabb rendű hierarchikus rendezettség, melynek lényege a következő. A 171 bp monomerek lineáris multimereket hoznak létre, melyekben az intermonomer DNS szekvencia divergencia eléri a 20-40%-ot is. Így az 1.2.1. ábrán bemutatott, egy kromoszómán elhelyezkedő monomer 1, 2 és 3 olyan mértékben különbözik egymástól, mint a más kromoszómákon elhelyezkedő α -sDNS monomerektől. Azonban egy jellegzetes számú (n) monomert követő monomer ($n+1$) újra a monomer 1-gyel lesz gyakorlatilag (<2% divergencia) identikus. Az n hosszúságú lineáris multimert magasabb rendű repetitív szekvenciának (higher order repeat unit, HORU) nevezik. Több mint 30 α -sDNS alcsaládot írtak le (27), melyből 28-nak, összesen 293 személy genomjának vizsgálata alapján, a konszenzus szekvenciáját is megállapították. Az α -sDNS alcsaládok különböznek a HORU-k nagyságában (monomerek száma), a HORU-k kópia számában és – értelemszerűen – a primer szekvenciájukban. Ezekből következik kromoszóma specificitásuk, mely azonban nem teljeskörű. Az 5-ös vs 19-es, a 13-as vs 21-es valamint a 14-es vs 22-es kromoszómák vonatkozásában nincs olyan HORU, amelyek ne mutatnának jelentős átfedést, így kereszthibridizációt. (Valójában ez a 14-es és 22-es kromoszóma esetében nem áll, mivel

mindkettőre találtak specifikus α -sDNS alcsaládot, de ezek a bennük előforduló HORU-k alacsony kópia száma miatt nem vizualizálhatók [27]).

A numerikus kromoszómális aberrációk kromoszóma specifikus próbákkal történő detektálásának alapja az, hogy normál, diszómias garnitúra esetén a két homológ szomatikus kromoszómának megfelelően két hibridizációs szignált kapunk sejtmagokként. Keresztreagáló próbáknál (5/19-es, 13/21-es, 14/22-es kromoszómák) a disomiát 4 szignál jelzi, míg XY genotípus esetén a szexkromoszómák tekintetében 1-1 intranukleáris hibridizációs jel látható. Kevesebb vagy több jel az adott kromoszóma nyerését vagy vesztesét jelzi, mely a keresztreagáló próbák esetén a két kromoszóma vonatkozásában pontosan nem identifikálható (1.2.2.a-b. ábrák). Szerencsés körülmény, hogy a szignálszám a sejtciklusban elfoglalt pozíciótól nem függ; az áramlási citometriásan szortírozott G_0 - G_1 , S valamint G_2 fázisban levő sejtek (peri)centromer régióra specifikus jeleinek száma azonos, mely a normál G_2 sejtek és a valódi (daganatos) tetraszómia elkülönítésének alapja (29). Az iFISH szignálok kiértékelésének biológiai interpretálásánál tudatában kell lenni annak, hogy a szignálszám csökkenése nem feltétlenül jelenti a teljes kromoszóma hiányát vagy egyáltalán bármi rendellenességet. Ritka lehetőségként előfordulhat a (peri)centromerikus repetitív szekvenciák specifikus deletiója (30). A másik lehetőség, hogy a kromoszóma specifikus HORU-k kópia számában individuális különbségek is lehetnek. Így előfordulhat olyan genom, amelyben 1-1 kromoszóma a felismerés alapjául szolgáló szekvenciák alacsony száma miatt a detektálhatósági szint alá esik (31). Fordítva, kromoszóma non-diszjunkció esetén a centromerikus régió utódsejtben történő szétválásának esetleges hiánya miatt a többlet genetikai anyag – hasonlóan a fiziológiás G_2 tetraszómiához – iFISH technikával nem ábrázolódik, és triszómia helyett diszómiának megfelelő két szignált kapunk.

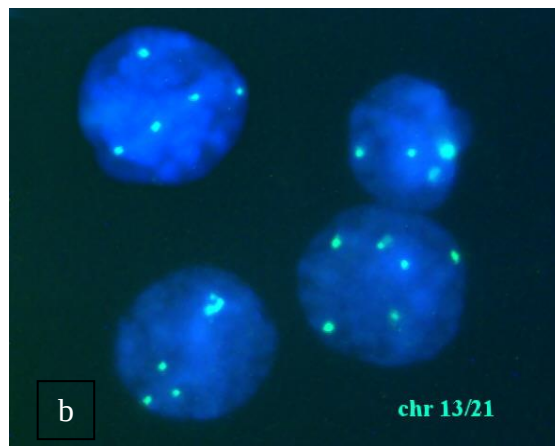
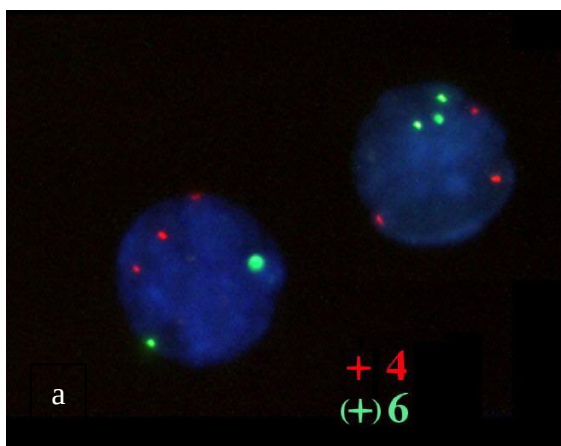
Az onkopatológiai diagnosztikában a DNS tartalom vizsgálata – elsősorban az automatizált és digitális technikákat felvonultató modern áramlási és statikus citometria elterjedésének tulajdoníthatóan – különösen előtérbe került az utóbbi két évtizedben. Mai ismereteink szerint a diploid DNS tartalom nem egész számú többszöröse – szemben az endoreduplikáció révén kialakuló egész számú sokszorosodással – daganatos növekedésre utaló aneuploiditásnak felel meg. Az aneuploiditás vizsgálatának ott van értelme, ahol a DNS tartalom kimutatásának terápiás vagy prognosztikus jelentősége van, így például a kifejezett malignitású metasztatikus daganatokban magas arányban előforduló aneuploiditás kimutatásának kevés jelentősége van. Nem mutatkozott azonban egyértelműnek az aneuploiditás prognózisra gyakorolt hatása primer daganatok széles körének átvizsgálása alapján sem. Egyes daganatokban (hólyagrák, colon carcinoma, nagysejtes tüdőrák, ovárium

tumor, veserák, stb.) a negatív prognosztikai hatás egyértelmű, míg másokban (emlő, cervix carcinoma, kissejtes tüdőrák, stb.) az aneuploiditás nem bizonyult független prognosztikai faktornak, az összefüggés bizonytalan vagy egyáltalán nem létezik (32, 33). Savós hártályakon terjedő daganatok – lévén metasztatikus tumorok – nagy százalékban mutatnak aneuploiditást, melynek kimutatása jelentősen, akár 40%-kal is növelheti a citológiai vizsgálat hatékonyságát (34). Vannak olyan malignómák is (pl. a gyermekkori pre-B-lymphoblastos malignus lymphoma/leukaemia), melyekben nem csupán az aneuploiditás jelenléte, de az aneuploiditás mértéke (a daganatos klón DNS tartalma vs a normál diploid DNS mennyiség = DNS index [DI]) is meghatározó és az egyik legfontosabb, független prognosztikai faktor (35, 36).

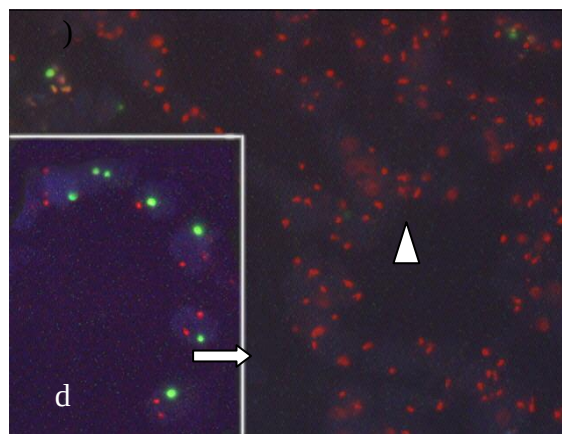
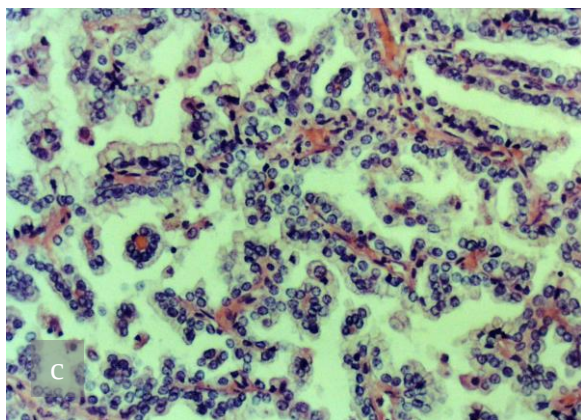
Áramlási vagy statikus DNS citometriával a sejtmagok teljes DNS tartalmát vizsgáljuk, mellyel a durva aneuploiditás könnyen felismerhető, ugyanakkor ezen módszerek feloldásának határai vannak. A kromoszóma méretétől függően kb. 2 kromoszóma nyerése (triszómiája) vagy vesztese (monoszómiája) – mely diszkrét aneuploiditás, de jelentős genomikus változás – méréstechnikai okoknál fogva nem feltétlenül mutatható ki ezen citometriai eljárásokkal (37). Ugyancsak nem nyilvánul meg aneuploiditásban a fenti citometriai vizsgáló módszerekkel az az eset, amikor ugyanannyi (vagy kb. ugyanannyi, - a klón százalékos arányától, a kromoszóma nagyságától is függően) kromoszóma mutat triszómiát és monoszómiát, ezáltal egymás ellentétes hatásait teljes DNS tartalom szinten mintegy kiegyensúlyozva (pseudo-diploidia) (1.2.3 ábra).

Tehát mindazon esetekben, ahol egyébként az aneuploiditás kimutatásának prognosztikai–terápiás vonzatai vannak, továbbá a statikus és áramlási citometria feloldási korlátai miatt az eltérések nem mutathatók ki, vagy specifikusan bizonyos kromoszóma(ák) eltérései meghatározóak a diagnózis szempontjából, a numerikus kromoszóma eltérések interfázis citogenetikai eljárással történő vizsgálata jelentőséggel bír és interfázis magon az egyetlen eljárás a kérdés megválaszolására. Az interfázis citogenetikának különös jelentősége és feloldó ereje van a daganatokban gyakori – de a humán genetikában is komoly diagnosztikai nehézségeket okozó – mozaicizmus vizsgálatában is (38, 1). A patológiai rutin diagnosztika szempontjából értékes, hogy a (peri)centromerikus próbákkal történő ISH alkalmazható metszet (fagyasztott v. formol-paraffinos) körülmények között is (21), illetve a kívánt szekvenciák ilyen jellegű anyagokon más technikával, pl. az ún. „primed in situ labeling” (PRINS) eljárással is előhívhatók (39) (1.2.2.c-d. ábrák). Bár különböző előkezelések a nukleoprotein komplex feltárására, a target DNS-hez történő jobb hozzáférhetőségének biztosítására ajánlottak (40, 41, 28), nem a technikai kivitelezhetőség, hanem az eredmény kiértékelése és interpretálása problematikus. Paraffinos metszet

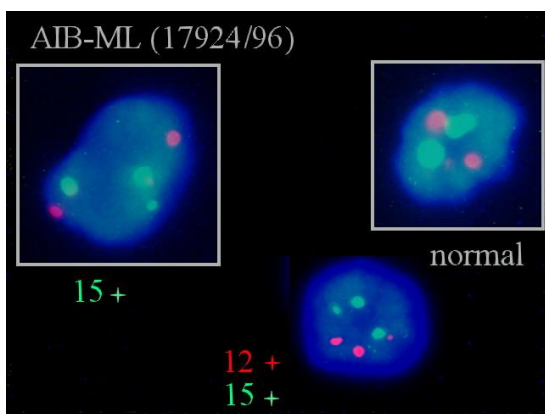
körülmények között ugyanis a magok jelentős részének csak egy szelete kerül a néhány mikrométer vastag metszetbe, így ha a hibridizációs próbával kimutatandó kromoszóma részlet a mag-szeleten kívül helyezkedett el, értelemszerűen hibridizációs szignált nem kapunk, fals negativitás (fals monosomia, disomia, stb.) áll elő. Ezt a jelenséget 'trunkációs effektus'-nak hívjuk. Ennek tudható be, hogy a numerikus kromoszóma eltérést hordozó malignus klón arányának paraffinos metszet körülmények között legalább 25%-nak kell lennie, hogy felismerésre kerüljön (42). Ez jelentősen eltér a citológiai preparátumokon (egész magok) nyert észleleteinktől, ahol – a keresztreagáló és a következetesen gyengébb eredményt adó 15-ös kromoszóma (peri)centromerikus próbáitól eltekintve – az összes szomatikus valamint nemi kromoszóma vonatkozásában a normális kromoszóma garnitúra kimutathatósága, továbbá a fals kromoszóma veszteség illetve nyerés 93.7%-98.6%-nak, 1.9%-4.8%-nak illetve 0-3.6%-nak adódott (43). A trunkációs effektus leküzdhető vastag (20 µm-es) paraffinos metszetek konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal történő letapogatásával, ez azonban még a speciális laboratóriumok számára is rendkívül technika-, munka- és időigényes, rutinszerűen jelenleg még nem alkalmazható (44). A metszeteken elvégzett vizsgálat értékelhetőségének korlátait figyelembe véve hasznos alternatíva a paraffinos blokkból izolált magok interfázis citogenetikai analízise. A statikus vagy áramlási citometria számára történő, hagyományos magizolálási procedúrával (45) lényegében megegyező eljárás során a trunkációs effektus hátrányaival nem kell számolni, igaz a morfológia-topográfia is elvész. Ennek ellenére célkérdések megválaszolására az eljárás nagyon jól hasznosítható (1.2.2.e-f-g. ábrák).



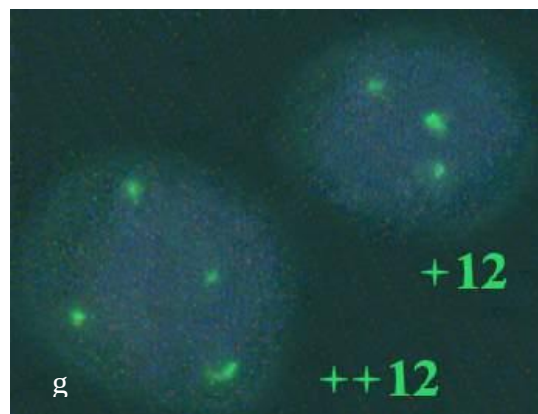
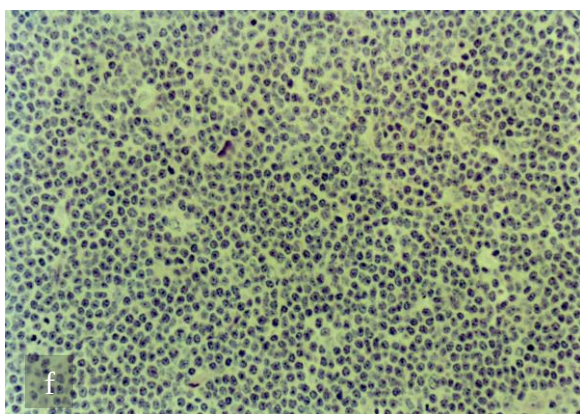
1.2.2.a-b. ábra: Hiperdiploid (DNS index: 1,28) gyermekkori „common” acut lymphoblastos leukaemia. Az alkohol fixált sejtsuszpenzióból készült citológiai preparátumokon kromoszóma specifikus (a) valamint keresztreagáló (b) próbákkal elvégzett iFISH reakció mutatja a 4-es, 6-os illetve 13/21-es kromoszómák trisómiáját és egyben a klonális progressziót (28).



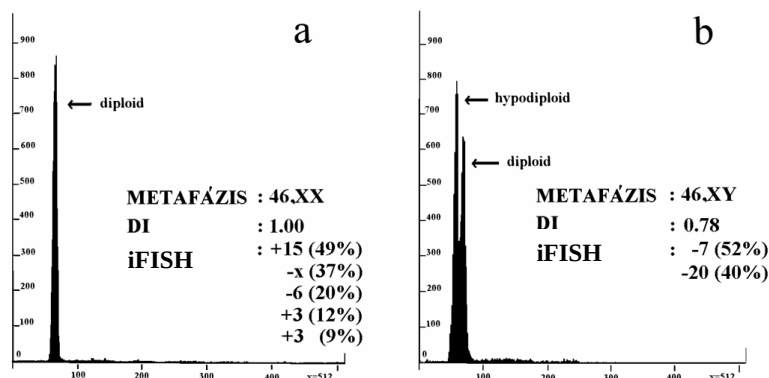
1.2.2.c-d. ábra: Papilláris renocelluláris tumor paraffinos metszetről készült fénymikroszkópos képe (c, HE, x 350) valamint a cryostátos metszeten készült 17-es kromoszóma iFISH reakciója (d, x 650). A Heidelbergi Klasszifikáció (87) értelmében az adenoma vs carcinoma differenciál diagnosztikájában benignus lézió mellett szól egyéb kromoszóma eltérések hiányában a 7-es, 17-es trisómia és az Y kromoszóma vesztese (x). Inzert: normál tubulus megtartott Y és 7-es kromoszóma garnitúrával (28) (→).



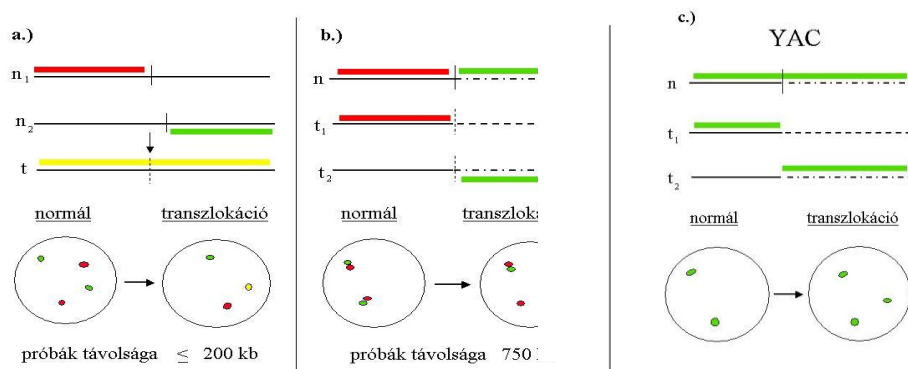
1.2.2.e. ábra: T-sejt receptor klonális génátrendeződést mutató angioimmunoblastos malignus lymphoma paraffinos blokkjából izolált magokon elvégzett iFISH reakció, mely a 12-es és a 15-ös kromoszóma trisómiáját valamint a klonális progressziót mutatja. Az angioimmunoblastos lymphadenopathia-szerű atípusos lymphoprolifерációk esetén a tumoros transzformáció megítélése morfológiailag sokszor nem egyértelmű, ebben a citogenetikai abnormalitások illetve a klonális átrendeződés kimutatása nyújt támpontot (28).



1.2.2.f-g. ábra: Chronikus lymphoid leukaemia (CLL) fénymikroszkópos képe (f, HE, x 250) valamint a paraffinos blokkból izolált magon elvégzett, 12-es triszómiát mutató iFISH reakciója (g, x 1400). A morfológia alapján nem azonosítható a CLL 12-es tri-/tetraszómiát mutató, prognosztikailag előnytelen szubtípusa (28).



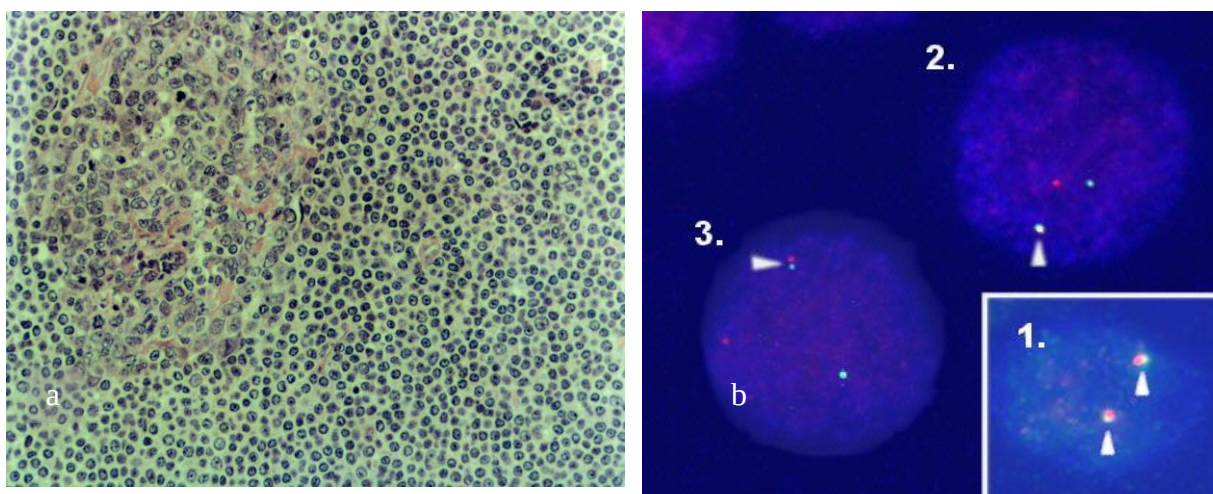
1.2.3. ábra: Áramlási citometriás DNS eloszlás görbék kezletlen gyermekkori akut lymphoblastos leukaemiás betegek csontvelő mintáin. a. diploid DNS eloszlás a jelentős számú, iFISH-sel kimutatott számbeli kromoszóma eltérés ellenére (pseudo-diploidia); b. összhangban a iFISH-sel kimutatott kromoszóma vesztesékekkel hipodiploid aneuploid populáció ábrázolódik a DNS eloszlás görbén (43).



1.3.1. ábra Transzlokációk FISH-IPC technikával történő kimutatásának néhány változata. a: A piros és zöld színnel jelölt próbák a transzlokáció eredményeképpen egymás mellé kerülő régiókkal hibridizálnak. Ha a töréspont régió kb. 200 kb-nál nem hosszabb, akkor a transzlokáció következtében - a szignáloknak a beeső fény irányától történő elhelyezkedésétől függetlenül - ún. fúziós szignál (sárga) keletkezik a feloldás határa miatt (1.1.3.2.d. ábra).

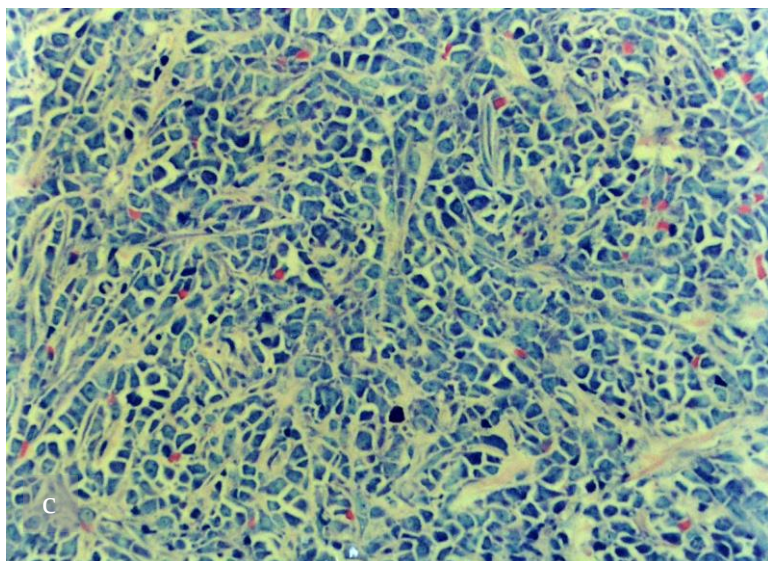
b: A piros és zöld színnel jelölt próbák a transzlokációban részt vevő két kromoszóma egyikén a töréspont régió két oldalán elhelyezkedő szakaszokkal hibridizálnak. Kb. 200 kb-nál hosszabb töréspont régió esetén - a szignálok térbeli orientációjának függvényében - vagy fúziós szignál, vagy - gyakrabban - szeparált, de kolokalizált szignálok jelzik a normális kromoszómát. A szignálok térbeli eltávolodása kromoszóma törésre utal (l. 1.3.2.b. ábra 2-es és 3-as jelzésű sejtek).

c: Különösen hosszú töréspont régió esetén alkalmazhatók az egy Mb nagyságrendet képviselő, a töréspont régiót átfedő YAC klónok. A kromoszóma törése esetén az egy kromoszómát reprezentáló egyetlen szignál kettőre hasad, a törtvégek a próba hosszúsága miatt vizualizálhatók. n_1 , n_2 : normál kromoszómák; t_1 , t_2 : transzlokációban részt vevő vagy törést szenvedett kromoszómák (28).

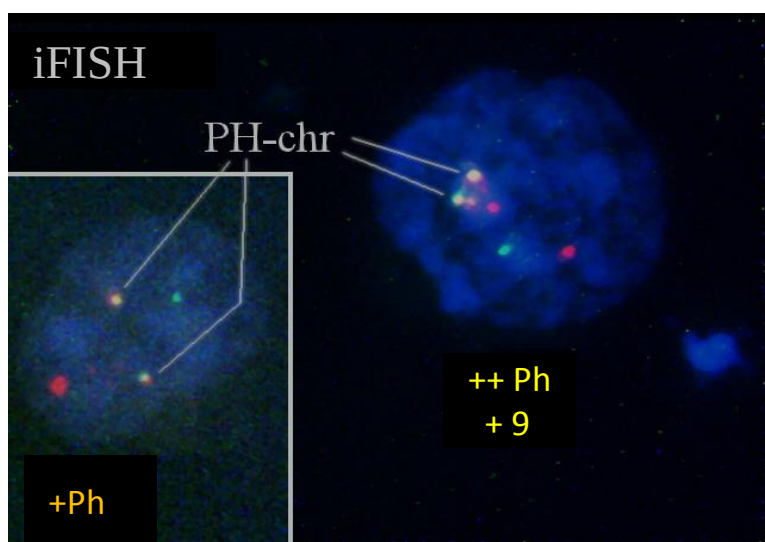


1.3.2.a. ábra: A citás jellegű B-sejtes malignus lymphomák legelőnytelenebb variánsát képviselő köpenyzóna lymphoma (MC) fénymikroszkópos képe a maradvány, reaktív centrum germinatívum és a tumoros köpenyzóna részlettel. A tumor progresszió eredményeképpen eltűnő reaktív csíracentrumok esetén a morfológiai kép önmagában differenciál diagnosztikai problémákat jelenthet.

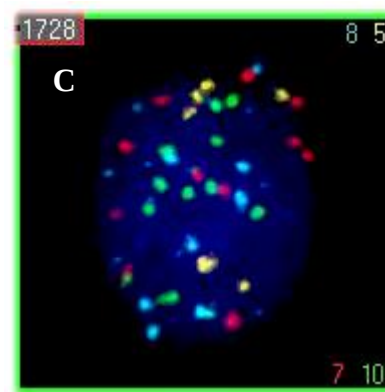
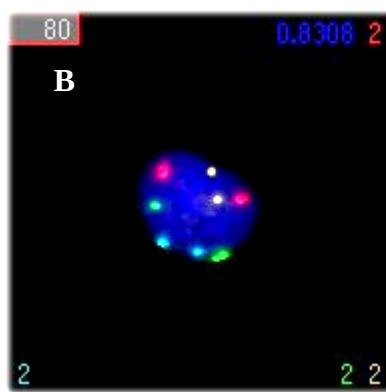
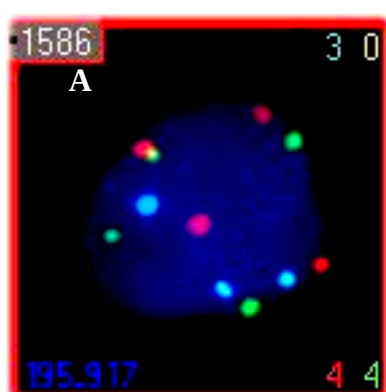
1.3.2.b ábra: Köpenyzóna lymphoma fagyasztott blokkjából készült lenyomati készítményeken elvégzett iFISH reakció (x 1400). A felhasznált cosmid próbák (cos 6.7 és cos H 1.5; 59, 60) a major transzlokációs cluster két oldalán, egymástól 750 kb-ra helyezkednek el, az egyéb lympho- és myeloproliferációkban előforduló 11q13 törést nem, csak az MCL-re jellegzetes 11q13 régióban bekövetkező törést detektálják. Az egyik zöld-piros szignálpár ko-lokalizált (►) az egyik (normal) 11-es chromosomának megfelelően a 2. és 3. jelű sejtkben, míg a másik szignálpár disszociált, mely a specifikus töréspont régióban bekövetkezett, MCL-re pathognomikus törésre utal. Inzert: az 1. jelű normál lymphocytában, a két normális 11-es kromoszómának megfelelően észlelhető két ko-lokalizációs szignál (►, 28).



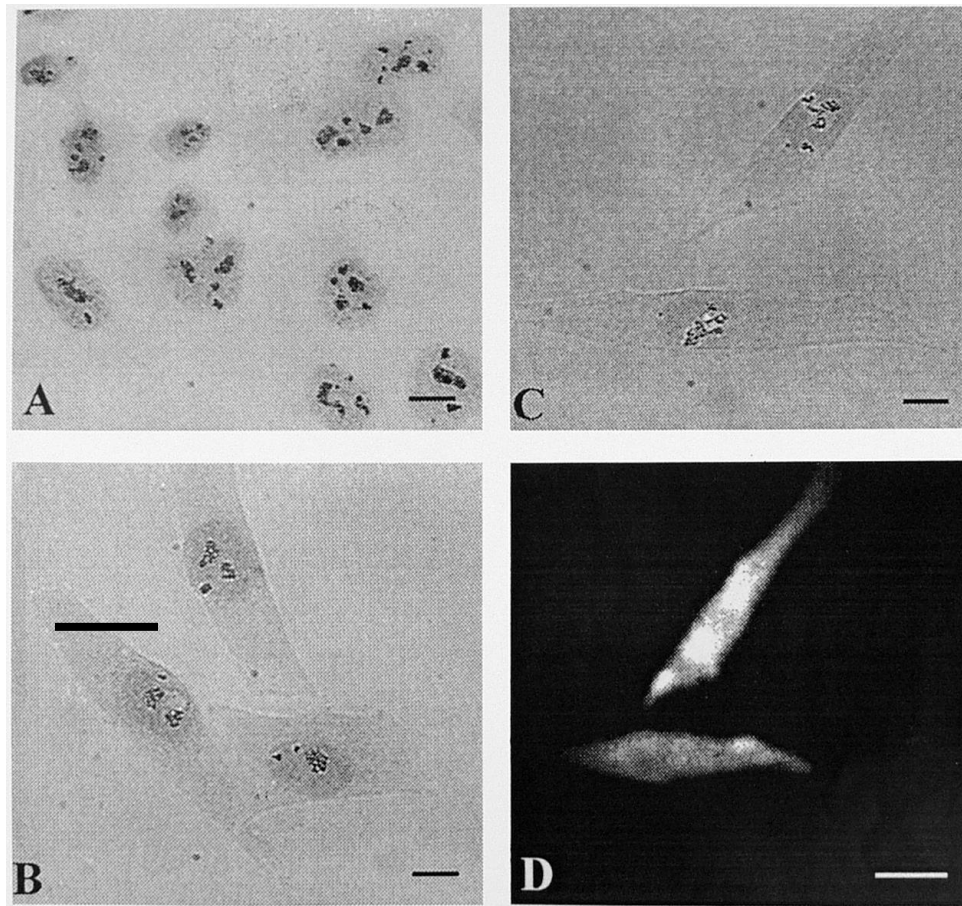
1.3.2.c ábra: Subcutan, anaplasias, kloroacetát észteráz, lysosym, CD15, CD68, peroxidase, T- és B-, epiteliális, neurogén, myeloid és myogen markerekre negatív tumor fénymikroszkópos képe (Giemsa, x 400).



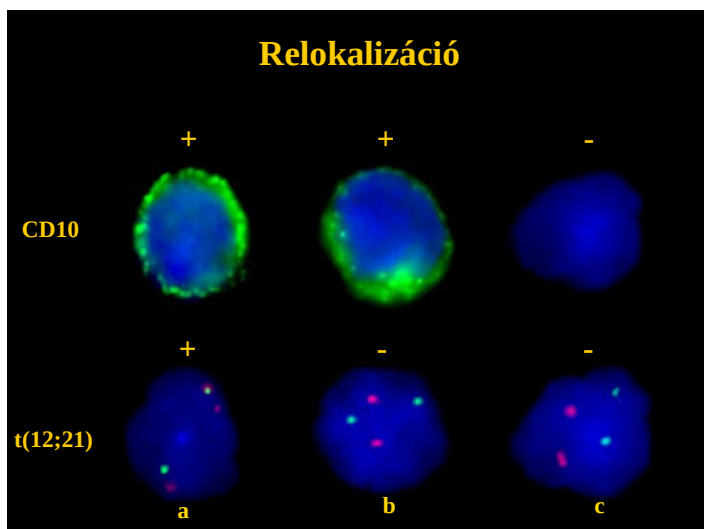
1.3.2.d ábra: A tumor fagyasztott blokkjából készült lenyomati készítményeken P1 klónok (Vysis) felhasználásával elvégzett bcr (zöld)-abl (piros) transzlokáció irányú iFISH (x 1400), 22-es triszómia és 9-es tri- valamint tetraszómia továbbá multiplex Philadelphia kromoszóma (PH-chr) észlelhető (l. 1.3.1.a. ábra). Diagnózis: Chloroma (28).



1.3.3 ábra: A negatív sejt normál kromoszóma garnitúrával (● krsz 3, ● krsz 7, ● krsz 17 CEP és ● 9 p21 deletios LSP próbák /Vysis ® UroVysion/, ● DAPI háttér magfestés). B vizelet mintából származó daganatsejt abnormális kromoszóma-garnitúrával (++3, +7, +17, del 9p21). C kontrollként használt urothelialis carcinoma sejtvonal sokszoros genetikai aberrációval (63x, fluorescens scanning mikroszkópos felvétel; saját, nem közölt vizsgálatok).



1.4.1. ábra Az MG-63 sejtek transzmissziós (A–C) és fluoreszcens (D) mikroszkópos képei. A preparátumokon vagy kizárólag az ezüstözéssel feltüntetett nukleoláris organizációs régió (Ag-NOR) reakció (A) vagy Ag-NOR és a 28S rRNS-re specifikus FISH reakciók (B-D) történtek. A C illetve a D ábrarészlet ugyanazon látómezőt mutatja transzmissziós illetve fluoreszcens üzemmódban. Méretjelző () = 10 μ m (7).



1.4.2. 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)-differentiált normál sejt. Konzekutív immunfluoreszcencia és FISH-IPC, majd az objektumok 3D vezérelt mikroszkópos relokálizációja (78).

1.3. Struktúrális kromoszóma rendellenességek vizsgálata iFISH--sel

A struktúrális kromoszóma eltérések közül az interfázis citogenetika elsősorban a transzlokációk kimutatása területén nyert alkalmazást. Ennek fő oka, hogy az iFISH céljára legkönnyebben nyerhető mintákat a haemopoeticus rendszer daganatai képezik, melyek – szemben az elsősorban deléciókat és amplifikációkat mutató szolid tumorokkal – bővelkednek kiegyensúlyozott transzlokációkban. Ugyanakkor az interfázis citogenetika alkalmas intersticiális mikrodeléciók és génsokszorozódás kimutatására is (46). A reciprok transzlokációk egy része alapvetően patognómikus a betegség természetét illetően (t[9;22], chronicus myeloid leukaemia; t[8;14], Burkitt lymphoma; t[14;18], follikuláris lymphoma; t[11;14], köpenysejtes malignus lymphoma; stb.), más részük egy-egy daganatféleség, morfológia vagy immunfenotípus alapján el nem végezhető, terápia és prognózis releváns stratifikálásának alapját képezik (t[8;21], acut myeloid leukaemia szubtypus; t[4;11] és t[12;21] gyermekkori acut lymphoid leukaemia szubtypus, stb.). A transzlokációk előfeltételét képező kromoszómális törések gyakorlatilag soha nem egy meghatározott szekvencia pontnál, hanem hosszabb-rövidebb régióban halmozódva fordulnak elő. E régió nagysága (hosszúsága kilobázisban [kb] - megabázisban [Mb]) határozza meg, hogy a különböző detektálási tartománnyal rendelkező alábbi módszerek közül melyek alkalmasak a transzlokáció kimutatására: konvencionális citogenetika: 8-12 Mb ; fiber-FISH, pulse field gél elektroforézis [PFGE], iFISH: 250-500 kb; Southern blot: 20-25 kb; polimeráz láncreakció [PCR]: néhány kb (47). Számos transzlokáció esetében a töréspontok 100 kb nagyságrendű régióban szóródnak (48, 49), a fiber-FISH valamint PFGE nagy laboratóriumi felkészültséget igénylő, diagnosztikában kevésbé alkalmazható technikák (30). A fenti körülmények miatt az iFISH a transzlokációk kimutatásában hasznos és nagy specificitású, mert *i.* a konvencionális citogenetikával szemben – a bevezetőben említett előnyeinek túl – a molekuláris/maszkírozott transzlokációkat (kb. 10 Mb-nál kisebb szakaszok cseréje) is képes kimutatni (50, 51); *ii.* a töréspont régió több száz kb hosszúsága esetén – különösen akkor, ha az RNS érés miatt jelentősen rövidebb kiméra mRNS nem íródik le és így a reverz transzkripció PCR (RT-PCR) technikák nem alkalmazhatók – nehéz lehet akár többszörös primer párok alkalmazása esetén is olyan DNS alapú PCR eljárást találni, mely a transzlokációt kellő hatékonysággal kimutatja. A transzlokációk iFISH technikával történő kimutatásának több gyakorlati megoldása lehetséges, melyet elsősorban a töréspont régió nagysága és feltérképezettsége valamint a potenciális partner kromoszóma szám (egy vagy több) határoz meg (1.3.1.a-b-c.ábrák). Három alaphelyzet – a töréspontot átfedő ('spanning') próba, a töréspont két oldalát eltérő

színben jelölő disszociációs ('splitting' vagy 'break-apart') próbák, a két töréspont 1-1 oldalát eltérő színben jelölő ko-lokalizációs vagy fúziós próbák – valamint ezek kombinációi léteznek, az egyes módszerek fals pozitivitása és automatizálhatósága azonban jelentősen eltérő (52). Mindegyik esetben azonban egyedi, egyszeres kópiában előforduló szekvenciák vizualizálása szükséges, ezért a repetitív szekvenciák kimutatásánál használatos néhány kb hosszúságú inzertet tartalmazó plasmid vektorok e célra nem alkalmasak. Helyettük a 45 kb-tól Mb nagyságrendig terjedő nagyságú próba DNS-t tartalmazó cosmid, P1 klón, bakteriális arteficiális kromoszóma (BAC), P1 arteficiális kromoszóma (PAC), yeast arteficiális kromoszóma (YAC) vektorok használatosak (53).

Az alkalmazási területekre három kiragadott példával utalok. A bcr-abl átrendeződés [t(9;21)(q34;q11)] illetve expresszió kimutatására az iFISH és az RT-PCR egyaránt alkalmazható 95-99 illetve 100 százalékos hatékonysággal (54, 55, 56, 57, 58, 48). A két eljárás együttes alkalmazásával a malignus klón expanziójának illetve a kiméra gén expressziójának monitorizálása lehetséges, melyek terápiára nem feltétlenül paralell változó paraméterek. Ezzel szemben az egyes esetekben klasszifikálási nehézségeket okozó, agresszív biológiai viselkedésű köpenysejtes malignus lymphomára jellegzetes t(11;14)(q13;q32) esetén a töréspont régió 500 kb-nál is hosszabb lehet, kiméra mRNS nem íródik le, így PCR technikával a transzlokáció az esetek kb. 1/3-ában, míg megfelelő iFISH eljárással 95-100%-ban kimutatható (1.3.2.a-b.ábra) (47, 60, 61, 62, 63). A lágyrész tumorok molekuláris patológiájának fejlődése nyomán az iFISH fontos eljárássá vált az aspirációs citológiában is (64). Hasznos lehet a lenyomati készítményeken, fagyasztott blokkból kinyert magokon, sőt paraffinos anyagon is elvégezhető iFISH vizsgálattal fenotipikusan (morfológia, immunhisztológia) nem jellemezhető anapláziás jellegű daganatok patognómikus genotípusának megállapítása, mely gyakran terápia releváns (1.3.2.c-d.ábra). A fluorokróm valamint a filter technológiák rohamos fejlődésével lehetővé vált többszörös genetikai aberrációk (numerikus + strukturális) egy sejtmagban történő vizsgálata (1.3.3. ábra), melyek klinikai citológiai mintákon történő felhasználása is megindult.

1.4. Klón specifikus genetikai vizsgálat iFISH-sel

Konvencionális citogenetikai vizsgálat során – az eljárás lényegéből adódóan – nem lehet megállapítani egy adott metafázishoz tartozó 'eredeti' interfázis sejt fenotípusát (morfológia-immunfenotípus). Amennyiben a genetikai valamint fenotípus jellegű információk ugyanazon sejtféleségről rendelkezésre állnak, ez nem csupán a kétféle adatbázis statisztikai összegzését, hanem korrelált adatgyűjtést, minőségileg magasabb szintű

információt jelent. Ez lehet morfológiai paraméter és expresszió kvázi szimultán vizsgálata is (1.4.1. ábra). Ugyanakkor nem csak elméleti – patogenetikai, de gyakorlati – terápiás jelentősége is van a kombinált fenotípus versus genotípus vizsgálatok végzésének. Ez a hagyományos morfológia, az immunhisztológia/citológia valamint az interfázis citogenetika ötvözésével – a digitális mikroszkópia nyújtotta lehetőségek felhasználásával – megvalósítható. A hagyományos alapfestés, az immunreakció majd az interfázis magon az *in situ* hibridizáció egymást követően elvégezhető. A sorrendben mindenképpen utolsó kell legyen az iFISH reakció, hiszen az optimális feltáráshoz – próba penetrációhoz olyan előkezeléseket alkalmazunk, amelyek során a citoplazma nagyrészt elvész, a mag duzzad; tehát a morfológiai megítélés és azonosítás lehetősége nagyfokban csökken, a topográfia azonban megmarad. Így egy megfelelő objektum visszakereső rendszerrel ellátott mikroszkóp segítségével a procedura egyes fázisaiban felvett képek szuperponálásával a feno-, és genotípus *in situ* rekonstruálható. Az eljárást FICTION (Fluorescent immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation Of Neoplasms) illetve MAC (morphology-antibody-chromosomes) technikának is hívják (65, 66, 67, 68, 69). E technológia alkalmazási területeire kiragadott példaként említhető a dysplasia-carcinoma kérdéskör (in situ lobuláris carcinoma, PIN, CIN) (70, 71, 72), ahol az eljárás a specifikus genetikai eltéréshez asszociált morfológia azonosításában nyújthat jelentős segítséget; az elkötelezetlen őssejt eredetű versus „lineage specific” myeloproliferációk terápiás szempontból fontos elkülönítése, különös tekintettel a Ph negatív krónikus myeloproliferációkra, a myelodysplasiás szindrómára és egyes akut leukaemiákra továbbá a minimális reziduális betegség területe illetve a posttranszplantációs kimérizmus kérdésköre (73, 66, 74, 75, 76, 77) (1.4.2. ábra).

Összességében valószínűsíthető, hogy az interfázis citogenetika – különösképpen MAC/FICTION eljárás formájában történő felhasználásával, - mintegy két évtizeddel az immunhisztológiai módszerek szélesebb körű elterjedése után, ahhoz hasonló jelentőségű, additív módszertanná fejlődik a patomorfológiai kutatások és diagnosztika területén (79, 80). Az iFISH technika valamint az automatizált fluoreszcens pásztázó (scanning) mikroszkópia (FSM) együttes alkalmazása továbbá az automatizált pásztázó lézer mikroszkópia (LSM) adatfeldolgozó sebességének további fejlődése – a modern képalkotó radiológiai eljárások mintájára – elvezethet ahhoz, hogy a könnyebben vizsgálható citológiai preparátumok mellett vastag szövet metszetek rétegeinek fenotípusa és genotípusa *in situ* szimultán előállítható legyen.

1.5. Tumor heterogenitás - klonális expanszió

A fénymikroszkópos megjelenés alapján a malignus daganatok jelenős részének heterogenitása valamint a malignitás fokának növekedésével, a klinikai progresszióval növekvő dedifferenciálódás, hisztológiai éretlenség fejlődési folyamata régről ismert a patomorfológusok számára. Ugyanakkor más esetekben, elsősorban akut és krónikus leukémiákban valamint limfómákban a szinte teljes morfológiai homogenitás mellett a molekuláris éra vizsgáló eljárásai kifejezett heterogenitást / polimorfizmust tártak fel. Malignus daganatok evolúciós modeljét először Nowel, P.C. (1976) körvonalazta (81). Hangsúlyozta a tumorok és leukaemiák egysejtes eredetét és a későbbiekben konzekutív, egyre fokozódó növekedési előnnyel járó, így klonális expansziót eredményező mutációk alapján történő lineáris evolúcióját. A közelmúlt, elsősorban gyermekkori leukémiákon valamint bizonyos szolid tumorokon (prostata karcinóma, hererák) folytatott experimentális valamint klinikai vizsgálatai megerősítették a tumorsejt evolúció koncepciót, de a Darwin-i egyedfejlődési modellel lényegében megegyező, faágszerűen elágazó evolúciós modellt valószínűsítettek (82, 83, 84, 85). Meghatározásra kerültek a klonális expanszió szempontjából meghatározó illetve ebből a szempontból kevésbé lényeges (u.n. 'driver' vs passenger / hitchhiking) mutáció valamint a 'cancer initiating / propagating cell' (rák őssejt) fogalmak. Elsősorban az utóbbi, további vizsgálatokkal alátámasztandó, alaposan gyanított heterogenitása tehető felelőssé a therápiás kudarcok jelentős részéért és – paradox módon - a rezisztens sejtekben kialakuló evolúciós nyomás kialakulásáért. Mindezek miatt a kérdéskör vizsgálata nem csak patogenetikai, de klinikai / terápiás szempontból is lényeges.

1.6. Átvezetés

A *J. of Cell Science* egyik 2003-as számának 'Fluorescence in situ hybridization: past, present and future' című cikkében Jeffrey M. Levsky és Robert H. Singer a DNS-t/gént detektáló multi-target FISH kifejlődésének 6 mérföldkövét határozza meg (nukleotidok direkt fluoreszcens jelölése – kétszínű detektálás – háromszínű detektálás – combinatorial color coding – ratio color coding – COBRA) (86). Különös de ezek mindegyike kutatók egy szűk csoportjához és egy intézethez kötődött: Department of Cytochemistry and Cytometry (jelenleg: Department of Molecular Cell Biology), Leiden University Medical Center. A sorban az első mérföldkö a Feulgen díjas Jan G.J. Bauman nevéhez fűződik, akivel 1988-ban rövid ideig együtt dolgozhattam fluoreszcensen jelölt hibridek kvantitativ detektálása

témakörben és aki meghatározta az in situ molekuláris technikák iránti elkötelezettségemet, mert patomorfológusként a morfológia/fenotípus asszociált genotípus sejtszintű meghatározásának lehetőségét láttam benne. 1990-92-ben a fenti cikk szerzőivel – akik viszont az mRNS/expresszió in situ hibridizációs detektálása fejlődésének több mérföldkövét jegyzik – a University of Massachusetts Medical Centerben egy légtérben dolgozhattam. S bár nem egy témakörben dolgoztunk, komoly szellemi hatásokat kaptam tőlük az in situ molekuláris technológiák területén. 1994 és 1997 között két EK-i pályázatot nyertem illetve ezekhez csatlakozhattam:

1. Automation molecular cytogenetic analysis
2. Development of diagnostic tools for molecular-cytogenetic detection of chromosomal abnormalities in oncology and genetics

Az első egy átfogó és a fenti leideni intézetből irányított európai 'Consent Action' típusú projekt volt, melynek Program Managing Group-jába – Közép Kelet Európa képviselőjeként – beválasztottak. A kibontakozó új technológia és szellemi áramlat a feno- és genotípus 'egysejtes', korrelált azonosítása révén új morfológiai látásmóddal kecsegtetett, mely különösen újszerű megközelítést valószínűsített a tumorsejtek klonális heterogenitásának és evolúciója vizsgálatának területén. A technológiát a 90-es évek elejétől Magyarországon terjesztve, a korrelált geno- / fenotípus vizsgálati know-how-t fejlesztve, elsősorban a gyermekonkológiai valamint a felnőtt onko-haematológiai területen végeztünk vizsgálatokat tudományos kérdések megválaszolására. Ezek eredményeit a patológiai diagnosztika és a prediktív patológia területeire is igyekeztünk bevezetni.

Ennyi a szellemi–gazdasági–egészségügyi 'public benefit'-je annak a tevékenységnek, melynek közös kulcsszava a „interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció, FISH”, s melynek tudományos közlemények formájában megjelent szemelvényeit a következő fejezetek tartalmazzák. A PubMed adatbázis szerint a 'FISH' kulcsszóval publikált közlemények száma az elmúlt évszázad utolsó évtizedében 100 x-ra nőtt **(86)**.

2. MÓDSZERTAN - BETEGANYAG

2.1. A hiperdiploid gyermekkori pre-B akut lymphoblastos leukaemia szubklonális architektúrája

2.1.a. Beteganyag

Összesen 214 kezeletlen gyermekkori pre-B-sejtes akut lymphoblastos leukaemiás (pre-B-pALL) beteg csontvelő mintáját vizsgáltuk, a lány / fiú arány 105/109-nek, az átlagéletkor 5.9 évnek felelt meg. Ebből 194 *de novo*, 20 pedig relapsus betegség volt. A diagnózis minden esetben a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ (PTE-KK) Pathológiai Intézetében illetve jogelődje (1994 - 2000 között) által került felállításra az aktuálisan érvényes morfológiai, fenotípus és genotípus kritériumok alapján (1, 2). Csak azok a pre-B-pALL minták kerültek további vizsgálatra, akiknél az alábbi 8-paraméteres iFISH analízisünk során hiperdiploid státusz került megállapításra valamint 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.

2.1.b. iFISH próbák

A 4, 6, 10, 17, 18 és az X kromoszómák numerikus aberrációit kimutató centromer próbák (CEP – centromere enumeration probe) saját laboratóriumunkban rendelkezésre álltak a korábbi publikációknak megfelelően (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). A 14-es és 21-es kromoszómára lokusz specifikus próbát (LSI, locus specific identifier) terveztünk a következő adatbázisok felhasználásával <http://www.ensembl.org>, <http://genome.ucsc.edu/>, <http://projects.tcag.ca/efish/> és <http://bacpac.chori.org/>. Korábbi komparatív genomikus hibridizációs (CGH) array adataink alapján olyan BAC klónokat választottunk, melyek a 14-es illetve a 21-es kromoszóma stabil régióit fedték le: 25,309,486 – 26,165,333 illetve 38,801,781 – 39,646,010. A próba lókuszok a GRCh37 (GCA_000001405.14) szerint kerültek megjelölésre. A CEP és az LSI próbák szenzitivitását, specificitását és a szignálok minőségét nemzetközileg elfogadott előírások szerint határoztuk meg (10). Az iFISH jelek intenzitását, a fluoreszcencia erősségét, a próbák hibridizációjának sorrendjét valamint a próbák mennyiségét a próbák valamint az egyes fluorokrómok számos kombinációjában teszteltük annak érdekében, hogy az iFISH reakciókat optimalizáljuk. Ennek eredményeként az első kör próbamix (CEP mix) CEP4 (vörös), CEP6 (zöld), CEP10 (aqua) és CEP18 (gold), a 2. próbaszet (LSI&CEP mix) LSI14 (vörös), LSI21 (zöld), CEP17 (aqua) és CEPX (gold) komponensekből állt.

2.1.c. A FISH próbák processzálása és jelölése.

A plasmid és BAC klónokat standard technikával növesztettük fel, izolálásukhoz High Pure Plasmid Isolation Kit-et (Roche Kft, Budapest, Hungary, Cat no. 11754777001) használtunk. Az izolátumok koncentrációját és minőségét NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE), valamint a megfelelő restrikciós endonukleáz emésztéssel határoztuk meg. A tisztított plasmid / BAC DNS mindegyikét random priming módszerrel, Green-dUTP, Red-dUTP (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) valamint Atto425-dUTP (aqua) illetve Atto532-dUTP (gold) (Jena-Bioscience GmbH, Jena, Németország) fluorescens jelölt nukleotidok továbbá BioPrime® DNA Labeling System (Invitrogen, Life Technologies Hungary Kft, Budapest, Magyarország) reagenssekkel jelöltük, a gyártó útmutatásai alapján, mindegyik reakcióban 400 ng templát DNS-t használva. A jelölt DNS-t Illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare, Budaörs, Magyarország) oszlopon tisztítottuk, a jelölt termék koncentrációját ismét NanoDrop-pal mértük és gél elektroforézissel ellenőriztük. A jelölt próbákhoz 50X főlöslégben lazac sperma DNS-t, NH₄-acetátot (végkoncentráció: 2.5 mM) és 10X Cot-1 DNS-t adtunk (az utóbbit csak az LSI próbákhoz, 75%-os hideg etanolban precipitáltuk és hibridizációs pufferben (50 % ultrapure deionizált formamid, 2 x SSC, 50 mM nátrium foszfát, pH 7.00, 10 % dextrán szulfát MilliQ vízben) vettük fel. Az optimalizált reakciókban a CEP próbák koncentrációja 20 – 100 ng, míg az LSI próbáké 140 – 200 ng (4 x 35 ng – 4 x 50 ng) tartományban mozgott a hibridizációs keverék 3 µl-ében.

2.1.d. Hibridizációs eljárás

A 70 %-os etanolban fixált leukaemia sejtmintákat valamint a kontrol perifériás sejteket Carnoy oldatban átfixáltuk (24 h, - 20 °C), kis alikvótokat tárgyelemekre csepettünk és levegőn száradni hagytuk. Ezután a mintákat RNázal kezeltük (10 µg/ml 2 x SSC, 10', 37 °C, pára kamrában, 3 x 5', 2 x SSC-ben mostuk refixáltuk 1 % paraformaldehid-PBS-ben (10', 4 °C), majd 2 x 5' mosás PBS-ben, emésztés 0.01 % pepsin-10 mM HCl-ban, mosás 2 x 5' PBS-ben, postfixálás 1 % paraformaldehid -PBS-ben (10', 4 °C), 2 x 5' mosás PBS-ben, dehydrálás 5 – 5 percig 70 – 90 – 100 % etanolban és légszárítás következtek.

3 µl CEP hybmix elegyet tettünk minden mintára, melyeket 12 mm-es kerek fedőlemezzel fedtünk. A target és próba DNS-t együtt denaturáltuk 80 °C-on, 3'-ig, a hibridizációkat Abbott ThermiBrite kamrában 37 °C-on hajtottuk végre, éjszakán át. A posthibridizáció 2 x 5' 2 x SSC / 0.1 % Tween 20, 37 °C; 2 x 5' 50 % formamide / 2 x SSC,

pH 7.00, 44 °C; 1 x 5' 2 x SSC / 0.1 % Tween 20, 44 °C; 2 x 5' 0.1 x SSC, 60 °C végül desztillált vizes mosást foglalt magába. Preparátumokat DAPI / Vectashield (Vysis, Downers Grove, IL) (0.005 µg/ml) oldattal fedőlemezzel fedtük és sötétben tartottuk az analízisig.

A 2., LSI&CEP hibridizációs kör előtt a fedőlemezeket 0.1 % Tween 20 / 1 x PBS oldatban leáztattuk. A preparátumokat refixáltuk 2 x 5' PBS-ben, dehidráltuk felszálló alkoholban a fentiek szerint és levegőn megszárítottuk. Ezután 3 µl LSI&CEP hibmixet adagoltunk mintánként, a denaturációs és hibridizációs lépések, körülmények megegyeztek az első körben alkalmazottakkal. Posthibridizáció: 2 x SSC / 0.1 % Tween 20, 2 x 5', 37 °C; 50 % formamide / 2 x SSC, pH 7.00, 2 x 5', 37 °C; 2 x SSC / 0.1 % Tween 20, 1 x 5', 37 °C. A preparátumokat végül desztillált vízben öblítettük és DAPI / Vectashield (0.005 µl / ml) oldattal, fedőlemezzel fedtük, sötétben tároltuk. A rehibridizációs eljárást úgy is ellenőriztük, hogy a 2. körben próbákat nem alkalmaztunk. Sem kontrol, sem leukaemiás sejteken nem észleltünk az 1. körből származó négyszínű fluorokrómnak megfelelően reziduális jeleket.

2.1.e. A multiplex iFISH (MiFISH) jelek kiértékelése.

Mindegyik próbaszettel történő jelölés után a lemezeket motorizált multifunkciós mikroszkóp rendszerrel (Zeiss Axioplan-MOT II., Feldbach, Németország) analizáltuk. A mikroszkóp komputer kontrollált, motorizált, pásztázó tárgyasztallal, X-Cyte lámpával, kvarc optikai szál as megvilágítással, motorizált fluoreszcens szűrőtartóval és hűtött CCD kamerával volt felszerelve. A rendszert MetaCyte és Isis modulokból álló Metafer 4.0. szoftver (Metasystems GmbH, Altlussheim, Németország) működtette. Az első próbaszettel (CEP) történő hibridizációt követően a lemezeket beszkeneltük korábban meghatározott alapvető sejtmag felismerési morfológiai paraméterek alapján és az 1000 sejtmag képét a DAPI csatornában, a 3D koordinátákkal együtt, tároltuk (11, 12). A szignál mintázatot manuálisan értékeltük ki és addig folytattuk, amíg egyértelmű, mind a négy színcsatornában azonosítható jeleket tartalmazó legalább 300 sejtmagot regisztráltunk. Az egy vagy több csatornában nem egyértelműen azonosítható jeleket tartalmazó sejtmagokat kizártuk. A 2. próbaszettel (CEP&LSI) történő hibridizációt követően a korábban azonosított / regisztrált sejtmagokat relokalizáltuk, mely 8-próbás korrelált iFISH analízis lehetőségét adta egysejt szinten. Az adatfeldolgozás során csak azon sejtmagokat vettük figyelembe, melyekben mind a 8 FISH próba legalább 1 értékelhető jelet adott. Kontrolként 19 egészséges felnőtt perifériás vérsejtjeit hibridizáltuk a 2 x 4 DNS márkerral, a kromoszóma iFISH jeleket 600 – 600 sejtben három vizsgáló értékelte ki.

2.1.f. Statisztikai feldolgozás.

A szignál álpozitivitás határát Poisson eloszlás (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL) alapján, normál diploid kontrol sejteken határoztuk meg a fentiek szerint. A betegminták esetében az aneuploidia kombinációkat csak akkor tartottuk valódinak, ha mindegyik kromoszóma aneuszómia szintje az álpozitivitás felett volt. A klonális evolúció matematikai modellezésére csoport ('cluster') és hálózat ('network') analízist végeztünk MEGA 5 és NETWORK 4.6.1. szoftverek segítségével, továbbá Steiner-fa paramétereket vizsgáltunk (13,14). A cluster és network analízist a beteganyag különböző alcsoportjain úgy vizsgáltuk, hogy minden egyedi szubklónt figyelembe vettünk vagy csak azokat, melyek legalább két kópiában fordultak elő egy betegben.

Fals monoszómia a 8 kromoszóma vonatkozásában 0.8 % és 4.4 % között mozgott, a legalacsonyabb férfiakban az X kromoszóma esetében volt (0.05 %). Fals triszómia 0.1 % - 1.0 % között fordult elő. Két szignál vesztesét vagy nyerését olyan alacsony (elhanyagolható) arányban találtunk, hogy emiatt sejtet kizárni nem kellett a betegmintákban. Miután 2 x 4 próbás MiFISH tesztünkhöz 100 %-os triszómiás kontrol nem állt rendelkezése, különböző addicionális kísérleteket végeztünk az aneuszómia meghatározásunk pontosságának jobb megítélésére. Arteficiális triszómia (egy szomatikus és az X kromoszóma egyforma színben történő jelölése) 3 férfi kontrol sejtjein 5.3 % fals diszómiát és 0.6 % fals tetraszómiát adott. Betegmintákban 5 x ismételt MiFISH reakció, egyenként 3 vizsgáló által kiértékelve, mind a CEP illetve az LSI próbákra 4.7 (2.6 – 6.0) és 4.0 (2.3 – 6.5) átlagos standard deviációt mutatott. Sejtvonalon (69, XXY triploid sejtvonal /30-805717; Vysis ProbeCheck Prenatal Control Slides for FISH; Abbott Molecular Inc., IL, USA/) 18-as és 21-es triszómiát valamint X diszómiát két komplett MiFISH teszt során, két vizsgáló által kiértékelve 95.5 % +/- 2.2 %, 95.7 % +/- 1.3 % és 97.2 % +/- 1.0 % pontossággal tudtunk azonosítani.,

A MEGA 5 és NETWORK 4.6.1. szoftverekkel végzett klonális evolúció analízishez különböző, Steiner-fa asszociált paramétereket számoltunk. A Steiner-fa egy betegben az egymáshoz képest legkisebb genetikai különbséget (mutációt), esetünkben 1 kromoszóma nyerését, mutató szubklónok legrövidebb hálózata. Az egymástól egységnyi genetikai eltérést mutató szubklónok közötti távolság 1 egységnyi, míg a pl. 5 x egységnyi genetikai eltérést mutató, összekötött szubklónok között 5 x egységnyi a távolság (a közöttük levő egységnyi eltérést mutató szubklónok vagy nem léteznek /5 mutáció egyszerre fordul elő/ vagy nem kerültek azonosításra, az alacsony arányuk miatt). A Steiner-fa egyes távolságainak összege adja a Steiner-fa hosszát. Az utóbbi matematikai korrelációja az azonosított szubklónok

valamint a feltételezett szimultán mutációk számával informál arról, hogy egy populációban (esetünkben egy daganatsejt populációban) a genetikai változások szekvenciálisan vagy szimultán történnek.

2.2. t(12;21)(p13;q22) pozitív gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia: Epidemiológia, prognosztika és reziduális betegség

2.2.a. Beteganyag és kontrol sejtek

A t(12;21)(p13;q22) incidenciájára és a gyermekkori akut lymphoblastos leukémia prognosztikai csoportjaiban történő megoszlására irányuló vizsgálatok tárgyát a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport egyes regionális centrumaiban (Debreceni OTE, Gyermekklinika, Debrecen; Fővárosi Önkormányzat Madarász utcai Gyermekkórháza, Budapest; Pécsi OTE, Gyermekklinika, Pécs; Református Egyház Bethesda Gyermekkórháza, Budapest; Semmelweis OTE, I. sz. Gyermekklinika, Budapest; Semmelweis OTE, II. sz. Gyermekklinika, Budapest; Szegedi OTE, Gyermekklinika, Szeged; Vas megyei Markusovszky Kórház, Szombathely; B.-A.-Z. megyei Kórház, Miskolc; Heim Pál Gyermekkórház, Budapest) 1995-99 között észlelt 130 ALL-es gyermek natív, EDTA-val alvadásgátolt csontvelő (126 esetben) vagy vér (4 esetben) mintái képezték. A betegeket a ALL-BFM-95 terápiás stratifikálási protokoll előírásai szerint standard rizikójú (SR), közepes malignitású (MR) és magas malignitású (HR) csoportba soroltuk. A Pécsi OTE Pathológiai Intézetében történtek az interfázis citogenetikai és molekuláris biológiai (RT-PCR) valamint áramlási citometriás vizsgálatok. Az utóbbi leletek alapján immunfenotípus besorolás történt (1).

Az automatizált reziduális leukaemia sejt detektálási tanulmányunkban CD10+ és ETV6/RUNX1+ sejt vonal (DSMZ, Braunschweig) szolgált pozitív kontrollként, míg a 5 egészséges felnőtt grádiensen izolált perifériás mononukleáris sejtjei voltak a negatív kontrol elemek. Ezekből a pozitív sejtekre nézve 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 és 10 %-os hígítást készítettünk, 3 paralelben.

A kombinált egysejtszintű feno- és genotípus vizsgálatokon valamint kvantitativ, leukaemia specifikus PCR módszerek alkalmazásán alapuló t(12;21)+ pre-B-pALL monitorizálási tanulmányunkban a 2 - 17 év közötti (median: 6.1 év) 14 beteg 63 csontvelő mintáját vizsgáltuk. A diagnózis a PTE, Patológiai Intézetében, standard WHO kritérium szerint került felállításra, minden beteget az ALL IC-BFM 2002 protokoll (http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/all_ic-bfm_2002_bp.pdf) szerint kezelték. A követés időpontjai (és a rendelkezésre álló mintaszám) a következők voltak: 15. nap (d15; 11 minta), 33. nap (d33; 14 minta), 12. hét (w12; 10 minta) és 5 hónap (m5; 14 minta). Legalább 60 hónap követés minden beteg esetében rendelkezésre állt. Egy beteg (#1)

a 24. hónapban relabált, de újra teljes remisszióba került, egy másik beteg (#7) lokalizált meningeális relapszust mutatott a 22. hónapban.

2.2.b. t(12;21) detektálása RT-PCR-rel

A reakcióhoz az ALL-es gyermekek fehérvérsejtjeiből Trizol reagenssel (Gibco BRL, MD) a gyártó előírása szerint izolált teljes RNS-ből 1 µg-ot használtunk. Pozitív kontrollként a transzlokációt hordozó REH sejtvonalat (DSMZ, Braunschweig, Germany) alkalmaztuk. A reverz transzkripciót 50 mM Tris/HCl (pH: 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiotreitol (DTT) tartalmú pufferben (Appligene, Oncor, France), 37°C-on egy órán keresztül végeztük 5 U MMLV reverz transzkriptáz (Appligene, Oncor, France), 0,5 mM dNTP elegy és 2-2 pmol primer jelenlétében. A vizsgált génszakasz sokszorozítása PCR készülékben (MiniCycler, MJ Research) 5 perc 94°C elődenaturálás után, 1 perc 94°C denaturálás, 1 perc 60°C primer kapcsolódás, 1 perc 72°C elongációs körülményekkel 40 cikluson keresztül történt, majd 10 perc 72°C végső elongációval zárult. A PCR elegy 30 mM Tris/HCl-t (pH8.3), 50 mM KCl-t, 1 mM MgCl₂-ot, 1 U Taq polimerázt (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 200 µM dNTP-t és egyenként 15-15 pmol primert tartalmazott. A reakcióhoz a *Cayuela és mtsai (1996)* által leírt primereket használtuk: TEL (5'CGT GGA TTT CAA ACA GTC CA3'), AML1 (5'CTC GCT CAT CTT GCC TGG3'), melyek a TEL 5. exonján és az AML1 3. exonján helyezkedtek el (2). Az RNS izolátum minőségét minden esetben az Abelson mRNS 2-es és 3-as exonja közötti szakasz amplifikációjával ellenőriztük (3). Az RNS minőségét csak ezen szakasz amplifikálhatósága esetén tekintettük elfogadhatónak. Az RT-PCR termék vizsgálata 2%-os agaróz gélelektroforézissel történt.

2.2.c. Immuncitokémia szkennig mikroszkópos vizsgálatra

Silanizált tárgylemezek 24 mm²-es területére 5 x 10⁵ mosott és RPMI-ben felvett mononuclearis sejtkeverékből citospin preparátumokat készítettünk, a lemezeket levegőn szárítottuk és 4 °C-on, 20 percig 3.7 %-os formaldehid oldatban fixáltuk. A sejtpreparátumokat 2 x 5', 900 W mikrohullámú kezelésnek tettük ki 0.01 mol/L, pH6.0 citrát pufferben, melyet PBS öblítés követett. A nem specifikus kötést 1,3,5 trinitrobenzén oldattal (Boehringer Mannheim) blokkoltuk. A primér antitest jelöletlen egér anti-CD10 (Novocastra) volt, a reakciót biotinilált anti-egér antitesttel (DakoCytomation) és avidin-FITC-cel (Vector Laboratories) hívtuk elő. Az utófixálást (3.7 % formaldehid, 10', 4 °C) detergenses mosás és etanolos szárítás követte. A lemezeket Vectashield-DAPI, 0.005 µg/ml oldattal (Vector) fedtük.

2.2.d. Szkenning fluoreszcens mikroszkópia (SFM)

Az automatizált szkenneléshez és analízishez Axioplan Mot-2 (Zeiss), 8 tárgylemezes motorizált tárgyasztallal, magas feloldású B-W kamerával (CV-M1, JAI) felszerelt mikroszkóp állomást használtunk, melyet a Metafer 4.0 (MetaSystems Int.) szoftver működtetett (képrögzítés, processzálas és citometriai mérések). A mikroszkóp 100-W HBO lámpával, DAPI, FITC, SpGreen és SpOrange filterekkel valamint Zeiss Fluor 10x/0.5, Plan-Neofluar 40x/0.75 objektivekkel volt felszerelve.

2.2.e. Sejtazonosítás és immunfenotipizálás SFM-mel

A sejtmag azonosításra és a CD10 detektálására 10x objektivet és a Metacyte szoftver modult használtuk. Virtuális grid autofókuszálást követően közeli, nem átfekvő képek felvétele történt az egész szkennelési területről DAPI csatornában, mindegyik előtt finomfokuszálással. A DAPI+ objektumokat sejtmagnak tekintettük a következő paraméterek alapján: háttérfestés objektum küszöb 18%; minimum objektum terület, $20 \mu\text{m}^2$; maximum objektum terület, $350 \mu\text{m}^2$; max. relatív konkavitás mélység, 0.5; max. aspektus ráció, 3.5. Az objektum nélküli képeket valamint a csak részlegesen felvett DAPI objektumot tartalmazókat töröltük. A képek és objektumaik koordinátáit későbbi relokalizáció céljából a rendszer rögzítette.

Ezután a CD10 immunjelölődés átlagos pixel intenzitását mértük fix (0.58 s) integrációs idő mellett, a FITC szignál csatornában, DAPI objektumonként. A pixel intenzitást a kontrol csatornában (SpOrange) autofluoreszcens korrekciós célból ugyancsak mértük. A rendszer a DAPI, FITC és SpOrange csatornában felvett képeket galériába, RGB formátumba helyezte az egyes csatornában mért pixel intenzitások eloszlás hisztogramjaival együtt. Ennek alapján a CD10+ objektumokat a CD10- illetve autofluoreszcens objektumoktól elkülönítettük és csak az első, CD10+ nem autofluoreszcens objektumokon vizsgáltuk a későbbiekben elvégzett ETV6/RUNX1 iFISH jeleket.

2.2.f. Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció (iFISH)

Az iFISH procedúrát az immuncitokémiai jelölés után hajtottuk végre. A fedőlemezeket 0.005 % Tween 20/PBS-ben áztattuk le, majd 2x PBS-ben mostuk, majd éjszakán át Carnoy oldatban, - 20 °C-on, tartottuk. Légszáritás után a TEL/AML1 SpGreen és SpOrange, az ETV6/RUNX1 átrendeződésre specifikus fúziós, kétszínű extraszignálos próbát alkalmaztuk a gyártó (Vysis Inc.) útmutatása alapján. Negatív mag: 2 zöld, 2 piros jel; pozitív mag: 1 fúziós jel, 1 zöld és 2 piros jel.

2.2.g. Relokalizáció és iFISH analízis

A relokalizációt a tárolt galéria képek alapján a Metafer 4.0 szofver végezte. A relokalizált magokat az Isis module mind SpGreen, mind SpOrange csatornában (40x objektív, 6 fókusz sík vizsgálata, síkok közötti távolság 0.40 μm) rögzítette. A jelmintázatot a korábbi munkánkban megadott eljárás szerint analizáltuk a legjobb fókuszpontú, összerakott zöld és piros csatornás képeken (4).

2.2.h. Áramlási citometria

A CD10⁺ sejtarányt a pozitív / negatív sejt higitási sorokban FITC-CD10 antitesttel (DakoCytomation) történő jelölést követően FACSsort készülék (BD) segítségével határoztuk meg.

2.2.i. DNS és RNS alapú, leukaemia klón specifikus molekuláris vizsgálatok

2×10^7 mononukleáris csontvelői sejtől izoláltunk standard módszerekkel DNS és RNS-t. Monoklonális immunglobulin nehézlánc (IgH), T-sejt receptor (TCR) delta illetve kappa-deletáló elem (KDe) meghatározáshoz csoport ('family') specifikus primereket és PCR-t használtunk (5, 6, 7). A klonális génátrendeződések termékeit szekvenáltuk. A csiravonal V, D, J gének junkcionális régióiban a klón specifikus szakaszok azonosítására BLAST (www.ncbi.nih.gov) (8) és IMGT (www.imgt.cines.fr) (9) szekvencia azonosító szoftvereket használtunk. Az RQ-PCR vizsgálatot, csiravonal reverz primerekkel és próbákkal, az irodalom alapján végeztük el (10, 11, 12). A 'forward' junkcionális régió specifikus primereket Oligo 6 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO) segítségével terveztük. A TEL/AML1 fúziós transzkript detektálására és kvantálására 'nested' RT-PCR és RQ-RT-PCR eljárásokat használtunk, melyeknél a primereket, a fluoreszcens hibridizációs próbákat valamint a protokollokat az irodalom alapján alkalmaztuk (13, 14).

2.2.j. Szkenning fluoreszcens mikroszkópia (SFM) a t(12;21)+ pre-B-pALL monitorizálásában

A módszert, beleértve a sejtszeparációt, a mennyiségi tartományt, a kiértékelési kritériumokat már korábban kidolgoztuk és közöltük (15, 16). A CD10-re fluoreszcensen jelölt csontvelői citológiai preparátumokat Metafer 4.0 rendszerrel (Metasystems GmbH, Altlussheim) szkenneltük. Ugyanazon preparátum rákövetkező iFISH jelölését és vizsgálatát kétszínű, direkt jelölt, extraszignálos fúziós próbákkal (Vysis-32-191005, Vysis Inc., Illinois) hajtottuk végre. A CD10⁺ sejteket relokalizáltuk és iFISH jeleiket analizáltuk. Átlagosan

27,050 sejtet szkenneltünk citoprepenként. A kombinált módszer szenzitivitása és specificitása 98.67% illetve 99.97% volt.

2.2.k. A kvantitativ DNS, RNS és egysejtes kombinált minimális reziduális betegség (MRD) adatok összehasonlítása

Egy betegség egy bizonyos márkere, egy követési időpontnál, egy specifikus módszerrel meghatározott valamint a kezeletlen betegség ugyanezen márkere mennyiségeinek aránya jellemezte a betegben a tumorsejt hígulást. Ezen paraméter határozta meg az MRD mértékét. A tárgat fentiek szerinti relativ mennyiségének negativ logaritmusá írta le az MRD exakt értékeit. Ha ugyanazon mintában kettő vagy több DNS márkér vonatkozásában az RQ-PCR analízis különböző MRD szintet igazolt, a magasabb MRD értéket vettük az értékelésben alapul.

2.3. Ph+/bcr-abl átrendeződés pozitív betegségek vizsgálata iFISH-sel

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

2.3.1.a. Beteganyag

2.3.1.a.1. Acut lymphoblastos leukaemiában szenvedő, chronicus myeloproliferatív betegség anamnézissel nem rendelkező 6 gyermek és 11 felnőtt sejtvonal specifikus genetikai sajátosságait vizsgáltuk. Csak egy betegnél (5. számú) volt enyhe hepatosplenomegalia a felvételnél, de éretlen illetve intermediér differenciálódású myeloid elem egyik beteg perifériás vérkenetében sem volt detektálható.

2.3.1.a.2. A Pécsi Orvostudományi Egyetem Pathológiai Intézetében 1996-1999 között észlelt és diagnosztizált 64 essentialis thrombocythaemiás (ET) beteg volt a tanulmány tárgya. A vizsgálatok időpontjában mindegyik beteg kezeletlen volt és a Polycythemia Vera Study Group kritériumait figyelembe véve a laboratóriumi és klinikai paraméterek megfeleltek ET-nek (1). Crista biopsia, csontvelő aspirátum és vérminták minden beteg esetében rendelkezésre álltak.

2.3.1.b. Molekuláris vizsgálatok

2.3.1.b.1. *RNS izolálás.* Az RNS mintákat 2×10^7 fehérvérsejtből, TRIZOL^R reagens (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) felhasználásával a gyártó instrukciói szerint nyertük és DEPC-vel kezelt vízben 3 µg/µl koncentrációban oldottuk fel.

2.3.1.b.2. *RT-PCR.* Az RT-t 10 µl pufferben, 37°C-on 1 óráig végeztük a következő komponensek jelenlétében: 3.0 mmol/L MgCl₂, 75 mmol/L KCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 (Oncor, Gaithersburg, MD), mindegyik PCR reakció antisense primer-jéből 150 nmol/L, 500 µmol/L mindegyik dNTP-ből (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 2.5 U MMLV-RT, (Oncor, Gaithersburg, MD) és 0.6 µg teljes celluláris RNS. Az M-bcr PCR teszt 'nested' verzióját *Lion és mtsai* szerint (2) végeztük: sense primer 5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTG-3', antisense primer (1. reakció) 5'-CTCCACTGGCCACAAAAT -3', antisense primerek (2. reakció) 5'-GTGAAACTCCAGACTGTC-3' és 5'-CAACGAAAAGGTTGGGGT -3'. Az m-bcr PCR teszt *Nakamura és mtsai* szerint (3) történt. Az RNS minőségét az abl 2–3 exonjának amplifikálásával ellenőriztük *Hermans és mtsai* szerint (4), de 2.0 mmol/L MgCl₂-ot és a 94 °C 1 perc, 50 °C 1 perc, 72 °C 1 perc ciklusból 40-et használtunk: sense primer: 5'-CAGCGGCCAGTAGCATCTGACTT-3', antisense primer 5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3'.

2.3.1.b.3. *Human androgen receptor assay (HUMARA)*. A DNS izolálás standard fenol-kloroform extractioval történt. A HUMARA *Allen és mtsai* módszerének (5) módosított változatával készült. 3×10^3 szortírozott sejtből nyert DNS-t 10 U HpaII és 10 U HhaI metiláció szenzitív restriktációs endonukleázzal 20 µl Multi-Core pufferben (Promega, Madison, WI, USA) 37°C-on, 12 óráig emésztettük. Ezután a DNS 2.5 x volumen 100%-os etanolban precipitáltuk, majd desztillált vízben feloldottuk. A 10 µl PCR reakció elegy ezt a DNS tartalmazta valamint a továbbiakat: 200 µM mindegyik dNTP-ből (GibcoBRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 0,5 U RedTaq DNS polimeráz, 1 µl RedTaq PCR puffer (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 3 pmol mindegyik primerből (5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT C 3' valamint 5'AGA GGC CGC GAG CGC AGC ACC TC 3'). Az amplifikáció MJR Minicycler (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) készülékben történt a következő programmal: predenaturáció 94°C 5 perc, majd 35 ciklus a 94°C 40 msp, 68°C 40 msp, 72°C 1 perc, végső elongáció 72°C, 5 perc. A teljes volument 8%-os nem-denaturáló poliakrilamid gélen 120 V, 25 mA mellett éjszakán átfuttattuk. A gél SYBR Gold-dal (MolecularProbes, Eugene, OR, USA) festettük. A polaroid képeket digitalizáltuk és denzitometriásan NIH Image 1.62 software-rel analizáltuk.

2.3.1.b.4. *Bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával*. A fehérvérsejt koncentrátumból vagy vérből készült, HE-nal vagy MGG-val festett citospin preparátumokat 50%-os ecetsavban utófixáltuk és levegőn szárítottuk. Az átrendeződés kimutatása során LSI bcr-abl dual color DNA kit-et (Vysis Inc. DownersGrove, ILL.) használtunk és a gyártó útmutatásait követtük. A hibridizáció és az előhívás után a lemezeket DAPI/Vectashield mediummal (VectorLaboratories, Inc. Burlingame, CA) fedtük. Normál interfázis magokban az eljárást követően zöld illetve piros színekben 2-2 szignált látunk (bcr – SpectrumGreen; abl – SpectrumOrange). Ph pozitív magokban az egyik bcr-abl génkópia juxtapozíciója miatt az egyik zöld és piros szignál sárga fúziós jelként jelenik meg, mely az átrendeződés bizonyítéka. Hármass 'bandpass' filterrel (VY-DGO; Vysis Inc. DownersGrove, ILL.) felszerelt Zeiss Axioskop epi-illuminációs fluorescens mikroszkópot használtunk a kiértékeléshez. A fals pozitivitást 3 egészséges egyén egyenként 500 perifériás vérsejtjének vizsgálatával határoztuk meg, az érték 3.4% -nak adódott, ezért a fals pozitivitás határaként az átlag + 2 SD = 4.8 % értéket kerekítve 5%-ban jelöltük meg.

2.3.1.c. Sejtvonal specifikus genetikai analízis iFISH-sel és digitális mikroszkópiával

A HE illetve MGG festett citospin preparátumokat vagy keneteket transzmissziós fény és epi-illuminációs fluoreszcens üzemmódban is működő, léptető motorral és 3-CCD színes kamerával (model HV-C20; HitachiDenshi, Ltd. Tokyo,) valamint hármass 'bandpass' filterrel felszerelt Zeiss Axioskop mikroszkópban vizsgáltuk. Vegyes sejtpopulációkat tartalmazó látómezőket digitalizáltunk, a hozzájuk tartozó X-Y koordinátákat rögzítettük. Ezután a bcr-abl átrendeződés specifikus iFISH eljárást elvégeztük, majd az áteső fényben rögzített képeket relokalizáltuk. A FISH szignálokat csak a DAPI képek alapján intaktnak ítélt magokban értékeltük ki. A tárolt transzmissziós fénymikroszkópos valamint a fluoreszcens képek összehasonlítása alapján megállapítottuk, hogy a morfológiailag azonosítható lymphoblastok, érett myeloid elemek, reaktív lymphocyták és erytroblastok a transzlokációra pozitívak vagy negatívak voltak. Így lemezenként átlagosan 150 sejtet tudtunk vizsgálni, melyek 32-93 %-a lymphoblast volt morfológiailag.

2.3.1.d. Áramlási citometriás fenotipizálás

Az immunglobulin (Ig) nehéz és könnyűláncokon kívül a többi felszíni antigén háromszínű jelöléséhez teljes vérmintákat használtunk. 100 µl vérhez 20 µl FITC vagy phycoerythrin jelölt anti-CD illetve PerCP jelölt anti-CD45 antitesteket adtunk, 30 percig szobahőn inkubáltuk, majd FACS-Lysing oldattal (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) távolítottuk el a vörösvértesteket. Ezt PBS mosás majd 1%-os paraformaldehid fixálás követte. A következő márkereket vizsgáltuk: CD3, CD5, CD7, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD33, CD34, CD45, CD61, CDw65, HLA-DR, sIg könnyűláncok, felszíni és intracytoplasmikus (i.c.) µ-lánc, myelo-peroxidáz, lactoferrin, TdT (BDIS ill. DAKO A/S). A felszíni kappá és lambda könnyűláncok valamint a µ-nehézlánc jelöléshez a sejteket denzitás grádiens centrifugálással nyertük a vérmintákból. Minden más lépés megegyezett a sejtfelszíni antigéneknél használtakkal, de a procedura végén a fixálást mellőztük. Az i.c. antigének detektálására FIX & PERM permeabilizációs kit-et használtunk a gyártó előírásai szerint (Caltag Laboratories, San Francisco, CA). A méréseket három fluoreszcens paraméter detektálására alkalmas FACSort típusú áramlási cytométerrel végeztük (BDIS). A mérések során használt erősítéseket és színekompenzációt normál humán vérből származó leukocytákra állítottuk be manuális módon a CellQuest szoftver (BDIS) segítségével. A mérések eredményeit ugyanezzel a szoftverrel értékeltük ki. 10000 sejtről/minta gyűjtöttük az adatokat. A blastok arányát a CD45 vs SSC hisztogram valamint a CD10 és CD34 pozitivitás alapján is számoltuk. A blastok arányát a két érték átlagaként határoztuk meg.

2.3.1.e. Hisztológia–Citokémia – Immunhisztológia

A crista biopsiás mintát 4%-os formalinban fixáltuk 24 óráig majd EDTA oldatban dekalcináltuk további 24 óráig. A szövettani minta standard eljárással került víztelenítésre és paraffin beágyazásra. A 4 µm-es paraffinos metszeteket haematoxin-eosinra, PAS-ra és Giemsa-ra festettük. A perifériás vér és csontvelő keneteket May-Grünwald Giemsa-val festettük és Berlini kék, myelo-peroxidáz, kloroacetát észteráz, alfa-naftil acetát észteráz (pH 5.8 and 7.2) valamint alkalikus és savi foszfátáz (tartaráttal illetve anélkül) citokémiai reakciókat végeztünk rajtuk. A paraffinos metszeteken a nukleoláris organizációs régiót (NOR) ezüstözéssel tüntettük fel (Ag-NOR) **(6)**. A megakaryocita specifikus immunhisztológiai jelölésre anti-human von Willebrand faktor (vWF) primér antitestet (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) használtunk, az immunhisztológia további részletei a 2.4.b. pont alatt találhatók.

2.3.1.f. Képanalízis–Morfometria

A digitális képeket 3-CCD színes kamerával (HV-C20 model, HitachiDenshi, Tokyo, Japan) és IMAN, version 1.4 képanalizáló software-rel (MTA-KFKI-ATKI, Budapest, M.o.) felszerelt Zeiss Axioskop transzmissziós fénymikroszkóp munkaállomáson rögzítettük és analizáltuk. A vertikális és horizontális kalibrációt valamint a pixel – mikrométer konverziót mikronbeosztású mikroszkóp lemez (Graticules Ltd., Tonbridge, England) segítségével végeztük. A digitális képeket a 0–255 skálára normalizáltuk. A bcr+ valamint a Ph+ ET betegek crista biopsiájának 5 széria metszetében 3 paramétert – a csontvelő cellularitását, a megakaryocyták méretét és a teljes NOR area/megakaryocyta mag értéket – mértünk. Ugyanezen paramétereket, kontrolként, 8 bcr-, Ph- típusos ET betegben valamint 8 bcr+, Ph+ típusos CML betegben is vizsgáltuk. Három kontrol CML beteg a b3/a2, 5 pedig a b2/a2 bcr-abl kiméra mRNS-t expresszált, a Ph+ vörsejtek aránya 67% és 91% között mozgott.

CELLULARITÁS. Ez a paraméter a haemopoetikus parenchyma valamint a teljes intertrabeculáris terület arányát jelenti és %-ban adtuk meg. Az intertrabeculáris területet grafikus tábla segítségével interaktívan jelöltük és határoztuk meg a HE-ra festett széria metszetek teljes hosszában. A haemopoetikus parenchyma által elfoglalt illetve attól mentes (pl. zsírsejtek, erek) területeket interaktív szűrkeségi fok alapú diszkriminációval és méret filterrel határoztuk meg.

MEGAKARYOCYTA MÉRET. A Megakaryocytákat a vWF immunhisztológiai festés alapján azonosítottuk majd szűrkeségi fok alapján diszkrimináltuk és mindegyik sejt teljes területét külön-külön lemértük.

TOTAL NOR AREA/MEGAKARYOCYTA MAG. Ezt a paraméteret az Ag-NOR-ra festett széria metszeteken nyertük. A megakaryocytákat morfológiailag azonosítottuk és a total NOR areát megakaryocytánként a korábban leírtaknak megfelelően (7) mértük.

2.3.1.g. Áramlási citometriás sejtszortírozás

A szortírozás céljára a vér illetve a csontvelő mintákat anti-human CD45-RPE-Cy5 (DAKO A/S, Denmark) antitesttel jelöltük a gyártó instrukciói szerint, a sejtszeparálás FACSsort flow citometerrel (BDIS, San Jose, CA, USA) történt. A szortírozó kapukat a lymphocytá és granulocytá populációkra helyeztük a CD45/SSC hisztogrammon. Átlagosan 10^5 lymphoid valamint myeloid sejtet nyertünk mintánként. A szortírozott sejteket TE pufferben (pH 9), -20°C -on tartottuk a DNS kivonásig.

2.3.1.h. Metafázis citogenetika

A kromoszóma vizsgálatok a standard módszerek alkalmazásával történtek (POTE, Gyermekklinika). Csontvelőből direkt feldolgozással és 24 órás inkubálást követően, vérből a lymphocyták 72 órás fitohemagglutinines tenyésztése után készítettünk preparátumokat. Legalább 25, de lehetőleg 50 mitózist elemeztünk ki. Eredményeink között a készítmények értékelhetősége mellett a modális kromoszómaszámot, az aberráns klónok százalékos arányát és a strukturális elváltozásokat is megadtuk. Egyes minták feldolgozására a Szent László Kórház Citogenetikai Laboratóriumában került sor. Legalább 25, de preferáltan 50 mitózist értékeltünk ki numerikus és strukturális kromoszóma aberrációkra, meghatároztuk az aberráns klónok arányát.

2.3.1.i. Statisztikai analízis

Az adatokat Anova variancia analízissel vizsgáltuk, majd az egyes csoportok közötti különbségeket Bonferroni módszerével értékeltük.

2.3.2. Ph+ /bcr-abl átrendeződést mutató ritka kórképek

2.3.2.a. Betegtörténet – Beteganyag

2.3.2.a.1. Az 55 éves férfit felső hasi – epigastriális fájdalom, gyengeség, szédülés és melaena miatt vették fel. A laboratóriumi leletek közül a jelentős hepatosplenomegalia, a thrombocytosis és a leukocytosis emelendő ki. A perifériás vér és a csontvelő aspirátum citológiai, citokémiai valamint molekuláris leletei alapján atipusos vonásokat mutató Ph pozitív chronicus granulocytás leukaemia (CGL) típusú chronicus myeloproliferatív betegség (CMB) diagnosis került felállításra. A betegség 32 hónapos lefolyása során – interferon – α (IFN- α) intolerancia miatt – hydroxyurea kezelés történt. A betegség chronicus fázisban maradt, de sem klinikai, sem cytologiai remissziót nem sikerült elérni. Végül myeloblastos crisis fejlődött ki, és az alacsony dóziszú cytosin-arabinosid kezelés ellenére a beteg exitált. A betegség kezdetén valamint a követés során nyert laboratóriumi, cytologiai-histologiai és molekuláris leletek részleteit a '3.3.2.b. Eredmények' fejezet tartalmazza.

2.3.2.a.2. Klinikailag valamint a laboratóriumi-hisztologiai-molekuláris leletek alapján chronicus myeloproliferatív betegségnek (CMB) megfelelő 106 konzekutív beteg illetve ezek csontvelője képezte a tanulmány tárgyát. Mindegyik beteg kezeletlen volt és a crista biopsia a primer diagnosztikai folyamat során került kivételre. A CMB-eket a WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues szerint osztályoztuk **(8)**. Crista biopsia (esetenként aspirátum is) valamint perifériás vérminta minden esetben rendelkezésre állt. Egy beteg (#105) egy korábbi tanulmány tárgya is volt **(9)**. Kontrol csoportként 40 indolens B-sejtes malignus lymphomas beteg (18 CLL, 9 follicularis lymphoma /FL/, 7 myeloma multiplex /MM/, 4 marginalis zóna lymphoma /MZL/, 1 HCL, 1 Waldenström macroglobulinaemia) valamint további 50, nem B-sejtes lymphoma típusú malignomában szenvedő beteg klinikai stádium megállapítás céljából vett crista biopsiája szerepelt.

2.3.2.a.3. A 40 éves férfi súlyvesztés, gyengeség és hasi panaszok miatt került felvételre. Laboratóriumi adatok felvételkor: fehérvérsejt 60 G/l, thrombocyta 169 G/l, haemoglobin 19 g/l, máj 1.5 cm-rel, lép 10 cm-rel haladta meg a bordaívket. A patomorfológiai, fenotípus és genotípus vizsgálatok két különböző, de együttesen fennálló neoplasiára, chronicus myeloid leukaemiára (CML) valamint hajassejtes leukaemiára (HCL) utaltak (részletek a '3.3.2.b. Eredmények' fejezetben). Hydroxyurea kezelést követően allogén csontvelő transzplantáció történt. Ezt követően súlyos infekciók uralták a klinikai képet és a beteg 5 hónappal a transzplantáció után interkurrens fertőzésben meghalt. Az autopsiás leletek negatívak voltak mind CML-re, mind HCL-re.

2.3.2.b. Citologia-Hisztológia-Immunhisztológia

A citologiai–citokémiai és szövettani feldolgozás a 2.3.1.e. pont szerint történt. Szilanizált lemezekre felhúzott 3-4 µm-es paraffinos crista biopsiás metszeteket CD3, CD5, CD10, CD20, CD23, kappa és lambda könnyűláncok, cyclin D1 illetve esetleg DBA44 márkert specifikus monoclonalis antitestekkel jelöltük. Az immunhisztológia további részletei a 2.4.b. pont alatt találhatók

2.3.2.c. Molekuláris vizsgálatok

2.3.2.c.1. RNS izolálás. Az RNS izolálás Chomczynski és Sacchi módszere szerint történt **(10)**.

2.3.2.c.2. DNS extrakció paraffinba ágyazott anyagból. A genomikus DNS-t mérettől függően egy vagy kettő 10 µm vastag formol-paraffin metszetből nyertük. A metszeteket deparaffináltuk, a lecentrifugált pellet-re 100-200 µl, 200 µg/ml proteináz K-t (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) tartalmazó emésztő puffer-t (10mM Tris-HCl / pH:8.3/, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Triton X-100, 0.45% Tween 20) helyeztünk, az emésztés 56°C-on, éjszakán át történt. Emésztést követően a proteináz K-t 95 °C-on 10 percig inaktiváltuk és a durva lizátumot közvetlenül használtuk fel a PCR amplifikációhoz.

2.3.2.c.3. M-bcr ill. m-bcr RT-PCR és szekvencia analízis-I. A Philadelphia transzlokáció M-bcr illetve m-bcr típusainak detektálására két-két különböző módszert használtunk *Delfau és mtsai (1990)*, *Lion és mtsai (1991)*, *Kawasaki és mtsai (1988)* valamint *Nakamura és mtsai (1991)* szerint **(11, 12, 13, 14)**. Az RNS izolátum minőségét a β-aktin és az abl exon 2-3 szekvenciák *Delfau és mtsai (1990)* valamint *Hermans és mtsai (1988)* szerinti amplifikációjával ellenőriztük. **(11, 15)**.

Az M-bcr típusú kiméra mRNS RT-PCR termékét pCR 1000 vektorba klónoztuk TA cloning system (Invitrogen, San Diego, CA) felhasználásával a gyártó utasításait követve. A plazmid preparátumból DNS szekvenálás történt Sequenase version 2.0 (United States Biochemical, Cleveland, OH) rendszer felhasználásával a gyártó instrukciói szerint. A három klónból nyert szekvenciákat összehasonlítottuk az NCBI GenBank Sequence Database HSABLGR3 és HSUO7000 lokuszainak szekvenciáival.

2.3.2.c.4. IgH génátrendeződés és szekvencia analízis-II. Az átrendeződött IgH CDR III régióját konszenzus V_H (5'- CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT G -3') J_H (5'- AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C -3') primerekkel amplifikáltuk. A PCR elegy összetétele: 200 µM mindegyik dNTP-ből (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A.), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8,3), 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol mindegyik primerből, 1.25 U Taq DNS

polimeráz (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, Missouri, USA). Az amplifikáció a 40 msp 94°C, 30 msp 55°C, 40 msp 72°C paraméterekkel 40 ciklusban, thermocycler-ler (MiniCycler, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) történt. A PCR terméket 10% poliakrilamid és/vagy 2% agaróz gélelektroforézissel frakcionáltuk, 0.5 µg/ml ethidium-bromid-dal vizualizáltuk. Monoklonalitást feltételeztünk, ha 1 vagy 2 diszkrét sáv jelent meg a 100-150 bp tartományban. A monoklonálisnak ítélt DNS sávokat kivágtuk, a DNS-t QIAEX II Gel Extraction Kit-tel (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) extraháltuk. A kinyert DNS-t pGEM-TEasyVector-ba szubklónoztuk és ezzel E.coli JM109 High Efficiency Competent Cells (pGEM-TEasyVector System, Promega, Madison, USA) törzset transzformáltunk. A transzformált baktériumokat LB/ampicillin/IPTG/X-Gal lemezekon növesztettük, a rekombináns klónokat a kék/fehér szín alapján azonosítottuk. 5 fehér kolóniát LB/ampicillin mediumban felnövesztettünk és a plazmid DNS-t QIAprep Spin Miniprep Kit-tel (QIAGEN GmbH) kinyertük. Az inzerteket a ligációs végekhez illeszkedő primerekkel BigDye^R Terminator v1.1. cycle sequencing kit segítségével PCR-rel amplifikáltuk és ABI PRISM 310 GeneticAnalyser (AppliedBiosystems, CA, USA) berendezéssel szekvenáltuk. Monoklonalitást csak akkor véleményeztünk, ha identikus szekvenciákat (legalább 5-ből 4-et) detektáltunk.

2.3.2.c.5. *Szomatikus hipermutáció analízis.* A vizsgálatot a 4, a crista biopsiából extrahált DNS alapján monoklonális IgH CDR III régiót mutató beteg közül 3-nak a vérsajtjeiből extrahált DNS-én végeztük el. A CDR III régió amplifikáció alapján mindhárom betegnél a vérből illetve a crista biopsiából nyert PCR amplikon molekulásúlya és szekvenciája megegyezett. A CDR I – FR II – CDR II – FR III régiót család specifikus FR1 és konszenzus J_H primerekkel amplifikáltuk (16). Reakcióelegy: 400 µM dNTP-kból, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8,3), 2 mM MgCl₂, 2,5 pmol mindegyik primerből, 1 U Taq DNS polimeráz; amplifikáció: predenaturáció 94°C, 2 perc, a 45 msp 92°C, 45 msp 60°C, 45 msp 72°C ciklusból 35, elongáció 72°C, 10 perc, thermocycler: iCycler (Biorad). A PCR terméket 8%-os poliakrilamid gélen frakcionáltuk, kivágtuk, és Gen Elute Gel Extraction Kit-tel (Sigma) kinyertük, szubklónoztuk, az E.coli JM109 törzset transzformáltuk a 2.3.2.c.4. pont szerint, 3–5 klónt ABI Prism 310 berendezéssel szekvenáltuk és IMGT /V-Quest (<http://imgt.cines.fr:8104/textes/vquest/>) valamint V-Base DNAPLOT (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php>) software-ekkel vizsgáltuk. A V régió mutációit a germline génekkel történő összehasonlítással azonosítottuk. A germline génekkel fennálló identitást

valamint a megfigyelt 'replacement' (R) és 'silent' (S) mutációkat meghatároztuk. A CDR régióban elméletileg várható R/S arányt komputer algoritmussal számoltuk ki.

2.3.2.c.6. *Human androgen receptor assay (HUMARA)*. A vizsgálatot a 2.3.1.b.3. pont alatt leírtak szerint végeztük.

2.3.2.c.7. *Bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával*. A vizsgálatot a 2.3.1.b.4 pont alatt leírtaknak megfelelően végeztük.

2.3.2.c.8. *Sejtvonal specifikus interfázis citogenetikai analízis* A sejtvonal specifikus interfázis cytogenetikai analízis konzekutív kettős immunfluoreszcens jelöléssel (CD11c+anti-m-Ig-biotin+streptavidin-FITC; CD19+anti-m-Ig-rhodamin), komputer asszisztált relokalizációval és iFISH-sel a 2.3.1.c. pontban leírtak szerint történt.

2.3.2.d. Áramlási citometriásfenotipizálás

A vizsgálatokat a 2.3.1.d.. pontszerint végeztük

2.3.3. Chronicus myeloid leukaemia molekuláris monitorizálása

2.3.3.a. Beteganyag

A vizsgálatok során a Pécsi OTE, Pathológiai Intézetébe 1998-2001 közötti időszakban a Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság Myeloproliferatív Munkacsoportja (Városi Kórház, Krónikus Belgyógyászati Osztály, Baja; Petz Aladár megyei Kórház, II. sz. Belgyógyászati és Haematológiai Osztály, Győr; „Kaposi Mór” megyei Kórház, I. sz. Belgyógyászati Osztály, Kaposvár; Semmelweis Kórház, II. sz. Belgyógyászati és Haematológiai Osztály, Miskolc; POTE, I. sz. Belgyógyászati Klinika, Pécs; Tolna megyei Kórház, IV. sz. Belgyógyászati Osztály, Szekszárd; Fejér megyei Szt. György Kórház, I. sz. Belgyógyászati Osztály, Székesfehérvár; Vas megyei Markusovszky Kórház, Haematológiai Osztály, Szombathely; Szt. Borbála Kórház, II. sz. Belgyógyászati Osztály, Tatabánya; Veszprém megyei Csolnoky Ferenc Kórház, Veszprém) osztályairól érkezett 68 CML-es beteg összesen 155 vérmintáját dolgoztuk fel. Ebből 51 minta kezeletlen betegtől származott, akik a publikált kritériumok szerint chronicus fázisban voltak (17). 104 minta α -interferon (α -IFN) kezelt betegtől származott. Az α -IFN kezelés nemzetközileg elfogadott elvek alapján történt és hydroxyurea-val kiváltott citoredukció vezette be (18). Az átlagos követési idő 14 hónap (4-35 hó) volt (19).

A tirozin kináz terápiás érából 197 új illetve követett beteg csontvelő és/vagy perifériás vér anyagát vizsgáltuk. iFISH-t 1047 mintán, valós idejű kvantitativ RT-PCR vizsgálatot (RQ-PCR) 113, míg csontvelői kariotipizálást 247 esetben végeztünk (20).

Az automatizált iFISH jelminta analízálási tanulmányunkban 3 egészséges felnőtt, 3 akcelerált fázisban levő CML-es beteg, 18 további, interferon terápiára rezisztens, ezért imatinib terápiában részesülő CML-es beteg vérkeneteit valamint a Ph kromoszóma pozitív (Ph+) SD-1 sejtvonal citológiai preparátumait használtuk (21).

2.3.3.b. Molekuláris vizsgálatok

2.3.3.b.1. RNS izolálás. 2×10^7 fehérvérsejtet tartalmazó sejtszuspenzióból teljes RNS-t izoláltunk, Trizol reagenssel a használati utasítás szerint. Az oldatot 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re hígítottuk.

2.3.3.b.2. Reverz transzkripció (RT). Kétféle RT reakciót végeztünk. A kvalitatív M-bcr PCR reakcióhoz szükséges RT (a2-RT) 10 μl térfogatban, 2.4 U MMLV-RT (Maloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase; Life Technologies, Gaithersburg, MD) enzim, 2 μl 5X reakciópuffer (Life Technologies, Gaithersburg, MD), a négyféle dNTP-ből

egyenként 500 $\mu\text{mol/l}$, 60 μg RNS valamint 15 nmol/l M-bcr PCR 1. lépés antisense primer (a2) jelenlétében, 37°C-on, 60 percig történt. Az abl 2-3 PCR reakcióhoz valamint a kvantitatív PCR (Q-PCR) reakcióhoz szükséges RT (a3-RT ill. Q-RT) 30 μl térfogatban, 7.2 U MMLV-RT enzim, 6 μl 5X reakció puffer, egyenként 500 $\mu\text{mol/l}$ dNTP, 180 μg RNS valamint 15 nmol/l abl 2 -3 PCR reakció antisense primer (a3) jelenlétében, 37°C-on, 60 percig történt.

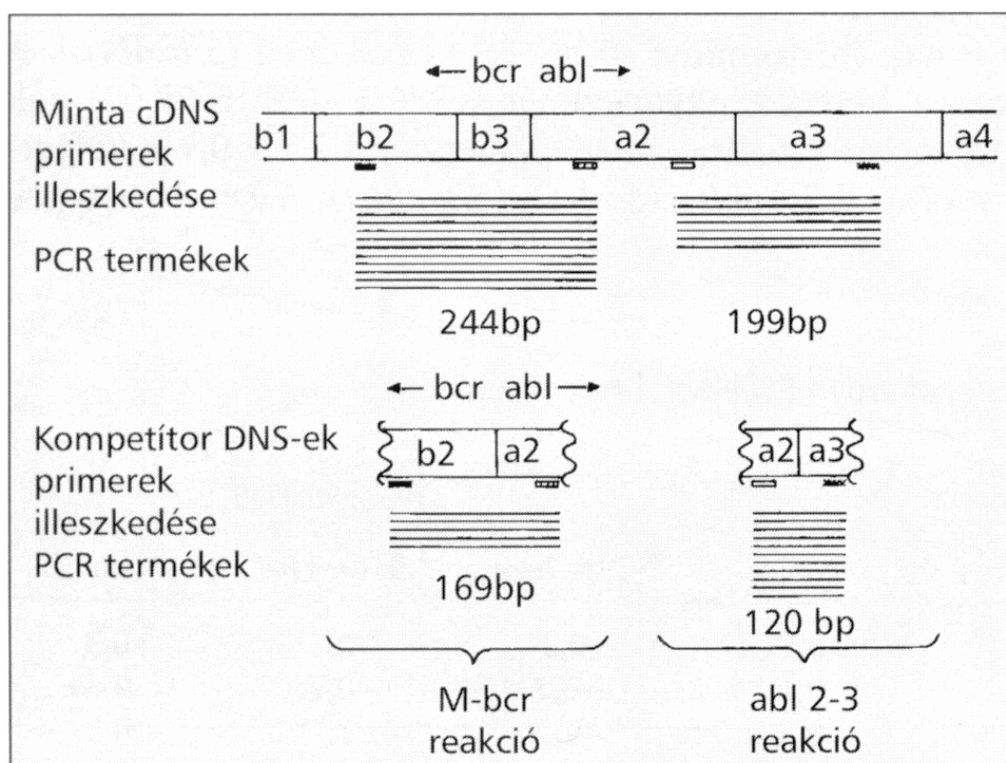
2.3.3.b.3. *Kvalitatív polimeráz láncreakció (PCR).* A vizsgált Ph^+ beteganyagok molekuláris diagnosztikáját, a kiméra mRNS b3/a2, b2/a2 illetve kever típusának meghatározását az M-bcr régió Gaiger és mtsai (1995) által leírt nested PCR reakcióval történő amplifikálásával végeztük (22). A megfelelő minőségű RNS izolátum ellenőrzése a transzlokációban nem résztvevő, attól közvetlenül telomerikus irányban elhelyezkedő abl 2 - 3. exon szakasz PCR amplifikálásával történt Hermans és mtsai (1988) szerint (15).

2.3.3.B.3.1. M-BCR PCR REAKCIÓ. A nested reakció 1. lépésében 94°C, 40 s; 54°C, 30 s; 72°C, 40 s ciklus paraméterekkel hajtottuk végre az amplifikálást, melyet 2 perc 94°C-os elődenaturálás előzött meg és 7 perc 72°C-os végső extenzió követett. Az 50 μl reakcióelegy 2.0 mmol/l MgCl_2 -ot, 50 mmol/l KCl-ot, 10 mmol/l TrisHCl-ot (pH 8.6), 15 nmol/l sense és antisense primert, egyenként 300 $\mu\text{mol/l}$ dNTP-t és 1 U Taq polimerázt (RED Taq, SIGMA Chemical Co St. Louis, MO) tartalmazott. A sense primer szekvenciája 5'-TTC AGA AGC TTC TCC CTG-3', az antisense primeré 5'-CTC CAC TGG CCA CAA AAT -3' volt, 35 ciklust alkalmaztunk. A 2. lépésben a reakcióelegy egyenként 15 nmol/l primert tartalmazott, a sense primer szekvenciája 5'-GTG AAA CTC CAG ACT GTC-3', az antisense primeré 5'-CAA CGA AAA GGT TGG GGT -3' volt, a többi összetevő mennyisége megegyezett az 1. lépésben leírtakkal. 25 ciklust alkalmaztunk, az 1. lépés paramétereivel.

2.3.3.B.3.2. ABL 2-3 PCR REAKCIÓ 2 perc 94°C-os elődenaturálás után 40 ciklust hajtottunk végre a következő paraméterekkel: 94°C 1 perc, 50°C 1 perc, 72°C 1 perc, melyet 5 perc 72°C-os végső extenzió követett. A reakcióelegy egyenként 150 nmol/l primert tartalmazott, a sense primer szekvenciája 5'-CAG CGG CCA GTA GCA TCT GAC TT-3', az antisense: 5'-TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA G-3' volt, a többi összetevő mennyisége megegyezett a M-bcr PCR reakció 1. lépésében leírtakkal. A PCR reakció termékeket agaróz gélen elektroforetizáltuk, etidium bromiddal tettük láthatóvá.

2.3.3.b.4. *Kvantitatív bcr-abl expresszió vizsgálat.* A kiméra mRNS mennyiségi meghatározását egyrészt kompetitív kvantitatív polimeráz láncreakcióval (Q-PCR, α -IFN éra betegek) végeztük (2.3.3.1. ábra). Ennek lényege, hogy a PCR elegy a mennyiségileg

meghatározandó cDNS molekula (jelen esetben a bcr-abl ill. az abl 2-3 szakasz) primer kötőhelyeit ugyancsak tartalmazó, de attól eltérő bázispár hosszúságú (molekulasúlyú), ismert mennyiségű DNS molekulát (kompetitort) is tartalmaz.

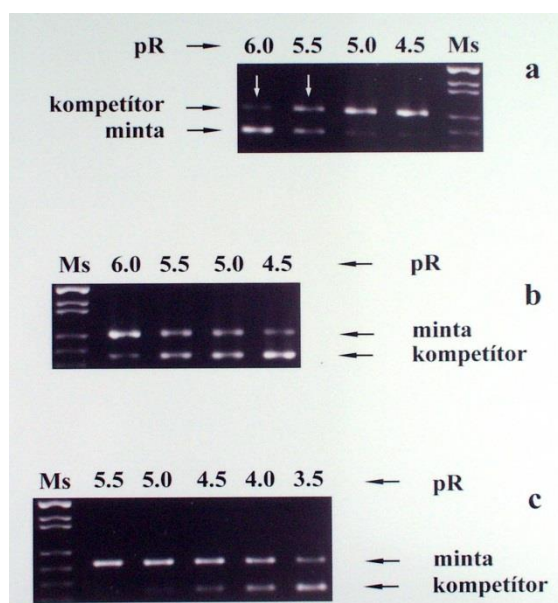


2.3.3.1. ábra A kompetitív polimeráz láncreakció elvének sémás ábrázolása (az ábra az alkalmazott 'nested' Q-PCR eljárásnak csak az egyik lépését mutatja) (23)

Emiatt az amplifikálás során az utóbbi DNS molekula versenyben (kompetícióban) van a primerekért és a szubsztrátért a vizsgált ismeretlen mennyiségű cDNS-sel szemben. Az egymással kompetícióban levő DNS molekulák kiindulási anyagmennyiségeinek valamint az amplifikált végtermékeinek az aránya megegyezik. Abban az esetben, ha a kiindulási cDNS és kompetitor anyagmennyiség megegyezik, akkor a primerek kötődésének (és a DNS szakasz ezt követő amplifikálásának) valószínűsége a kétféle DNS-hez 50-50%, a gélelektroforézis során megjelenített amplifikátumok mennyisége megegyezik. Ezt ekvivalencia pontnak nevezzük. Az ekvivalencia pont a kompetitor különböző mennyiségének alkalmazása mellett (hígítási sor) meghatározható. Az RNS izolálás hatékonyságából, egyes mRNS molekulák esetlegesen eltérő stabilitásából adódó pontatlanságok kiküszöbölése érdekében a bcr-abl szekvencia és az ahhoz közvetlenül telomerikusan csatlakozó abl 2-3 exon arányával jellemeztük a bcr-abl mRNS mennyiségét. A reverz transzkripció esetleges eltérő hatékonyságából eredő pontatlanságot a Q-RT típusú (l. fent) reverz transzkripció alkalmazásával, azaz az abl 2 -3 valamint a bcr-abl régió egy reakcióban cDNS-sé történő átírásával küszöböltük ki.

2.3.3.B.4.1. KOMPETÍTOROK. Az M-bcr reakcióhoz b2a2 töréspontú minta esetén b3a2 töréspontú, a b3a2 töréspontú minta esetén b2a2 töréspontú mRNS RT-PCR amplifikátumát használtuk kompetítorként. Az előbbi kompetitorhoz K562 sejtvonalból izolált, az utóbbihoz korábban már vizsgált beteg véreből izolált RNS szolgált kiindulásként. Az a2-RT típusú reakciót hajtottuk végre, majd a cDNS-t az M-bcr PCR 1. lépésével amplifikáltuk. A kapott terméket akrilamid gélen elektroforetizáltuk és standard módszerekkel izoláltuk. A koncentrációt UV fotométerrel 260 nm-en határoztuk meg. Az abl 2-3 exon reakcióhoz szintetikus kompetítort használtunk: 5'-CAG CGG CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT CAG GGT CTG AGT GAA GCC GCT CGT TGG AAT TCC AAG GAA AAC CTT CTC GCT GGA CCC GTG AAA AGC TCC GGG TCT TAG GCT ATA ATC ACA-3' (Integrated DNA Technologies, Inc Coralville, IA). A kompetitorok 10 mM-os TE pufferben készült oldatából 3.16 alapú ($=\sqrt{10}$) logaritmikus hígítási sort készítettünk.

2.3.3.B.4.2. Q-PCR. Előkísérletek során megállapítottuk, hogy a betegminták kiméra mRNS koncentrációja a 0.01-1000 fM, az abl 2-3 mRNS koncentrációja pedig a 10-1000 fM tartományba esett. A Q-PCR eljárás során e tartományt reprezentáló kompetitor jelenlétében végeztük el a fent leírtakkal megegyezően az M-bcr illetve az abl 2-3 PCR reakciókat. Az amplifikált bcr-abl, a2-a3 szakaszokat valamint a ko-amplifikált kompetitorokat agaróz gélelektroforezissel vizualizáltuk és meghatároztuk az ekvivalencia pontot (2.3.3.2. *ábra*).



2.3.3.2. *ábra*. A Q-RT-PCR reakció termékeinek gél elektroforetikus képe. *a*) M-bcr reakció, b2a2 töréspont esetén / az ekvivalencia pontot határoló két kompetitor hígítást a fehér nyilak jelzik/, *b*) M-bcr reakció, b3a2 töréspont esetén, *c*) abl 2-3 reakció. A kompetitor mennyisége a nM-ra vonatkoztatott koncentráció negatív logaritmusában van kifejezve: pl. pR 3 = 1 pM; pR 6 = 1 fM.(23)

2.3.3.B.4.3. A valós idejű kvantitatív PCR (RQ-PCR) vizsgálatot a TKI projekt betegekben IPSOGEN Bcr-Abl Mbcr Fusion Quant Kit (# 670123) reagensekkel és a gyártó útmutatása szerint MJ Research DNA Engine Chromo 4 PTC-200 készülékben végeztük.

2.3.3.c. bcr-abl átrendeződés kimutatása interfázis citogenetikával

A vizsgálatok során a 2.3.1.b.4. pont alatt leírtaknak megfelelően jártunk el. A kiértékelés során nem súlyoztuk az egynél több Ph kromoszómát tartalmazó sejteket, tehát a %-os Ph pozitivitás megállapításánál az 1 vagy az 1-nél több transzlokációt tartalmazó sejtet egyaránt 1 db Ph+ sejtnek minősítettük (l. 1.3.2.d. ábra). Három egészséges egyén fehérvérsejtjein végzett kontrol vizsgálatok során a fals pozitivitás átlag + 2 S.D. értéke 4.8%-nak adódott, ezért a pozitivitás határt 5%-ban állapítottuk meg. A következő cytogenetikai válasz kategóriákat határoztuk meg: nincs válasz (66% <Ph+ sejt), minor válasz (33% <Ph+ sejt ≤ 66%), major válasz (1% ≤Ph+ sejt ≤33%), teljes válasz (nincs Ph+ sejt) **(24)**. Figyelembe véve a fals pozitivitást, 1 % valódi pozitivitás 6/100 fúziós szignálra pozitív sejtet és a teljes citogenetikai válasz pedig ennél kevesebb arányú pozitív sejtet jelent. Az automatizált iFISH analízishez is BCR/ABL kétszinű, egyszeri fúziós (SF) próba kített (Vysis, Downers Grove, IL) használtunk a citológiai preparátumokon, a gyártó utasításai szerint.

2.3.3.d. Ph kromoszóma kimutatás kariotipizálással

A heparinnal alvadásgátolt vérmintákat 37°C-on tenyésztettük 24 és 48 óráig. 60 perces kolchicin kezelést (0.375 µg/ml) követően a mintákat hipotonizáltuk, (0.075M KCL, 37°C-on 30 percig), majd metanol/ecetsav (3:1) elegyében fixáltuk. Ismételt mosást követően a sejteket tisztított tárgylemezre cseppentettük, és levegőn szárítottuk. A G-sávozást Leishman-festékkel végeztük, a metafázisokat Nikon Microphot mikroszkóppal, illetve Ikaros kariotipizáló szoftverrel (Metasystems, Altlußheim) értékeltük a Nemzetközi Citogenetikai Nomenklátúra (2005) szabályainak megfelelően. A terápiás válasz kategóriák a következők voltak: komplett 0% Ph+ sejt, parciális 1-35% Ph+ sejt, (major 0-35% Ph+ sejt), minor 36-65% Ph+ sejt, minimális 66-95% Ph+ sejt, nincs válasz >95% Ph+ sejt **(25)**.

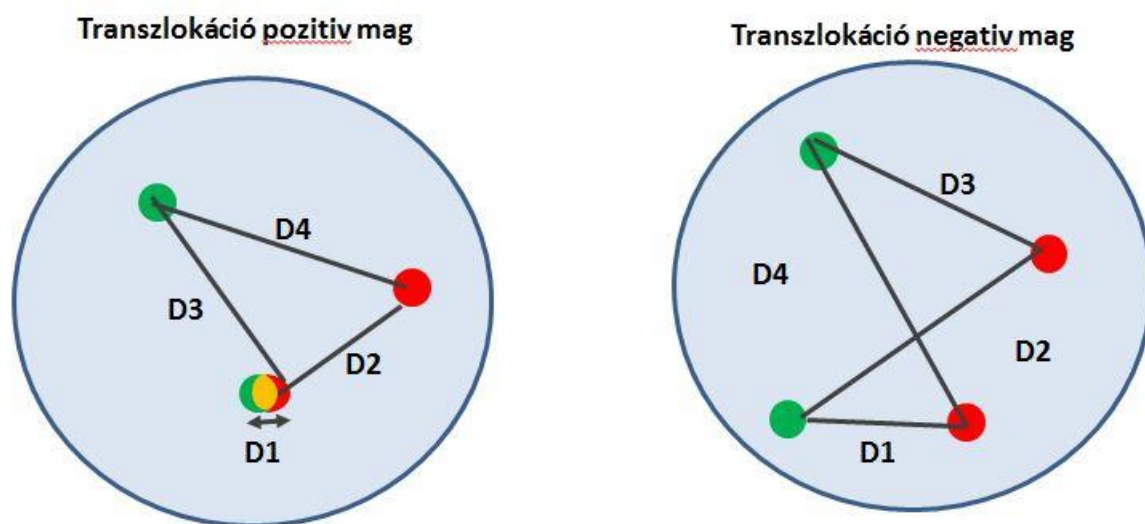
2.3.3.e. Automatizált iFISH analízis. Citometria.

Az automatizált iFISH szignál analízist Metafer4 (MetaSystems, Altlußheim, N.o.) automatizált fluorescens metszet szkennelő rendszerrel végeztük, melynek mikroszkóp alapját egy Zeiss Axioplan2ie MOT motorizált epi-fluoreszcens mikroszkóp képezte, mely BW CCD

kamerával (CV-M1, JAI, Dánia) volt felszerelve. Az automatizált analízis 3 fő részelemből állt: sejtmag szelekció, iFISH szignal detektálás és iFISH szignál távolságok 3D mérése.

2.3.3.e.1. Sejtmag szelekció. Ezt virtuális grid előfokuszálást, majd minden képmező további automatizált finom fókuszálását követően 4 paraméter beállításával optimalizáltuk. A relatív DAPI intenzitás, a maximum és minimum mag terület, a maximum konkáv mélység és a maximum átló arány megfelelő értékeit interaktív training rendszerben határoztuk meg.

2.3.3.e.2. iFISH jel detektálás. Az iFISH jeleket a megfelelő szincsatornában (SpOrange és SpGreen) a magok teljes mélységét áttekintő 5, egymástól 0.5 μm távolságra levő fókuszsikban, a kontraszt, intenzitás, terület és a másik, ugyanolyan színű szignáltól mért, tényleges 3D legkisebb távolság alapján azonosította a rendszer.



2.3.3.3. ábra. A transzlokáció pozitív és negatív magok sémás ábrázolása. A sárga szín a fúziós szignált jelzi. D1-4 a különböző színű jelek közötti távolságokat jelzi növekvő sorrendben.

2.3.3.e.3. iFISH szignál távolság mérés. Az azonosított zöld illetve piros szignálok geometriai centruma közötti tényleges 3D távolságot 40X objektív használata mellett pixelben (1 pixel 0.168 μm) határozta meg a rendszer. A magonkénti 2 piros és 2 zöld szignál esetén ez 4 távolság mérést jelentett (2.3.3.3. ábra). A legkisebb mért távolság adatot használtuk a Ph⁺ és Ph⁻ magok közötti diszkrimináláshoz. A zöld és piros jelek közötti 4 távolság közül a legkisebb távolság eloszlását homogén Ph⁺ illetve Ph⁻ sejtpopulációkon tanulmányoztuk, hogy a két populációt optimálisan szeparáló vágási pontot ('cut-off érték) meghatározzuk.

2.4. Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív B-sejtek klonális fejlődése T-sejtes malignus lymphomákban

2.4.a. Betegtörténet - Beteganyag

2.4.a.1. 1.sz.beteg A 42 éves férfi több régióra kiterjedő lymphadenomegalia, multiplex vöröses-lilás, elevált, viszkető bőrelváltozásokkal került felvételre, B-tünetek nem voltak. A staging vizsgálatok pathológiás nyirokcsomókat jeleztek a kismedencében is, de leukaemiás vérkép illetve csontvelő érintettség nem volt kimutatható. Axilláris nyirokcsomó (nycs) biopsiából kevert sejtes Hodgkin-lymphoma (cHL-MC) diagnózis született. ABVD protokolt kezdték, de 2 ciklus után – a gyenge válasz miatt – ezt BEA-COPP kezelésre változtatták. A kezelés végére a generalizált lymphadenomegalia perzisztált, sőt folyamatosan fokozódott, ezért rebiopsia (nycs és bőr) történt. Ezek valamint az első biopsia, konzultációra, a PTE, Pathológiai Intézetébe kerültek, ahol a '3.4.b. Eredmények' fejezetben leírt diagnózis született. Ezután CHOP, majd CHOPE és DHAP kezelést alkalmaztak, de a tumor nem reagált, súlyos B-tünetek, tumorozus nyirokcsomó és bőrelváltozások, kachexia alakult ki és a beteg 15 hónappal az első biopsia után exitált.

2.4.a.2. 2.sz.beteg. Az 50 éves, súlyos B-tünetek és generalizált lymphadenomegalia miatt felvett férfitbeteg anamnézisében gyógyult sigma carcinoma és – Crohn betegség miatt – 6 éves steroid és Imuran kezelés szerepelt. Nyirokcsomóbiopsiából a '3.4.b. Eredmények' fejezetben leírt pathológiai diagnosis született. CHOP protokoll csak részleges remissiót eredményezett, a reziduális tumorra radiotherapiát kapott a beteg, de más régiókban recidiva alakult ki. A második vonalú proMACE/MOPP kezelés eredménytelen maradt, a súlyos B-tünetek perzisztáltak, rekurrens infekciók, neutropenia, csontvelő aplasia következtében, a kemorezisztens lymphoma miatt, 13 hónappal a betegség kezdete után a beteg exitált.

2.4.a.3. 3.sz. beteg. A 76 éves nőbeteg rectalis vérzés miatt került felvételre, a gastro- és colonoscopia negatív volt, de az UH vizsgálat kiterjedt abdominális lymphadenomegaliát észlelt. A '3.4.b. Eredmények' fejezetben leírt pathomorphológiai diagnózis született az exploratív laparotomia során eltávolított nyirokcsomóból. CNOP kezelést kezdték, de néhány napon belül methycillin rezisztens Sta. aureus sepsis, granulocytopenia alakult ki és a beteg exitált.

2.4.a.4. A véletlenszerűen észlelt, EBV+ B-sejteket tartalmazó T-sejtes lymphomás három beteg vizsgálata után szisztematikus, retrospektív vizsgálatot folytattunk a PTE, Pathológiai Intézetben diagnosztizált és archivált 365 T-sejtes lymphoma valamint 20 reaktív,

emlőtumor kapcsán történt axilláris blokk disszekcióból származó nyirokcsomó formol-paraffinos anyagain.

2.4.b. Hisztológia és immunhisztológia

A szövetdarabok PBS-sel pufferolt 4%-os formaldehidben (pH 7.2) kerültek fixálásra 24 óráig, majd standard technika szerint paraplast beágyazás történt. 4 µm-es metszeteket HE-ra, metilált Giemsa-ra, PAS-ra festettünk. Az immunhistologia szilanizált lemezekre felhúzott 4 µm-es metszeteken történt. CD3, CD4, CD5, CD20, OCT2 (Novocastra Laboratories Ltd.;Newcastle, UK), CD8, CD15, CD21, CD30, CD45, UCHL-1, CD79a, CD138, ALK-1, granzyme-B, BCL-6, EBV latens membrán protein-1 (LMP-1), Epstein-Barr nucleáris antigén-2 (EBNA-2), kappa és lambda könnyűláncok (DakoCytomation; Glostrup, Denmark), T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) (Immunotech;Marseille, France) OBF.1/BOB.1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.;Santa Cruz, CA, USA) márkereket jelöltünk primer monoklonális antitestekkel. A szövetfeltárást egyedileg állítottuk be. Előhívóként a Vectastain^R Universal Elite ABC vagy az iView Detection Kit-et (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA), a LSAB-2-System-HRP-t vagy az En-Vision előhívórendszert (DakoCytomation) és színreagensként a 3,3'-diaminobenzidin-t (DakoCytomation) vagy a 3-amino-9-etilkarbazol-t (VectorLaboratories Inc., Burlingame, CA, USA) használtuk Ventana NEXES 5.1 (VentanaMedical Systems Inc.) vagy DakoAutostainer (DakoCytomation) automatákban. A mikroszkópos képeket Nikon Eclipse E400 mikroszkópban, Nikon Plan 20x/0.40 vagy 40x/0.65 objektívekkel és Nikon Coolpix 4500 kamerával készítettük. Ha szükséges volt, csak 'all-pixel-all-colour' változtatásokat hajtottunk végre a digitális képeken Adobe Photoshop 5.0 software segítségével.

2.4.c. EBER és human mRNS in situ hibridizáció paraffinos metszeteken

Epstein-Barr vírus kódolt RNS-t (EBER) valamint a human kappa és lambda mRNS-t Epstein-Barr vírus próba (Novocastra Laboratories Ltd.) és Kappa/Lambda (mRNA) PNA Probes (DakoCytomation) felhasználásával detektáltuk a gyártók előírásait követve. A proteináz K előemésztést azonban mikrohullámú előkezelésre – feltárássra (3 x 5 perc, 900 W, pH 6.0-os citrát pufferben) változtattuk. A hibridizációs terméket az EBER esetében Amplification kit-tel (Novocastra Laboratories Ltd.), míg a könnyűlánc mRNS-ek esetében PNA ISH Detection Kit-tel (DakoCytomation) hívtuk elő, mindkét esetben Fast Red TR Salt-ot (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) használtunk kromogénként.

2.4.d. Szuszpenzióban, paraffinos blokkból izolált magokon elvégzett EBER-FISH

A magokat 50 µm vastag paraffinos metszetekből izoláltuk annak érdekében, hogy az u.n. trunkációs effektust minimálisra csökkentsük. A deparaffinálás és rehidráció után a metszeteket 5 percig mikrohullámú kezelésnek vetettük alá (900 W, citrát puffer, pH 6.0), melyet 0.5%-os pepsin (Sigma-Aldrich Corp.) emésztés (pH 2.0, 30-40 perc, 37°C) követett. A mintákat ezt követően 50 µm pórusnagyságú nylon szűrőn átszűrtük, centrifugáltuk majd ismét mikrohullámú kezelésnek tettük ki (4 x 5 perc, 900 W, citrát puffer, pH 6.0). Az izolált magokat 50 %-os, majd 70 %-os etanolban mostuk, lecentrifugáltuk és a folyadék feleslegét teljesen eltávolítottuk. Eppendorf csövekben 10^7 magot hibridizáltunk 30 µl FITC-cel konjugált EBV próbával 37°C-on, éjszakán át, állandó agitálás (enyhe rázás) mellett. A hibridizáció után a mintákat 3 x 5 percig mostuk TRIS/0.05 % Tween-20 pufferben. Kettős amplifikációt alkalmaztunk (mindegyik 30 perc, 37°C): 1. anti-FITC-peroxidase (1:500, Vector Laboratories Inc.), 2. tyramin-FITC (1:3000, Dr Szuhai Károlytól, Leiden University, Department of Molecular Cell Biology, Leiden, The Netherlands). Az amplifikálási lépések között és után a sejteket 3x5 percig mostuk TRIS/0.05% Tween-20 pufferben, majd reszuszpendáltuk 500 µl PBS-ben és flow citometriás méréseket végeztünk rajta. Az EBER-FISH eljárással jelölt nukleáris magsuszpenzióról készült digitális képeket Zeiss Axioskop epi-illuminációs fluoreszcens mikroszkóp, Achroplan 40x/0.65 objektív, HV-C20 Hitachi 3 CCD kamera és ImanMot 1.2 image acquisition software felhasználásával nyertük. A képeket digitálisan nem módosítottuk.

2.4.e. EBER-FISH pozitív paraffinos magok flow citometriás szortírozása

Az EBER pozitív magokat a szuszpenzióban végrehajtott EBER-FISH reakciót követően FACSort flow citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szortíroztuk ki. Reaktív nyirokcsomó paraffinos anyagából izolált, EBER-FISH reakcióval kezelt magsuszpenzió szolgált negatív kontrolként. A szortírozó kaput az EBER negatív magok FITC fluoreszcens intenzitásának megfelelően állítottuk be.

2.4.f. Teljes genom amplifikáció paraffinos magokból extrahált DNS-en

A szortírozott paraffinos magokból standard fenol-kloroform módszerrel izoláltuk a DNS-t. Az így nyert DNS-t – a többirányú feldolgozás miatti nagyobb DNS mennyiség igény miatt – teljes genom amplifikációnak vetettük alá. Ehhez az ‘improved primer extension preamplification’ (I-PEP) PCR módszert **(1)** használtuk néhány változtatással, melyek a következők: i. a DNS-t fenol-kloroform módszerrel izoláltuk, ii. 1.5 U genomikus RedTaq

DNS polimerázt (Sigma-Aldrich Corp.) alkalmaztunk, iii. az I-PEP-PCR elegy teljes mennyisége 10 µl volt.

2. Ha a formol-paraffinos anyagokon további speciális molekuláris vizsgálatokat nem, csak antigén receptor génátrendeződés PCR tesztet végeztünk, akkor 1-2, 10 µm-es metszetekből durva DNS lizátumot készítettünk. A metszeteket deparaffináltuk, a maradék szövet pelletet 100-200 µl emésztő pufferben (10mM Tris-HCl / pH: 8.3/, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Triton X-100, 0.45% Tween-20), 200 µg/ml proteináz K (Sigma-Aldrich Corp.) tartalom mellett, 56°C-on, éjszakán át emésztettük. Emésztést követően a proteináz K-t 95°C-on, 10 percig inaktívtuk. Az emésztett szövetmaradványt kicentrifugáltuk és a szupernatánt használtuk fel a PCR amplifikációhoz.

2.4.g. T-sejt receptor gamma (TCR-γ) génátrendeződés PCR vizsgálat

3.A monoklonális TCR-γ génátrendeződést a korábban leírt V és J primereket felhasználó multiplex PCR-rel azonosítottuk (2). A PCR elegy a következőket tartalmazta: 200 µM mindegyik dNTP-ből (Invitrogen, San Diego, CA, U.S.A), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol mindegyik primerből, 1,25 U Taq DNS polimeráz (Sigma-Aldrich). A PCR amplifikáció a következő volt: pre-denaturáció 94°C, 5 perc, 40 ciklus a 40 msp 94°C, 60 msp 61°C, 60 msp 72°C körből, végső elongáció 72°C 5 perc thermocyclerben (MiniCycler, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA). A PCR terméket 10%-os poliakrilamid és/vagy 2%-os agaróz gélben frakcionáltuk és 0,5 µg/ml ethidium-bromiddal festettük.

2.4.h. IgH génátrendeződés és szekvencia analízis-II

Az alkalmazott eljárás mindenben megegyezett a 2.3.2.c.4. pont alatt leírtakkal. Ugyanazt a módszert használtuk a paraffinos metszetekből származó durva lizátum valamint az EBER+ szortírozott magok I-PEP-PCR termékének feldolgozásához.

2.4.i. Szomatikus hipermutáció analízis

Az 1.sz és a 3.sz beteg nyirokcsomóiból flow szortírozott, EBER+ sejtmagokból izolált DNS valamint a 3. sz. beteg nyirokcsomójának formol-paraffinos anyagából izolált DNS képezte ezen vizsgálat tárgyát. Az alkalmazott eljárás mindenben megegyezett a 2.3.2.c.5. pont alatt leírtakkal azzal a különbséggel, hogy jelen tanulmányban mintánként 20 szubklónt szekvenáltunk annak érdekében, hogy az 'on-going' szomatikus hipermutáció is vizsgálható legyen.

3. KLONÁLIS HETEROGENITÁS ÉS EVOLÚCIÓ HAEMATOLOGIAI NEOPLASIÁKBAN

3.1. A hiperdiploid gyermekkori pre-B acut lymphoblastos leukaemia szubklonális architektúrája

3.1.a Bevezetés

Az 1970-es évekre a gyermekkori hiperdiploid pre-B-sejtes acut lymphoblastos leukaemia (pre-B-pALL) , míg az 1980-as évekre a magas hiperdiploid (HeH) pre-B-pALL kategória is ismertté vált a konvencionális citogenetikai analízis (CCA) és a DNS citometriai vizsgálatok nyomán **(1-10)**. Később, a kezelési válaszok alapján, a 47-50 modális számmal (MN) jellemzett alacsony hiperdiploid (LeH) valamint az MN 51-67 csoportot képező HeH pre-B-pALL-t is elkülönítették **(11-13)**. A HeH státuszt megkísérelték tovább stratifikálni. Azokat a pre-B-pALL betegségeket, melyekben a DNS index (DI) > 1.16 , az MN 56 – 67 volt, vagy tripla triszómia (TT; +4, +10, +17), dupla triszómia (DT; +4, +10) illetve egyszeres kromoszóma 18 triszómia (+18) fordult elő, szignifikánsan jobb prognózisuknak véleményezték, de nem alakult ki ezen stratifikációkat illetően nemzetközi konszenzus **(14-17)**. Legújabban az MN ≥ 58 citogenetikai kategóriát képviselő pre-B-pALL-t értékelték a bármilyen egyéb citogenetikai csoportnál jobb prognózisúnak, továbbá a vizsgálatok azt mutatták, hogy a magas MN és a TT valójában ugyanazon, különösen jó lefolyású betegcsoportot azonosítja **(18, 19)**. Ezen adatok egybehangzóan arra utalnak, hogy a numerikus abberációknak ezen betegség patomechanizmusában és prognózisában is meghatározó szerepük van, de ezek számos részlete még nem ismert.

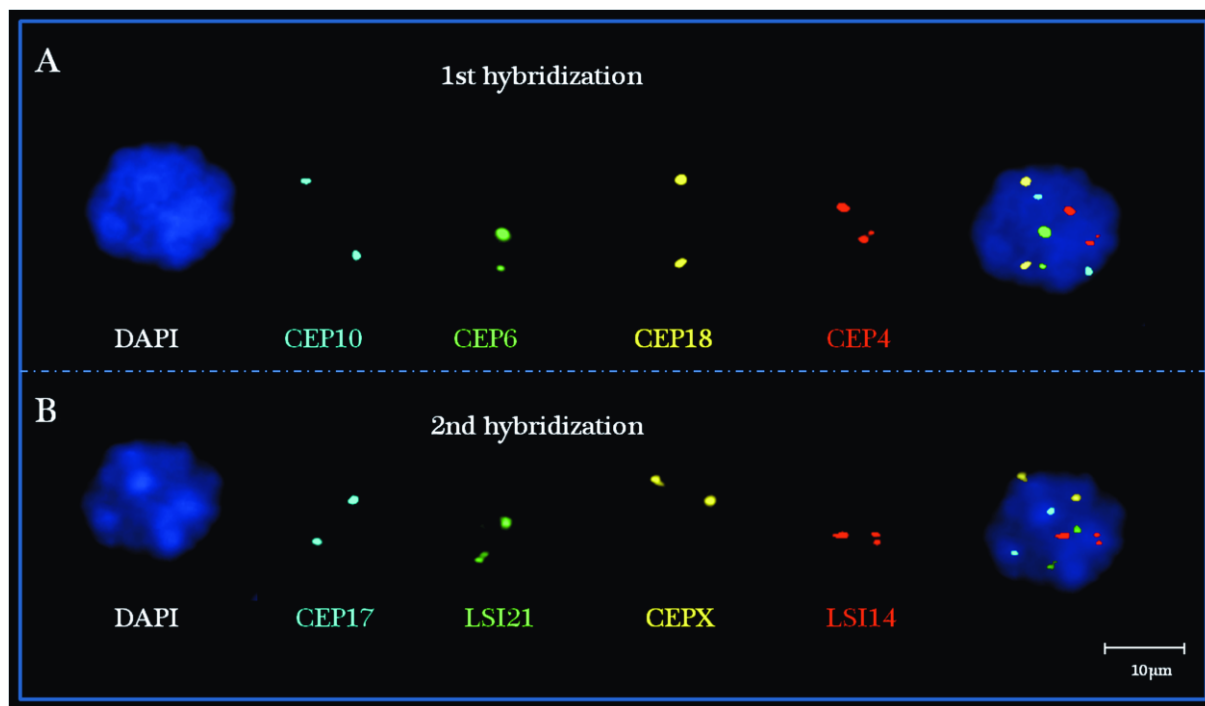
A nem random kromoszóma nyerések patogenetikai következményei nagyrészt nem értettek **(20)**. A kromoszóma nyerések patomechanizmusa is kevésbé ismert, legalábbis az adatok ellentmondásosak. A négy potenciális, teoretikus patomechanizmus útvonal (Route /R/1 - kezdeti közel-haploid genom állapot után kromoszóma duplikáció; R2 – kezdeti genom tetraploidizációt követő kromoszóma vesztések; R3 – egymást követő sejtoszlások során az egyes kromoszómák szekvenciális nyerése; R4 a kromoszómák egyidejű nyerése egyetlen kóros mitosis folyamán) között nem lehetett egyértelműen egyet meghatározni, viszont a prekursor lézió *in utero* kialakulása is felmerült **(21-25)**. Azonban az jól ismert – legalábbis az MN 51 – 54 garnitúrával jellemzett HeH pre-B-pALL-ben -, hogy a 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 és X kromoszómák érintettek leggyakrabban, a 21-es kromoszóma csaknem 100 %-os incidenciája és gyakori tetraszómiája mellett **(11, 12)**. Összességében azonban elmondható, hogy a HeH pre-B-pALL kialakulását illetően a Route 4 patomechanizmus útvonal és a

kromoszóma instabilitás (CIN) patogenetikai szerepének hiánya preferált ma a nemzetközi irodalomban (11, 13).

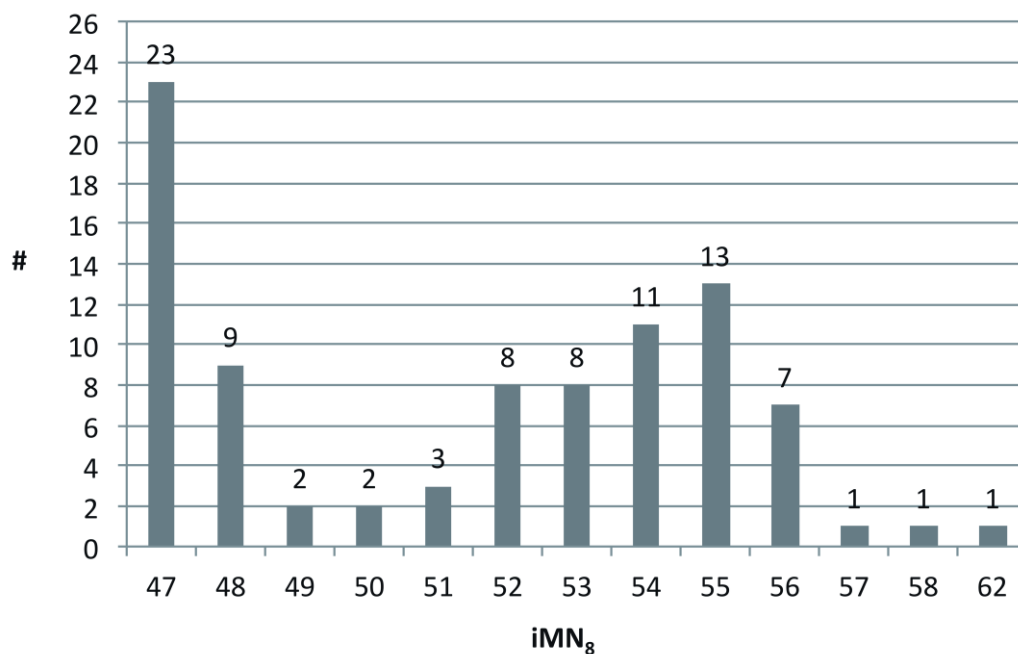
Jelen munkában a 8 leggyakrabban involvált kromoszóma kópia szám (CNA) változásait követtük 89 kezeletlen HeL és HeH pre-B-pALL gyermek csontvelői blasztjaiban úgy, hogy 2 x 4 színű multiplex interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációs eljárást (MiFISH) valamint automatizált, szkennelő mikroszkóp állomást használtunk a vizsgálatok során. A 8-paraméteres korrerált genetikai adatgyűjtés lehetővé tette, hogy analizáljuk a kromoszóma nyerések hierarchiáját, a CIN fennálltát, a klonális heterogenitást és evolúciót. Ezek alapján konklúziókat tudtunk levonni a kromoszóma nyerések patomechanizmusát illetően.

3.1.b. Eredmények

Kétfajta szubklónt azonosítottunk minden leukaemiás mintában, mindkét esetben a 2 x 4 iFISH vizsgálat alapján (3.1.1. ábra). i./ a kromoszóma szám szerinti szubklónok sejtjei ugyanannyi total kromoszóma nyerést mutattak (a nyert kromoszómák összetételétől függetlenül); ii./ az egyedi szubklónok a 8 kromoszóma szerint ugyanazon numerikus konstellációt képviselték. Egyfajta total kromoszóma szám szerinti szubklónt több, mint egyfajta egyedi szubklón építhet így fel. Először a szubklónok számát a total kromoszóma nyerés alapján, betegenként vizsgáltuk. Így minden leukaemia mintában a kromoszóma szám szerinti szubklónok gyakoriságának eloszlását nyertük valamint megállapítottuk a modális számot (MN), melyet a leggyakoribb szubklón total kromoszóma száma alapján definiáltunk. Mivel ebben a tanulmányban 8 kromoszómát vizsgáltunk, az iMN_8 jelölést (8 kromoszómára interfázisban FISH-sel nyert MN) alkalmaztuk, hogy ezt a paramétert elkülönítsük a metafázis vizsgálatok során meghatározható konvencionális MN-től. Ezen parameter alapján a 214 leukaemiás mintából 89 (41.6 %) bizonyult hyperdiploidnak (HD, $iMN_8 \geq 47$), melyek rekurrens genetikai aberrációt nem mutattak (l. 2.1.a.). Ezek között 36 (a HD csoport 40,4 %-a, az összes eset 16.8 %-a) bizonyult HeL-nek (iMN_8 47 – 50), míg 53 (a HD csoport 59.6%-a és a teljes beteganyag 24.8%-a) HeH (iMN_8 51 – 67; anyagunkban a legmagasabb érték 62 volt) besorolást nyert. Az iMN_8 értékek bimodális eloszlást mutattak, a csúcserték a HeL csoportban 47-nek, a HeH csoportban 55-nek felelt meg (3.1.2. ábra).



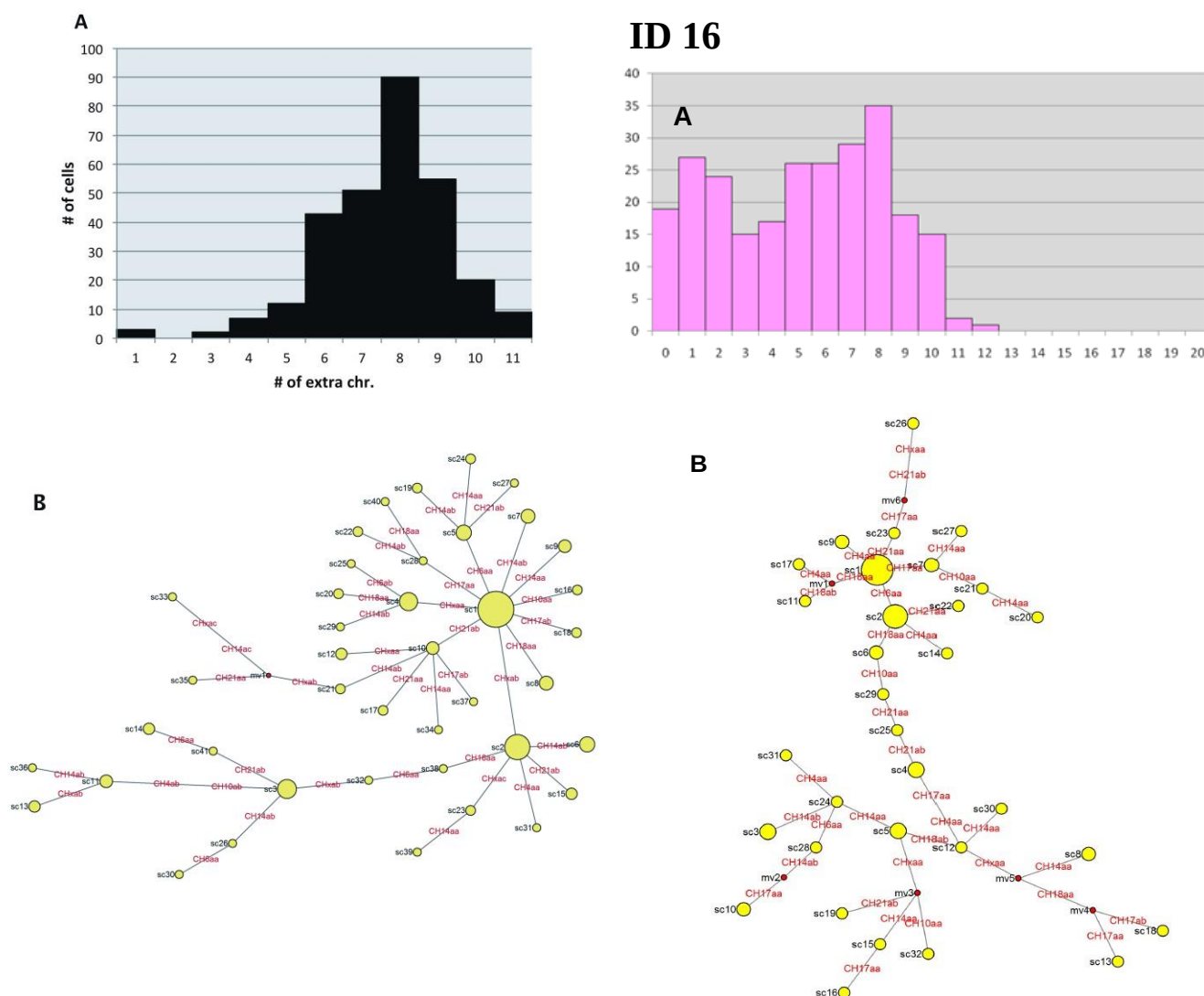
3.1.1. ábra A target sejt egymást követő, 2 x 4 iFISH jelölése. A az első próbaszet (CEP szet) – CEP4 (vörös), CEP6 (zöld), CEP10 (aqua), CEP18 (arany); B ugyanazon target rehibridizációja a 2. próbaszettel (LSI & CEP szet) – LSI14 (vörös), LSI21 (zöld), CEP17 (aqua), CEPX (arany). Negatív kontrol mag,,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



3.1.2. ábra Az iMN8 értékek gyakoriság megoszlása a 89 HD leukaemiában. A csúcs halmozódás HeL-ben 47-nél, HeH-ban 55-nél volt, míg iMN8 49 – 50 iMN8 értékek között hiatus látható.

A sejtek total nyert kromoszóma száma alapján, átlagosan, 6.9 illetve 10.2 szubklónt azonosítottunk a HeL illetve a HeH csoportban. A domináns szubklónok átlagosan a tumorsejtek 49 %-át illetve 34 %-át alkották ebben a két csoportban (3.1.1. táblázat). A leukaemiás mintákban a kromoszóma szám szerinti szubklónok gyakorisági eloszlása három mintázatot mutatott: 1) Gauss-i típusú (harang alakú/, vagy szűk, vagy széles alapú, 2) más esetekben a HeL és a HeH status között a szubklónok eloszlása közel azonos gyakoriságot mutatott, széles tartományban, 3) szignifikáns arányban egyértelmű, vagy HeL vagy HeH túlsúlyú, bimodális eloszlás volt megfigyelhető (3.1.3.a. és 3.1.4.a ábrák). Az iMN₈, az egyedi szubklónok összetétele és gyakorisága valamint a kromoszómák modális száma (modus) között specifikus összefüggést tártunk fel és mutattunk be (26, és ennek a Supplemental Appendix III dokumentuma). Ezek során semmilyen indirekt jelet közel tetraploid vagy közel haploid leukaemiára nem találtunk. A HeH leukaemia kollekció 4 relapszus leukaemiát is tartalmazott. Mindegyik relapszus esetén ugyanazon fenotípust észleltük, de egyik esetben sem egyezett meg a relabáló leukaemia iMN₈ értéke az eredeti leukaemia ugyanezen paraméterével. Ehelyett a következőket észleltük a relabáló pároknál (ID = beteg azonosító szám): ID1 és 2, iMN₈ 56 vs. 54; ID5 és 6, iMN₈ 53 vs. 54; ID7 és 8, iMN₈ 54 vs. 52; ID9 és 10, iMN₈ 55 vs. 57.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy specifikus kromoszómák / kromoszóma csoportok specifikus iMN₈ értékhez rendelhetők, az egyes kromoszómák nyerésének gyakoriság eloszlását határoztuk meg iMN₈ függvényében. A HeH csoportban, különösképpen iMN₈ 51-54 esetén, az egyedi kromoszómák – az egyforma iMN₈ értékkel bíró leukaemiákban is – az aneuszómia széles tartományát (0 – 10 %-tól 80 – 100%-ig) mutatták, különösen a kromoszóma 4, 6, 10, 14, 17 és – kisebb mértékben – a kromoszóma 18. Ez a 21-es és az X kromoszómák esetén nem volt megfigyelhető (3.1.2. táblázat). A HeL csoportban a target kromoszómák ugyancsak változatos nyerési arányokat mutattak, de kisebb mértékben.

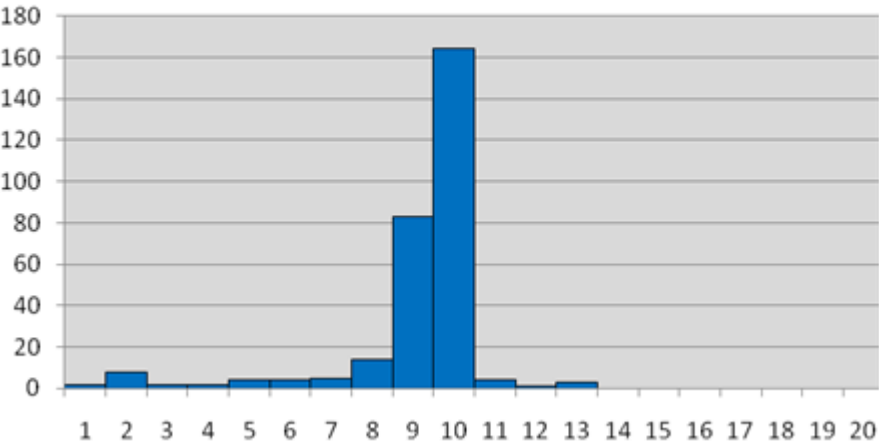


3.1.3. ábra. ID17 beteg adatai. A a total kromoszóma szám szerinti szubklónok gyakoriság megoszlása. B a leukaemiás populációban az egysejtes reprezentánsok kizárása utáni egyedi szubklónok alapján nyert Steiner-fa. A sárga körök az egyedi szubklónokat (sc1, sc2, etc.) reprezentálják, a körök átmérője arányos a szubklónt alkotó sejtek számával. A szubklónokat összekötő vonalakon a változást mutató kromoszóma és a kópia szám változásának jelölése látható: aa diszómiából triszómiába, ab triszómiából tetraszómiába, etc., történő átmenetet jelöli. A vörös pöttyök median vektorokat jelölnek, melyek vagy nem megtaláltak vagy nem létező klónokat képviselnek.

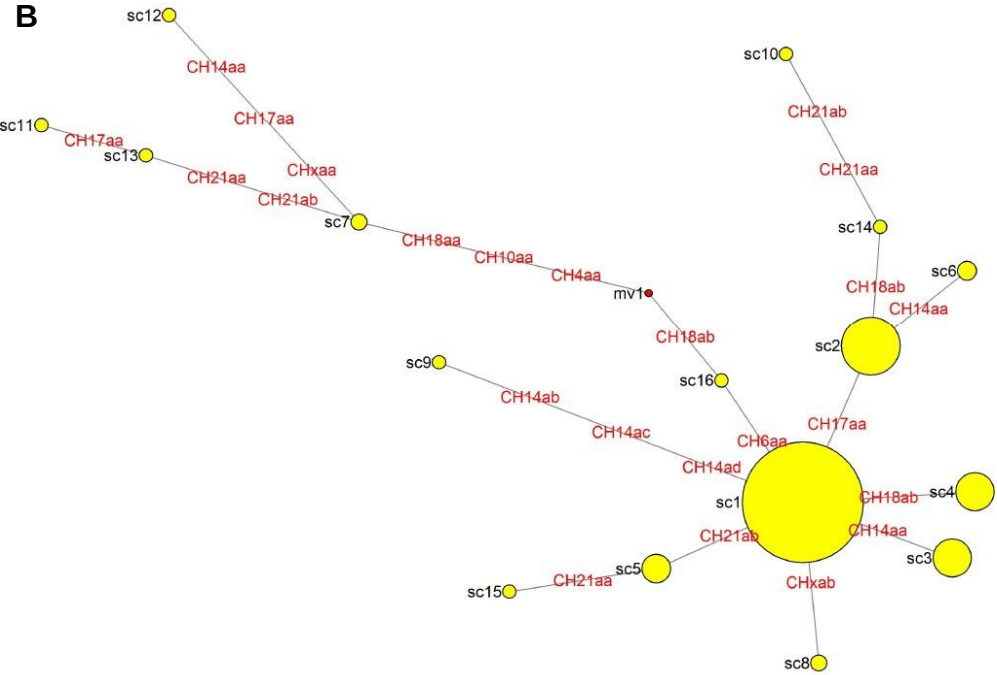
3.1.4. ábra ID16, 18, 34, 58 betegek adatai. A kromoszóma nyerések szerinti szubklónok gyakoriság eloszlása. A szinkódok random (rózsaszín), szűk harangalakú - (kék) és bimodális (zöld) eloszlást mutatnak. B A legalább két reprezentánst mutató egyedi szubklónok alapján nyert Steiner-fa. Szimbólumok leírása, l. 3.1.3. sz. ábra..

ID 18

A

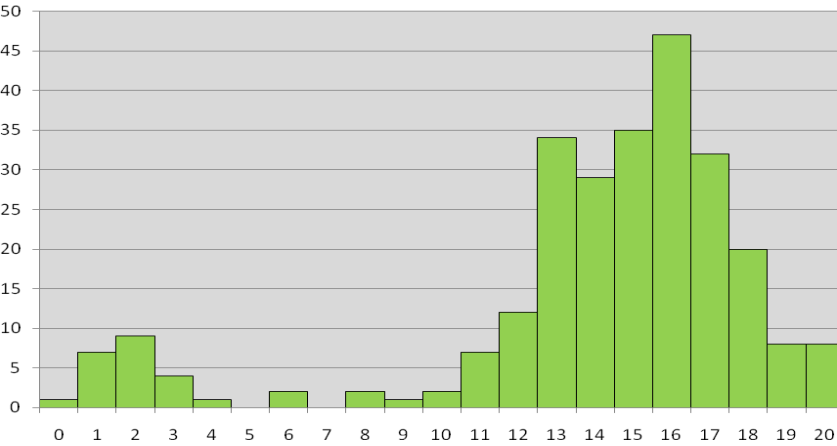


B

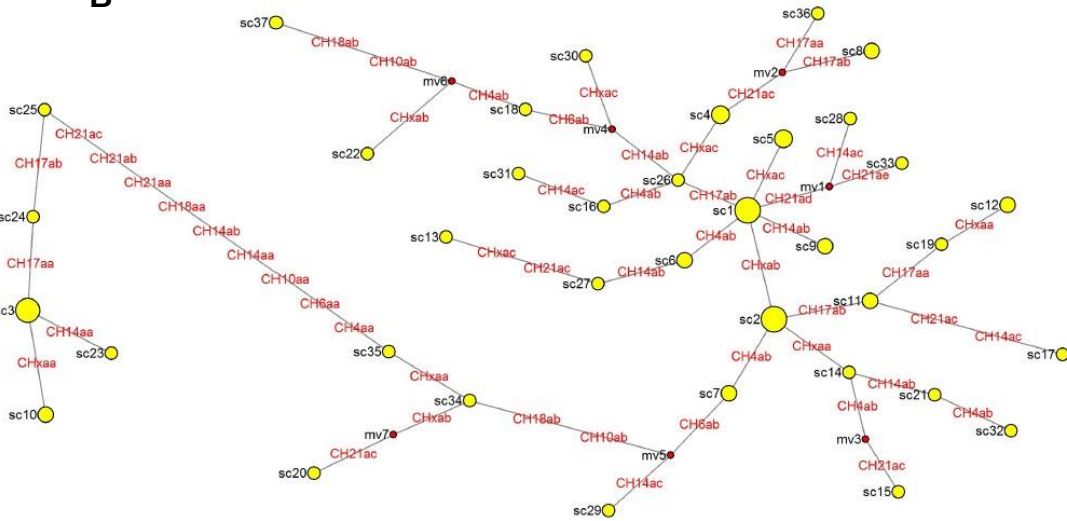


ID 34

A



B



3.1.1. táblázat. A kromoszóma szám szerinti sejtarány a domináns szubklónokban valamint az összes többi szubklónban az iMN₈ értékek szerint a HeL valamint a HeH kategóriákban

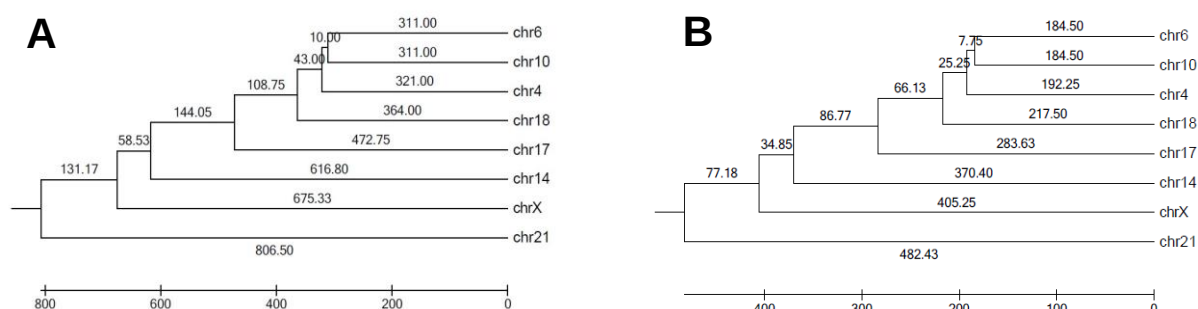
iMN ₈	ID	domináns sejtarány	többi sejt aránya	szubklónok száma
47	11	0.29	0.71	7
47	13	0.18	0.82	13
47	19	0.18	0.82	12
47	21	0.57	0.43	5
47	29	0.15	0.85	12
47	37	0.33	0.67	13
47	51	0.18	0.82	10
47	62	0.35	0.65	7
47	65	0.31	0.69	13
47	68	0.62	0.38	5
47	92	0.43	0.57	12
47	129	0.37	0.63	4
47	141	0.89	0.11	3
47	148	0.89	0.11	2
47	150	0.89	0.11	1
47	151	0.74	0.26	3
47	156	0.96	0.04	4
47	159	0.74	0.26	3
47	165	0.98	0.02	1
47	185	0.14	0.86	12
47	195	0.92	0.08	3
47	201	0.64	0.36	3
47	230	0.40	0.60	4
48	30	0.24	0.76	11
48	58	0.16	0.84	18
48	70	0.37	0.63	7
48	76	0.55	0.45	4
48	93	0.55	0.45	5
48	168	0.33	0.67	7
48	186	0.15	0.85	10
48	191	0.88	0.12	4
48	231	0.25	0.75	5
49	61	0.31	0.69	10
49	163	0.84	0.16	3
50	128	0.52	0.48	5
50	204	0.29	0.71	6
	Mean:	0.49	0.51	6.9

dc 1046-15

iMN ₈	ID	domináns sejtarány	többi sejt aránya	szubklónok aránya
51	24	0.28	0.72	9
51	67	0.37	0.63	7
51	200	0.19	0.81	10
52	4	0.25	0.75	10
52	8	0.27	0.73	13
52	20	0.38	0.62	7
52	33	0.35	0.65	7
52	35	0.51	0.49	7
52	36	0.19	0.81	8
52	71	0.71	0.29	6
52	193	0.71	0.29	6
53	5	0.31	0.69	10
53	15	0.60	0.40	13
53	31	0.40	0.60	8
53	56	0.16	0.84	10
53	57	0.23	0.77	12
53	60	0.16	0.84	12
53	66	0.20	0.80	10
53	170	0.53	0.47	4
54	2	0.30	0.70	10
54	6	0.28	0.72	12
54	7	0.24	0.76	13
54	16	0.13	0.87	12
54	17	0.30	0.70	10
54	22	0.36	0.64	10
54	40	0.35	0.65	10
54	43	0.17	0.83	13
54	49	0.36	0.65	9
54	54	0.25	0.75	12
54	55	0.67	0.33	7
55	9	0.27	0.73	13
55	12	0.29	0.71	9
55	23	0.38	0.62	9
55	38	0.30	0.70	10
55	39	0.22	0.78	13
55	45	0.50	0.50	11
55	46	0.36	0.64	10
55	47	0.68	0.32	8
55	48	0.49	0.51	8
55	50	0.42	0.58	9
55	52	0.56	0.44	9
55	53	0.20	0.80	13
55	63	0.17	0.83	12
56	1	0.41	0.59	9

iMN ₈	ID	domináns sejtarány	többi sejt aránya	szubklónok aránya
56	18	0.56	0.44	13
56	26	0.39	0.61	7
56	42	0.31	0.69	11
56	44	0.26	0.74	11
56	64	0.31	0.69	10
56	135	0.19	0.81	12
57	10	0.22	0.78	10
58	41	0.18	0.82	17
62	34	0.18	0.82	18
	Mean:	0.34	0.66	10.2

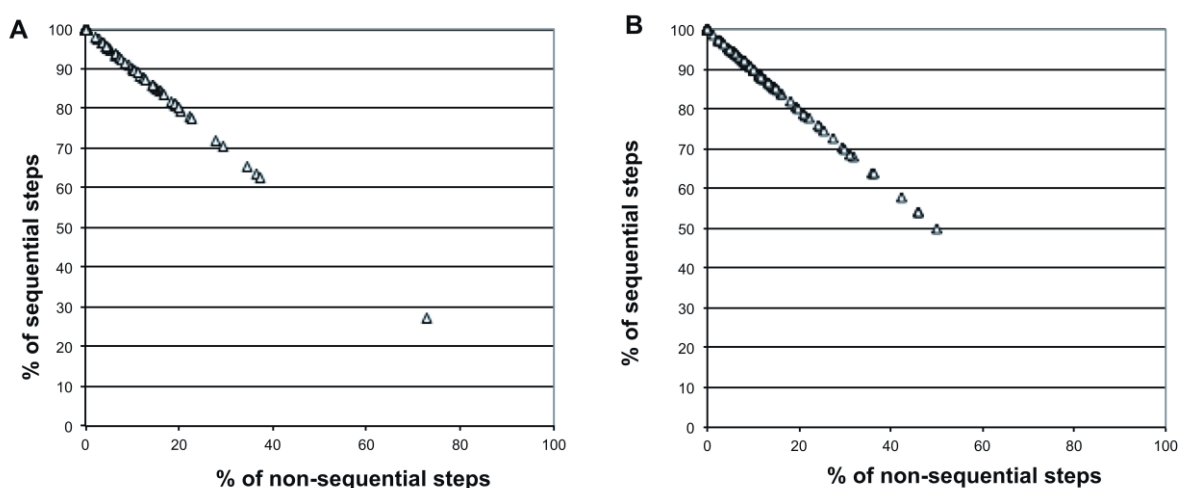
Megállapítandó, hogy az egyes leukaemiákban a kromoszómák nyerése mutat-e specifikus sorrendet, csoportanalízist végeztünk az egyedi szubklónok alapján. A kromoszóma nyerések csoportjai az egyes leukaemiák között divergenciát mutattak, de a 'csoport-fa' alapját mindig a 21- és / vagy az X kromoszómák képezték. A HD és a HeH betegek összesített csoportanalízise minden szoftver algoritmussal (MEGA 5 - NJ, UPGMA és ME) nagyon konzisztens mintázatot mutatott. A 21-X-14 kromoszóma csoport alkotta a 'csoport-fa' alapját, a 10-es és 18-as kromoszómák, majd a 4-es és 6-os kromoszómák egy – egy rákövetkező csoportot képeztek, míg a 17-es kromoszóma nem tartozott konzisztensen az utóbbi két csoportból valamelyikhez. A két különböző egyedi szubklón adatbázis, azaz az összes egyedi szubklón figyelembe vétele valamint az egysejtes reprezentánsok kizárása, feldolgozása során is egybehangzó eredményeket kaptunk: a 'csoportfa' alapját mindig ugyanaz a 3 kromoszóma képezte és csak minor variabilitás mutatkozott a 'csoportfa' felsőbb – későbbi eseményeket reprezentáló – zónáiban (3.1.5. és 3.1.6. ábrák).



3.1.6. ábra. A kromoszóma nyerések UPGMA csoport analízise a legalább 2 sejtes egyedi klónok alapján az összes HD (A) és a HeH (B) betegekben (euklédesszi távolság)

A 8-paraméteres korrelált adatbázis alapján meghatározott egyedi szubklónokat használtuk fel a 'hálózat – network' analízishez (3.1.3.b. és 3.1.4.b ábrák). A HD leukaemiák iMN₈ paramétere korrelált az egyedi szubklónok számával, az összes szubklón illetve az

egysejtes reprezentánsok nélkül csoportban egyaránt, ($r=0.423$, $p<0.001$; $r=0.395$, $p<0.001$) és – ennek megfelelően – a Steiner-fa hosszával ($r=0.387$, $p<0.001$; $r=0.467$, $p<0.001$). Az egyedi szubklónok száma a HeH csoportban szignifikánsan ($p<0.001$) magasabb volt, mint a HeL csoportban, akkor is, ha minden egyedi szubklónt figyelembe vettünk, vagy az egysejtes reprezentánsokat kizártuk (73.6 /tartomány: 14 – 187/ vs 39.6 /tartomány: 2 – 170/ és 26.7 /tartomány: 4 – 55/ vs 15.3 /tartomány: 2 – 45/). Különböző Steiner-fa asszociált paramétereket számoltunk (3.1.3. táblázat, 3.1.7. ábra). Az egyedi szubklónok aktuális száma a HD, HeL és HeH csoportokban lineárisan korrelált a mutációk számával (azaz a Steiner fa hosszával). Ezentúl, a feltételezett, szimultán mutációk száma ugyancsak lineárisan korrelált a Steiner-fa teljes mutációinak számával. A detektált szubklón szám – 1 / Steiner-fa hossza hányados informal a szekvenciális versus szimultán mutációk (kromoszóma nyerések) gyakoriságáról. Ezen származtatott parameter átlagai nagyon hasonlóak voltak a különböző leukaemia csoportokban, akkor is, ha az egysejtes reprezentánsok kizárásra kerültek (tartomány 0.8 – 0.9).



3.1.7. ábra. A szekvenciális versus szimultán kromoszóma nyerések %-os megoszlása az összes HD leukaemiában a detektált egyedi szubklónok – 1 / Steiner-fa hossz értékek alapján. A az egysejtes egyedi szubklónok kizárásával (átlag: 90.7 %), B az összes egyedi szubklón figyelembe vételével (átlag: 84.8 %).

Ugyancsak vizsgáltuk az egyes kromoszómák instabilitását az iMN₈ szerint HeL és HeH csoportokba tartozó egyes leukaemiákban. Mindegyik kromoszóma esetében, az egyedi szubklónok alapján, a modális kromoszóma szám (M, a leggyakoribb kromoszóma szám érték) került megállapításra és a leukaemia sejtek azon frakciója (F), melyekben az adott kromoszóma száma az M-től eltérő volt, kiszámolásra került. Az átlagos CIN érték, azaz a variáns sejtek aránya, a HeL és a HeH csoportokban 0.13 illetve 0.23 volt (a CIN tartomány 0.01 -0.46 illetve 0.04-0.45 tartományban mozgott, ha mind a 8 kromoszóma értékeit

átlagoltuk betegenként, vagy 0.07 – 0.20-nak illetve 0.16 – 0.30-nak bizonyult, ha a különböző iMN₈ kategóriájú leukaemiákban egy bizonyos kromoszóma átlagait néztük (3.1.4. táblázat).

3.1.c. Megbeszélés

A magas hyperdiploid (HeH, MN 51 – 67) pre-B-pALL a leggyakoribb pre-B-pALL szubtipus entitás a kaukázusi fehér rasszban (**11, 12, 13, 27**). A klinikai, citogenetikai és genetikai vizsgálatok széles köre és hosszú története ellenére nem alakult ki konszenzus ezen entitás további klinikai stratifikációját, a prognosztikus kromoszóma szett nyerését illetve az aneuploidia patomechanizmusát illetően (**14-18, 20**). Jelen tanulmány azt tűzte ki célul, hogy a HD pre-B-pALL-ben a kromoszóma nyerések mechanizmusát és evolúcióját jobban megvilágítsa. Ennek érdekében a 214 kezeletlen pre-B-pALL beteg csontvelői blasztjainak vizsgálatával 8-paraméteres genetikai adatbázist hoztunk létre. Ezt egy újonnan kifejlesztett, relokalizációt alkalmazó 2 x 4 iFISH eljárással 8 kromoszóma numerikus aberrációi vonatkozásában nyertük, melynek során olyan valódi, korrelált adatbázis jött létre, melyet a sejtoszlási preferenciák nem torzítottak. iFISH vizsgálatok során az álpozitivitás határérték (vágási pont) meghatározása kritikus (**28**). A leggyakoribb eljárás a reaktív, diploid sejtekben a fals kromoszóma veszteség / fals nyereség meghatározása. Azonban fals nyereség egy diploid sejten biztosan nem olyan valószínűséggel következik be, mint a fals vesztesége ugyanazon kromoszómának egy tetraploid / tetraszómiás sejten, miközben mindkettő 3 szignált (trisómia jelleg) eredményez. Ennek és más okoknak köszönhetően kombinált próbák használata esetén, melyek valószínűsíthetően több, mint 2 kópiában fordulnak elő, a vágási pontok meghatározása nagyon nehéz, ha egyáltalán lehetséges. Először, a kontrol sejteket pontosan ugyanolyan hibridizációs procedúrának kell alávetni, mint a leukaemiás sejteket. Másodszor, a sejtvonalak heterogének és instabilak, ezért a különböző citotípusok csak egy kis frakciója felelhet meg olyan kontrolnak, melyet egy multiparaméteres iFISH vizsgálat igényelne (pl., MHH-CALL-2 vagy NALM-16 sejtvonalak a DSMZ kollekción /DSMZ GmbH, Braunschweig, Németország/).

Ebben a tanulmányban a vágási pontok reaktív, diploid sejteken nyert eredmények és a Poisson eloszlás alapján lettek meghatározva, melynek során a fals nyerések / veszteségek arányát bemutattuk. A tri- és tetraszómia meghatározás átlagos standard deviációját is megadtuk, de ezek kombinált aneuszómiák esetén nem alkalmazhatók vágási pontokként.

3.1.2. táblázat A kromoszóma nyerések gyakorisága iMN₈ szerint, a HeL és HeH leukaemiákban

jó iMN ₈	ID	Chr4 %	Chr6 %	Chr10 %	Chr 14 %	Chr17 %	Chr18 %	Chr21 %	ChrX %
47	11	13	53	2	40	1	3	5	64
47	13	15	15	14	34	9	16	16	16
47	19	22	20	15	9	6	17	18	10
47	21	44	1	1	5	1	7	1	41
47	29	39	42	39	23	30	41	45	68
47	37	7	14	2	63	1	3	9	16
47	51	56	46	48	26	16	47	45	61
47	62	24	16	2	21	0	4	1	3
47	65	12	27	2	10	10	6	17	47
47	68	9	4	0	1	0	0	1	95
47	92	2	4	1	54	0	3	18	3
47	129	0	0	0	16	2	0	3	57
47	141	0	0	0	0	0	0	89	1
47	148	90	0	0	0	0	0	1	0
47	150	0	0	0	0	0	0	89	0
47	151	2	8	1	5	1	1	83	2
47	156	0	1	1	0	1	1	98	0
47	159	0	2	0	0	0	3	15	1
47	165	0	0	0	99	0	0	1	0
47	185	9	9	6	42	16	17	44	23
47	195	3	1	1	0	0	1	1	1
47	201	3	4	1	8	5	1	2	81
47	230	0	0	0	3	5	0	89	1
48	30	59	39	3	7	4	18	15	31
48	58	45	49	43	77	19	34	44	70
48	70	7	4	9	0	0	6	87	75
48	76	4	2	1	5	0	1	98	63
48	93	0	1	0	11	24	0	86	98
48	168	13	41	14	15	9	0	94	84
48	186	16	19	13	9	2	26	52	12
48	191	0	2	1	0	0	0	97	93
48	231	0	3	0	2	0	1	66	0
49	61	3	4	2	59	1	1	14	100
49	163	0	0	0	5	0	0	100	0
50	128	0	0	0	97	0	1	3	99
50	204	0	22	3	50	30	14	69	100
51	24	82	70	56	16	0	57	86	60
51	67	0	2	7	77	0	71	91	80
51	200	48	23	13	59	4	25	66	70
52	4	75	70	70	70	1	68	66	62
52	8	24	73	79	63	3	77	82	92
52	20	94	93	0	50	96	0	86	96
52	33	95	89	0	20	69	0	90	71
52	35	3	79	1	94	92	72	88	99
52	36	0	53	0	62	43	52	64	55
52	71	0	0	88	86	0	87	93	91
52	193	99	84	0	96	0	2	96	99

jóíMN ₈	ID	Chr4 %	Chr6 %	Chr10 %	Chr 14 %	Chr17 %	Chr18 %	Chr21 %	ChrX %
53	5	0	83	92	69	70	87	88	29
53	15	3	98	5	4	1	87	99	97
53	31	91	86	0	92	64	75	89	96
53	56	57	65	54	47	31	47	54	48
53	57	54	88	60	48	44	56	69	82
53	60	49	46	42	67	1	45	49	57
53	66	85	83	74	46	49	79	80	83
53	170	100	1	99	98	1	92	98	100
54	2	92	85	89	65	1	95	95	85
54	6	12	78	78	56	43	89	92	92
54	7	26	59	59	81	1	63	79	96
54	16	51	61	61	36	44	61	66	31
54	17	8	72	6	98	5	71	94	99
54	22	92	93	90	12	75	93	89	87
54	40	91	92	0	83	84	82	97	67
54	43	76	74	74	45	13	77	90	44
54	49	3	80	81	93	77	80	92	100
54	54	81	75	70	81	77	74	93	2
54	55	92	90	92	98	0	86	96	100
55	9	88	88	85	69	60	91	91	87
55	12	92	89	87	76	54	89	95	100
55	23	94	86	94	67	78	90	94	94
55	38	60	71	59	71	8	60	67	67
55	39	87	89	81	77	0	88	91	93
55	45	96	92	92	93	81	84	94	99
55	46	93	93	87	81	76	77	94	97
55	47	0	2	93	93	2	91	93	100
55	48	6	86	92	80	1	92	92	92
55	50	90	89	86	78	0	71	88	96
55	52	95	93	81	94	81	90	92	92
55	53	70	82	68	73	17	68	65	88
55	63	47	43	56	67	0	47	64	96
56	1	89	89	86	95	11	92	92	95
56	18	94	92	93	90	80	94	94	97
56	26	97	95	63	93	86	88	95	99
56	42	92	93	78	97	19	70	98	93
56	44	96	91	87	74	58	94	90	95
56	64	98	91	97	84	16	66	94	93
56	135	92	84	86	89	30	91	84	95
57	10	95	91	97	92	62	97	96	90
58	41	90	83	84	71	83	88	88	93
62	34	88	90	90	89	82	88	92	100

3.1.3. táblázat A kromoszóma konstelláció szerinti egyedi szubklónok és a Steiner-fa asszociált paraméterek összefüggései a különböző leukaemia csoportokban.

	HD		HeL		HeH	
	r*	p**	r	p	r	p
klón # vs Steiner-fa hossz						
minden kariotípus	0.977	<0.001	0.978	<0.001	0.981	<0.001
egysejtes reprezentánsok	0.977	<0.001	0.981	<0.001	0.964	<0.001
kizárása						
‘szimultán’ mutációk vs Steiner-fa hossz						
minden kariotípus	0.798	<0.001	0.897	<0.001	0.774	<0.001
egysejtes reprezentánsok	0.494	<0.005	0.504	<0.05	0.368	<0.01
kizárása						
klónszám - 1 / Steiner-fa hossz						
minden kariotípus	0.848		0.797		0.868	
egysejtes reprezentánsok	0.907		0.936		0.897	
kizárása						

* r - Pearson korrelációs koefficiens, ** p – egymintás valószínűség próba

Azonban, hogy az értékelés biztonságát fokozzuk, minden olyan esetben, ahol a korrelált adatbázist csoport vagy hálózat analízisre használtuk, az egyedi kromoszóma konstellációt mutató szubklónokkal a számításokat kétféleképpen is elvégeztük: minden egyedi szubklónt figyelembe véve, vagy csak a legalább két reprezentánsból álló szubklónokat tekintve. Annak a valószínűsége, hogy tévesen ugyanaz a 8-helyértékű számsor, helyértékenként 3 változóval, kerüljön leolvasásra, a $10^{-3} - 10^{-4}$ tartományban van.

Az iMN8 értékek gyakoriság eloszlása azt mutatta, hogy pre-B-pALL-ben a hyperdiploiditás kialakulásában résztvevő leggyakoribb nyolc kromoszóma vizsgálatával illetve a kariotipizálással nyert MN adatok nagyon szorosan korreláltak (7, 13, 15).

3.1.4. táblázat . Az egyes kromoszómák modális száma (M) valamint az ettől eltérő értéket mutató sejtek aránya, iMN₈ szerint a HeL és HeH csoportban

iMN ₈	ID	Chr4	Chr4	Chr6	Chr6	Chr10	Chr10	Chr14	Chr14	Chr17	Chr17	Chr18	Chr18	Chr21	Chr21	ChrX	ChrX	Mean of
47	11	2	0.13	3	0.47	2	0.02	2	0.39	2	0.01	2	0.03	2	0.05	3	0.55	0.21
47	13	2	0.19	2	0.15	2	0.24	2	0.34	2	0.09	2	0.16	2	0.16	2	0.19	0.19
47	19	2	0.22	2	0.20	2	0.15	2	0.09	2	0.13	2	0.17	2	0.28	2	0.14	0.17
47	21	2	0.44	2	0.01	2	0.01	2	0.04	2	0.01	2	0.07	2	0.01	1	0.41	0.13
47	29	2	0.39	2	0.42	2	0.39	2	0.23	2	0.30	2	0.41	2	0.50	2	0.45	0.39
47	37	2	0.07	2	0.14	2	0.09	3	0.51	2	0.01	2	0.03	2	0.09	2	0.22	0.14
47	51	3	0.44	2	0.46	2	0.48	2	0.26	2	0.16	2	0.47	2	0.45	2	0.47	0.40
47	62	2	0.26	2	0.16	2	0.02	2	0.21	2	0.09	2	0.04	2	0.01	1	0.03	0.10
47	65	2	0.12	2	0.27	2	0.02	2	0.10	2	0.10	2	0.06	2	0.22	1	0.47	0.17
47	68	2	0.10	2	0.04	2	0.07	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.01	2	0.22	0.05
47	92	2	0.01	2	0.04	2	0.01	2	0.54	2	0.00	2	0.03	2	0.18	1	0.03	0.11
47	129	2	0.00	2	0.00	2	0.18	2	0.16	2	0.02	2	0.00	2	0.03	2	0.56	0.12
47	141	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	3	0.10	2	0.01	0.01
47	148	3	0.10	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.01	1	0.00	0.01
47	150	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	3	0.11	2	0.00	0.01
47	151	2	0.01	2	0.07	2	0.01	2	0.04	2	0.01	2	0.01	3	0.17	2	0.01	0.04
47	156	2	0.00	2	0.00	2	0.01	2	0.00	2	0.01	2	0.01	3	0.01	1	0.00	0.01
47	159	2	0.00	2	0.02	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.03	2	0.15	2	0.08	0.03
47	165	2	0.00	2	0.00	2	0.00	3	0.02	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.00	0.00
47	185	2	0.09	2	0.09	2	0.06	2	0.41	2	0.16	2	0.17	2	0.44	1	0.23	0.21
47	195	2	0.03	2	0.01	2	0.01	2	0.01	2	0.00	2	0.01	2	0.01	3	0.01	0.01
47	201	2	0.03	2	0.04	2	0.01	2	0.08	2	0.05	2	0.01	2	0.02	3	0.20	0.06
47	230	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.03	2	0.05	2	0.00	3	0.57	2	0.01	0.08
48	30	3	0.52	2	0.39	2	0.03	2	0.06	2	0.20	2	0.18	2	0.19	2	0.34	0.24
48	58	2	0.48	2	0.53	2	0.43	4	0.63	2	0.19	2	0.38	2	0.44	3	0.62	0.46
48	70	2	0.07	2	0.04	2	0.09	2	0.00	2	0.00	2	0.13	3	0.21	2	0.46	0.13
48	76	2	0.04	2	0.02	2	0.01	2	0.05	2	0.00	2	0.06	3	0.01	2	0.39	0.07
48	93	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.11	2	0.24	2	0.00	3	0.13	2	0.09	0.07
48	168	2	0.13	2	0.41	2	0.14	2	0.15	2	0.09	2	0.00	3	0.07	2	0.16	0.14
48	186	2	0.16	2	0.19	2	0.13	2	0.08	2	0.02	2	0.26	2	0.55	2	0.12	0.19
48	191	2	0.00	2	0.02	2	0.01	2	0.00	2	0.00	2	0.00	3	0.03	3	0.07	0.02
48	231	2	0.00	2	0.03	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.01	2	0.66	2	0.00	0.09
49	61	2	0.06	2	0.03	2	0.09	3	0.43	2	0.16	2	0.13	2	0.14	3	0.19	0.15
49	163	2	0.00	2	0.00	2	0.00	2	0.05	2	0.00	2	0.00	5	0.12	1	0.00	0.02
50	128	2	0.00	2	0.00	2	0.00	4	0.20	2	0.00	2	0.01	2	0.03	3	0.33	0.07
50	204	2	0.00	2	0.22	2	0.03	2	0.50	2	0.30	2	0.14	3	0.56	3	0.00	0.22
Mean of F:			0.11		0.12		0.08		0.16		0.07		0.08		0.19		0.20	0.13
																		0.07-0.20

0.01-0.46

iMN ₈	ID	Chr4 M	Chr4 F	Chr6 M	Chr6 F	Chr10 M	Chr10 F	Chr14 M	Chr14 F	Chr17 M	Chr17 F	Chr18 M	Chr18 F	Chr21 M	Chr21 F	ChrX M	ChrX F	Mean of F
51	24	3	0.18	3	0.30	3	0.44	2	0.16	2	0.00	3	0.43	4	0.26	3	0.44	0.28
51	67	2	0.00	2	0.10	2	0.07	3	0.23	2	0.00	3	0.31	4	0.15	3	0.21	0.13
51	200	2	0.48	2	0.23	2	0.13	3	0.43	2	0.04	2	0.25	3	0.60	3	0.62	0.35
52	4	3	0.28	3	0.30	3	0.30	3	0.33	2	0.01	3	0.35	3	0.39	3	0.40	0.30
52	8	2	0.24	3	0.28	3	0.23	3	0.53	2	0.03	3	0.28	4	0.60	2	0.30	0.31
52	20	3	0.06	3	0.07	2	0.00	2	0.50	3	0.03	2	0.00	4	0.30	3	0.13	0.14
52	33	3	0.05	3	0.11	2	0.00	2	0.19	3	0.31	2	0.00	4	0.22	3	0.29	0.15
52	35	2	0.03	3	0.23	2	0.01	3	0.05	3	0.08	3	0.30	3	0.12	2	0.03	0.11
52	36	2	0.00	3	0.47	2	0.00	3	0.38	2	0.43	3	0.48	4	0.39	3	0.45	0.33
52	71	2	0.00	2	0.00	3	0.12	3	0.14	2	0.00	3	0.13	4	0.10	3	0.09	0.07
52	193	3	0.04	3	0.19	2	0.00	3	0.05	2	0.00	2	0.02	4	0.04	3	0.02	0.04
53	5	2	0.00	3	0.17	3	0.09	3	0.31	3	0.31	4	0.55	4	0.21	2	0.29	0.24
53	15	2	0.03	4	0.14	2	0.05	2	0.04	2	0.01	3	0.22	4	0.03	4	0.06	0.07
53	31	3	0.09	3	0.14	2	0.00	3	0.09	3	0.36	3	0.25	3	0.11	4	0.25	0.16
53	56	3	0.43	3	0.37	3	0.46	2	0.47	2	0.31	2	0.47	3	0.55	2	0.48	0.44
53	57	2	0.55	3	0.39	3	0.41	2	0.48	2	0.44	3	0.44	3	0.32	2	0.18	0.40
53	60	2	0.49	2	0.46	2	0.42	3	0.62	2	0.09	2	0.45	2	0.49	2	0.43	0.43
53	66	3	0.15	3	0.17	3	0.26	2	0.46	2	0.49	3	0.22	4	0.44	3	0.58	0.34
53	170	3	0.01	2	0.01	3	0.00	3	0.00	2	0.01	3	0.43	4	0.04	2	0.00	0.06
54	2	3	0.08	3	0.15	3	0.11	3	0.50	2	0.01	4	0.49	4	0.24	3	0.15	0.22
54	6	2	0.15	3	0.28	3	0.25	3	0.44	2	0.49	4	0.49	4	0.20	3	0.11	0.30
54	7	2	0.26	3	0.43	3	0.42	3	0.59	2	0.01	3	0.39	3	0.60	2	0.33	0.38
54	16	3	0.49	3	0.41	3	0.40	2	0.35	2	0.44	2	0.61	4	0.61	1	0.31	0.45
54	17	2	0.10	3	0.32	2	0.06	4	0.28	2	0.05	3	0.30	4	0.29	4	0.43	0.23
54	22	3	0.09	3	0.08	3	0.11	2	0.12	3	0.25	4	0.40	3	0.11	3	0.13	0.16
54	40	3	0.18	3	0.09	2	0.00	3	0.31	3	0.16	3	0.20	4	0.07	3	0.35	0.17
54	43	3	0.30	3	0.26	3	0.27	2	0.45	2	0.13	3	0.51	4	0.28	2	0.44	0.33
54	49	2	0.03	3	0.20	3	0.20	4	0.17	3	0.23	3	0.20	4	0.27	2	0.05	0.17
54	54	3	0.37	3	0.31	3	0.31	3	0.24	3	0.23	3	0.27	4	0.21	2	0.05	0.25
54	55	3	0.08	3	0.10	3	0.08	3	0.02	2	0.00	3	0.14	4	0.13	2	0.00	0.07
55	9	3	0.12	3	0.12	3	0.14	3	0.39	3	0.42	4	0.37	4	0.35	3	0.19	0.26
55	12	3	0.08	3	0.11	3	0.13	4	0.45	2	0.54	3	0.11	4	0.20	2	0.00	0.20
55	23	3	0.06	3	0.15	3	0.06	3	0.33	3	0.22	3	0.11	4	0.10	2	0.12	0.14
55	38	3	0.40	3	0.29	3	0.41	4	0.34	2	0.08	3	0.40	4	0.33	2	0.33	0.32
iMN ₈	ID	Chr4	Chr4	Chr6	Chr6	Chr10	Chr10	Chr14	Chr14	Chr17	Chr17	Chr18	Chr18	Chr21	Chr21	ChrX	ChrX	Mean of

		dc_1046_15																	3.1
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F	
55	39	3	0.13	3	0.14	3	0.20	3	0.58	2	0.00	3	0.18	4	0.38	4	0.44	0.26	
55	45	3	0.04	3	0.10	3	0.08	3	0.07	3	0.19	3	0.17	4	0.17	2	0.03	0.11	
55	46	3	0.07	3	0.11	3	0.18	3	0.23	3	0.24	3	0.23	4	0.13	2	0.06	0.16	
55	47	2	0.00	2	0.02	3	0.07	4	0.12	2	0.02	3	0.09	4	0.14	4	0.07	0.07	
55	48	2	0.06	3	0.15	4	0.21	3	0.20	2	0.01	4	0.24	4	0.13	3	0.08	0.14	
55	50	3	0.11	3	0.12	3	0.14	3	0.22	2	0.00	3	0.29	5	0.28	2	0.04	0.15	
55	52	3	0.05	3	0.08	3	0.19	3	0.06	3	0.19	3	0.13	4	0.09	3	0.08	0.11	
55	53	3	0.30	3	0.18	3	0.32	4	0.54	2	0.25	3	0.32	4	0.62	4	0.14	0.34	
55	63	2	0.49	2	0.43	2	0.56	4	0.33	2	0.00	2	0.47	4	0.40	2	0.07	0.34	
56	1	3	0.11	3	0.11	3	0.14	4	0.22	2	0.11	4	0.49	4	0.08	3	0.22	0.18	
56	18	3	0.06	3	0.08	3	0.07	3	0.11	3	0.20	4	0.15	4	0.10	2	0.05	0.10	
56	26	3	0.03	3	0.04	3	0.37	3	0.07	3	0.14	3	0.12	4	0.14	3	0.08	0.12	
56	42	3	0.08	3	0.08	3	0.27	4	0.16	2	0.19	3	0.30	4	0.02	4	0.40	0.19	
56	44	4	0.29	3	0.09	3	0.13	3	0.54	3	0.43	4	0.52	4	0.48	3	0.06	0.32	
56	64	3	0.02	3	0.12	3	0.04	4	0.46	2	0.16	3	0.35	4	0.10	4	0.09	0.17	
56	135	3	0.08	3	0.16	3	0.14	4	0.39	2	0.30	4	0.27	4	0.33	4	0.55	0.28	
57	10	3	0.06	3	0.10	3	0.04	3	0.34	3	0.46	4	0.19	4	0.46	3	0.37	0.25	
58	41	4	0.25	4	0.51	4	0.49	4	0.33	3	0.21	3	0.32	4	0.17	3	0.41	0.34	
62	34	4	0.51	4	0.38	4	0.35	4	0.46	4	0.46	4	0.36	5	0.40	4	0.68	0.45	
Mean of F:			0.16		0.20		0.19		0.30		0.18		0.30		0.26		0.23	0.23	
																		0.16-0.30	
																			0.04 – 0.45

Bármelyik megközelítéssel, a total kromoszóma szám szerinti szubklónok, az egyedi kromoszóma konstellációt mutató szubklónok – az összes, vagy a legalább kétsejtes reprezentánsok – alapján, masszívan heterogén szubklonális architektúra mutatkozott az egyes leukaemiákban. Az első megközelítéssel kiderült, hogy a domináns szubklónok csak kb. a felét illetve a harmadát tették ki a HeL illetve HeH csoportba tartozó leukaemiáknak. Ezen adatok korrelálnak egy, genetikailag nem szubtipizált, csak néhány pre-B-pALL leukaemián, mindössze 4 kromoszómára folytatott iFISH tanulmány eredményével, de a legnagyobb CCA adatbázissal, mely szerint az ALL esetek 84%-ában csak 1 klón volt kimutatható, szöges ellentétben állnak (12, 29, 30). A CCA és az iFISH adatok közötti diszkrepancia magyarázható azzal, hogy a CCA procedúra során klonális szelekció léphet fel a szubklónok eltérő növekedési sajátosságai miatt, továbbá azzal, hogy az iFISH tipizálás egy nagyságrenddel nagyobb sejt vizsgálatán alapul. A CCA egyébként korrelált adatgyűjtésnek számítana, feltéve, ha egy mintában levő összes normál és genetikailag aberráns klónt reprezentálná, mely a jelen adatok tükrében már nem valószínűsíthető. Bár a CCA - szelektív felismerési képessége ellenére – kellően nagy kohort vizsgálata alapján fel tudja ismerni egy betegség összes citogenetikai aberrációját, mint például a HeH pre-B-pALL-ét, de ez nem kompenzálja a nagyrészt elvesző, sejt specifikus genetikai információt (31). Ez lehet az oka annak, hogy az új technológiák alkalmazása megkérdőjelezi a pre-B-pALL CCA-ra bázisozott, kvázi monoklonális jellegét (28). Legújabbban az új generációs szekvenálás pre-B-pALL-ben, beleértve a HD leukaemiákat is, az immunglobulin nehézlánc gén (IgH) lokusz masszív heterogenitását tárta fel. Ezt az IgH génátrendeződés folyamatosan ('ongoing') – a malignus transformáció után is – zajló jellegével magyarázták (22,32). Tehát ez a jelenség magasabb és nem a tumor genezis szintjén alakult ki, mint amit jelen tanulmányunk leír.

A három különböző módon meghatározott szubklónok száma szignifikánsan különbözött a HeH és HeL csoportokban, de az egyedi szubklónok száma (mindkét definíció szerint) nem korrelált erősen az iMN₈ értékekkel. Ez azzal magyarázható, hogy a kromoszóma szám szerinti szubklónok gyakoriság eloszlása bizonyos heterogenitást mutatott, különböző mintázatokat vett fel és nem változott arányosan a növekvő iMN₈-cal. Ez azt jelenti, hogy sokkal egyszerűbb, 'célirányosabb' valamint sokkal komplexebb, 'elágazóbb' leukaemogenesis egyaránt állhat a klinikailag manifesztálódó HD pre-B-pALL hátterében. Továbbá, a bimodális szubklón mintázat arra utal, hogy szubklonális szinten is szelekciós nyomás állhat fenn a HeL illetve a HeH tartományokban, melynek következményeként – vagy HeL vagy HeH túlsúlyú - két szubklón populáció fordul elő a HD pre-B-pALL-ben. A masszív szubklonális heterogenitás mellett fokozott CIN értékeket is

találtunk a HeL és a HeH csoportokban, melyek meghaladták a a kromoszóma stabil tumorok illetve a reaktív sejtek hasonló értékeit 3-4x illetve 5-8x (33). A négy relapszus HeH leukaemia változó iMN₈ értékei is ezt a jelenséget tükrözhetnék. Egy tanulmány azonban már leírt hasonló jelenséget, 11 relabáló HeH pre-B-pALL esetén 7 relapszus változatlan, 4 viszont változó modális kromoszóma szám (MN) mellett következett be (34). A CIN fennálltát HD pre-B-pALL-ben már CCA és iFISH tanulmány is leírta, de nemzetközi szakmai körökben az az álláspont dominál, miszerint a HeH pre-B-pALL-ben a CIN patogenetikai szerepet nem játszik és a ritkán metafázissal is látható szubklónok inkább klonális evolúció, mint kariotípus instabilitás eredményei (11, 12, 13, 15, 30, 35). A CIN-re valamint a multiplex CNA-re vonatkozó, klonálisan független relapszusok fennálltát feltáró leleteink egyirányba, szubklonális heterogenitás, 'passenger' mutánsok, preleukémiás klón fennálltára utalnak (36).

Az egyedi kromoszóma nyerések gyakoriság eloszlás vizsgálata iMN₈ szerint azt mutatta, hogy nem mindig ugyanazon kromoszóma szet adja a nyeréseket, még azonos iMN₈ mellett sem. Ez valamint azon csoport analízis eredményünk, miszerint a kromoszóma kópia változásoknak csak egy kis csoportja mutat csoportképződést, arra utalnak, hogy a kromoszóma szám szekvenciális változásának fontos szerepe van a HD pre-B-pALL leukemogenezisében. A hálózat analízis további bizonyítékokkal szolgált ezen patomechanizmus mellett. A Steiner-fa az egymástól egységnyi genetikai eltérésben különböző egyedek (itt szubklónok) közötti legrövidebb hálózatot képviseli. A Steiner-fa hossza valamint a feltételezett 'szimultán' mutációkat is tartalmazó egyedi kromoszóma konstellációt mutató szubklónok száma közötti lineáris és nem logaritmikus összefüggés arra utalt, hogy a kromoszóma szám változások többségben szekvenciálisan, egyesével, mentek végbe. A detektált egyedi szubklónok – 1 / Steiner-fa hossz számérték 1.00, ha minden mutáció szekvenciális, de közelíti a 0.00 értéket, ha minden mutáció szimultán. Ezen paraméter értéke ebben a tanulmányban azt mutatta, hogy a numerikus aberrációk kb. 90 %-a szekvenciálisan alakult ki. Bár ezek nyerések és veszteségek is lehetnek, bármelyik esetben valószínűsíthető, hogy ezen változások nem random folyamatok, hanem szelekciós nyomás hatására születtek. Mivel korábbi allél dózis és CCA tanulmányok kizárták a poliploidizációt és az azt követő kromoszóma veszteségeket, mint patogenetikai útvonalat (Route 2), mert a 21-es kromoszóma kivételével a konzekutív oszlásokban a szekvenciális kromoszóma nyelés potenciális patogenetikai szerepét fenntartották, mert bizonyították, hogy az alacsonyabb MN-nél mutatott kromoszóma nyerések stabilan megmaradtak magasabb MN osztályokban is, és

mivel a jelen tanulmány szerint a kromoszóma szám szerinti szubklónok gyakori bimodális eloszlása áll fenn, az a véleményünk, hogy az adatok a megfelelő kromoszómák szekvenciális nyerésére és nem vesztésére utalnak **(11, 21, 24, 25)**.

Összefoglalva, adataink azt mutatják, hogy a magas hierarchikus rendezettséget mutató szekvenciális kromoszóma szám nyerés valamint a kromoszóma instabilitás meghatározó, de valószínűleg nem kizárólagos patogenetikai szereppel bírnak HeH pre-B-pALL-ben és ezek csak mennyiségileg, de nem minőségileg térnek el a HeL pre-B-pALL-ben észleltektől. A jövőbe nézve, ezen leukaemiákban a kromoszóma szegregációs mechanizmusok vizsgálata olyan specifikus hibákat tárhat fel, amely új target terápia alapját képezhetik **(37)**. Továbbá, az itt bemutatott (8-paraméteres kromoszóma szám) analízis lehetővé teszi mindössze 3 kromoszóma vizsgálata alapján – közel 100 % specificitással és szenzitivitással - a HeH status predikcióját, melyet CCA adatok alapján már korábban is megkíséreltek **(38)**.

3.2. t(12;21)(p13;q22) pozitív gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia: Epidemiológia, prognosztika és reziduális betegség

3.2.a. Bevezetés

A gyermekkori ALL 85%-át kitevő, pre-B-sejtvonalú ALL prognózisában, túlélési mutatóiban jelentős javulás következett be (**1, 2**). Ez nagyrészt a klinikai-laboratóriumi prognosztikai faktorok – többek között a citogenetikai státusz – részletes analízisével, valamint az ezek segítségével csoportosított, betegekre adaptált specifikus terápiával, általánosságban a terápiás lehetőségek jelentős fejlődésével kapcsolatos (**3, 4, 5, 6**). A 2000. évi végleges gyógyulási arány gyermekkori ALL esetén a nemzetközi statisztikák szerint 70-80% (**7, 8, 9**), s ennek a Nemzetközi BFM Munkacsoporthoz (International BFM-family Study Group) csatlakozott Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport által nyilvántartott magyarországi beteganyag is megfelelt (**10**). A 2008-as adatok – a genetikai háttér függvényében – 80-85 %-os illetve 90% feletti túlélést igazoltak (**11**). A véglegesen gyógyult betegek egy része azonban nyilvánvalóan túlkezelt, a betegek 20-30 %-a viszont alul-, ill. rosszul kezelt, a terápia eredménytelen. Ez további terápia stratifikálást tett szükségessé, ennek viszont a betegség heterogenitásának további feltárása és újabb prognosztikai faktorok felismerése az előfeltétele. A fentiek miatt a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport olyan programot indított még az 1990-es évek közepén, melynek célja az volt, hogy az akkori ismeretek alapján a legerősebb, független prognosztikai faktor, a számbeli kromoszóma eltérés mellett a leggyakoribb – részben csak molekuláris technikákkal vizsgálható – strukturális anomáliák is vizsgálatra kerüljenek a gyermekkori ALL beteganyagban. A program a t(12;21)(p13;q22), a t(1;19)(q23;p13), a t(9;22)(q34;q11) és a t(4;11)(q21;q23) vizsgálatát tűzte ki célul. Az ezen kromoszóma anomáliákat, kiegyensúlyozott transzlokációkat hordozó gyermekkori ALL betegek esetében a molekuláris biológiai módszertan új távlatokat nyitott a minimális reziduális betegség (MRB) vizsgálata terén is (**12, 13**). Tanulmányunk első része a fent vázolt program során végzett munka első eredményét foglalja össze. A különböző eljárásokkal (áramlási citometria, interfázis citogenetika) DNS tartalom-kromoszómaszám szerint profilozott ALL csoportokban a t(12;21)(p13;q22) előfordulását mutatja be a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport által 1995-99 között regisztrált 130 gyermekkori ALL beteganyagon (l. 2.2.a. pont). A t(12;21) transzlokáció a 12-es kromoszómán elhelyezkedő TEL (jelenlegi neve: ETV6) és a 21-es kromoszómán lévő AML1 (jelenlegi neve: RUNX1) génnek fúzióját eredményezi. A reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) kimutatható transzlokációt azért tartottuk

fontosnak munkánk első lépéseként vizsgálni, mert klasszikus citogenetikai eljárással nem detektálható; mai ismereteink szerint ez a pre-B-fenotípusú gyermekkori ALL-ben a leggyakrabban előforduló transzlokáció (12, 14, 15, 16, 17), a betegség kimenetelére gyakorolt hatásáról az irodalomban ellentmondásos adatok találhatók (14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) és ilyen tanulmány ebben a geográfiai régióban még nem történt.

A MRB meghatározás nagy jelentőségű, mert az indukciós kemoterápiára adott válasz dinamikáját mutatja, korai relapszust jelez és önálló prognosztikai faktornak bizonyult (25, 26, 27, 28, 29, 30). Az MRB mérésre alkalmazott módszer meghatározása komplex kérdés. A különböző módszerekkel nyert eredmények biológiai jelentése eltérő lehet, ezért vitatott, hogy mely módszerek jellemzik legjobban a tumor higulást (31). A kezdetben divatos PCR alapú eljárásokkal kapcsolatban hangsúlyozandó, hogy a DNS illetve expresszió (RNS) alapú módszerek indirektek, nem ugyanazt mérik, az expresszió nagyságrendekben eltérhet két hasonló sejtpopulációban, a viszonyítás egy referencia génhez történik (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38). A sejt alapú eljárások viszont a maradvány leukaemiás sejtek számáról direkt információt adnak. Az áramlási citometria számára azonban nem mindig áll rendelkezésre patológiás patognomikus fenotípus, vagy az a lefolyás során el is veszhet (39, 40). A konvencionális citogenetika a tenyésztési igény, az alacsony sejtelelem vizsgálati szám, a klonális szelekció, stb miatt kevésbé alkalmas MRB vizsgálatra (41, 42, 43, 44). Az interfázis citogenetika (iFISH) ezen hátrányok jelentős részét leküzdí, célkérdésekre képes választ adni, de a fals pozitivitás arány önmagában MRB meghatározásra kevésbé teszi alkalmassá (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50). Ha az immunfluoreszcens fenotipizálás és az iFISH in situ szimultán vagy szekvenciálisan – egy relokalizációt lehetővé tevő eszközben (Scanning Fluorescence Microscope – SFM) - elvégezhető, akkor feno- és genotipizálás egysejt szinten megvalósítható (Kombinált Immunfluoreszcencia Interfázis FISH /KIIF/), valószínűsíthetően jóval magasabb szenzitivitás mellett (51, 52, 53).

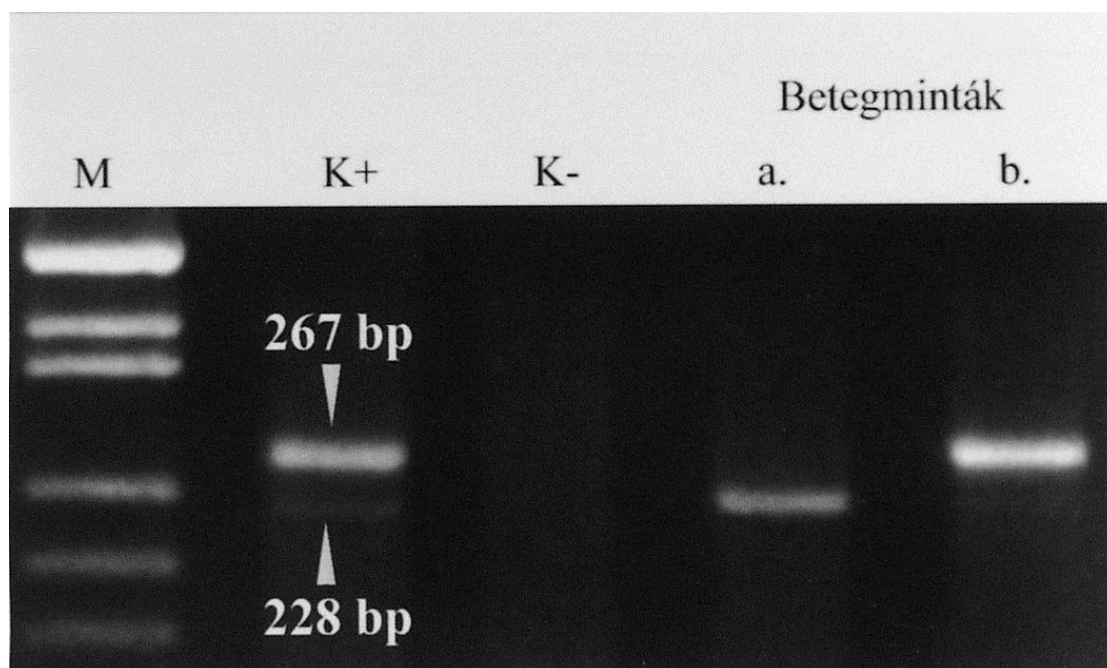
Ennek mentén célünk az volt, hogy egy olyan sejtszintű módszert fejlesszünk ki, mely kombinálja a fenotipizálást és az iFISH-t, továbbá, hogy ennek révén a reziduális tumor tömeg szenzitíven és automatizáltan mérhető legyen pALL-ben. Az itt leírt módszert arra terveztük, hogy a pALL-ben leggyakoribb feno- és genotípust képviselő, ETV6/RUNX1 (korábban TEL/AML1) fúziót eredményező, t(12;21)(p13;q22)+ és acut lymphoblastos leukaemia antigén (CALLA, CD10)+ reziduális leukaemias sejteket legalább 10^{-3} higulásig detektálni tudjuk.

A klinikai tanulmányban a t(12;21)(p13;q22) pozitív pALL betegség

monitorizálására a sejtalapú SFM/KIIF analízist kombináltuk különböző DNS markerek valamint az RNS expresszió valósídejű, klón specifikus, kvantitatív polimeráz láncreakció (RQ-PCR, RQ-RT-PCR) vizsgálatával. Ennek során a betegek egy részében a posztindukciós periódusban olyan leukaemia prekursorokat azonosítottunk SFM/KIIF eljárással, melyek 'láthatatlanok' voltak a DNS és RNS alapú kvantitatív PCR módszerekkel.

3.2.b. Eredmények

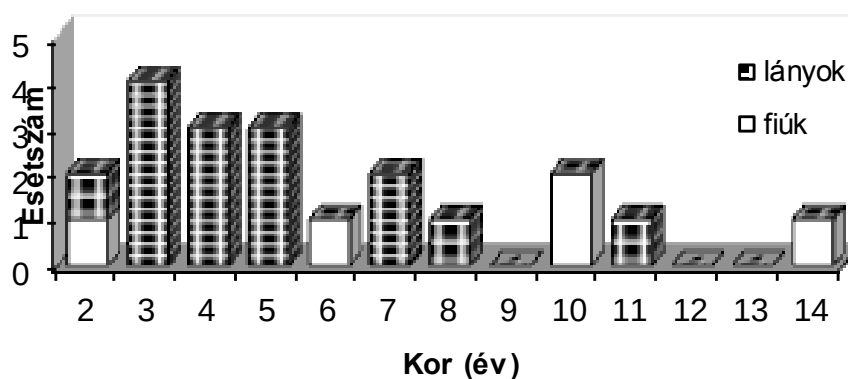
A t(12;21) transzlokáció specifikus RT-PCR eljárás eredménye (3.2.1. ábra).



3.2.1. ábra A t(12;21) kimutatására alkalmazott RT-PCR eljárás termékének gélelektroforézissel történő értékelése. M molekulásúly marker; K+ pozitív kontrollként szolgáló, a t(12;21)-t hordozó REH sejtvonal mintában egy 267 bp és egy 228 bp nagyságú, eltérő intenzitású amplifikátum észlelhető; K- ismert citogenetikájú, t(12;21) transzlokációt nem hordozó sejtvonal; Betegminták t(12;21) pozitív ALL betegek, a. alternatív mRNS érés eredményeként megjelent 228 bp nagyságú amplifikátum, b. intenzív 267 bp nagyságú és gyenge 228 bp nagyságú amplifikátum (54).

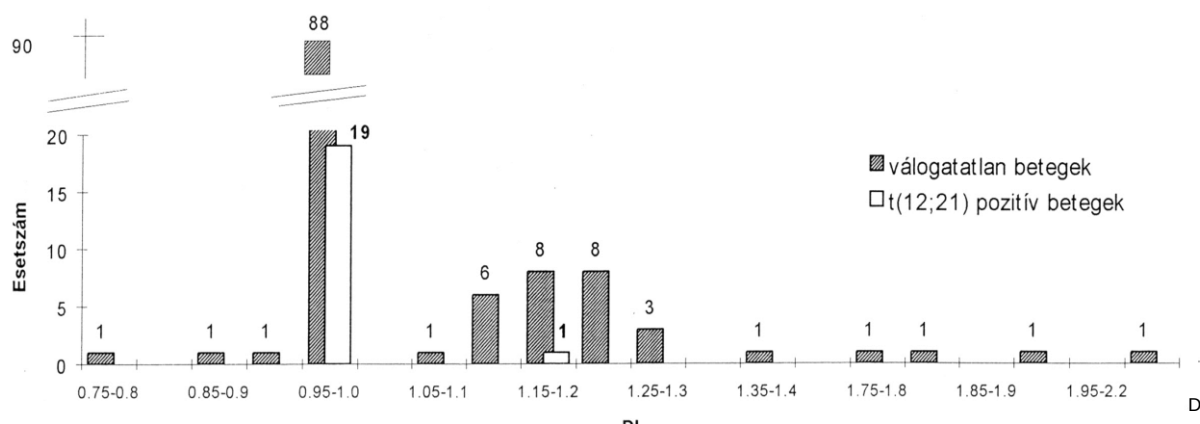
A 130 ALL-es betegmintából izolált RNS-preparátumból 105 esetben volt sikeres az a2-a3 szakasz RT-PCR amplifikálása, azaz 105 ALL minta esetén állt rendelkezésre megfelelő minőségű RNS. A 105 preparátumból 20 mintában (19.0%) kaptunk pozitivitást a t(12;21) transzlokációra és 3 (2.8%) mintában a m-bcr típusú átrendeződésre. A két transzlokáció együttes előfordulását azonban nem észleltük. A t(12;21) pozitív gyermekek

között 14 lány és 6 fiú fordult elő, életkoruk 2 és 14 év között változott 5,8 év átlagéletkorral. Bimodális koreloszlást nem tapasztaltunk (3.2.2. *ábra*).



3.2.2. *ábra* A t(12;21) pozitív betegek kor- és nem szerinti megoszlása (54).

A t(12;21) pozitív ALL betegek DNS tartalom szerinti kategorizálása során összehasonlítottuk a 122 válogatatlan ALL-es gyermek (8 esetben technikai okok miatt nem történt mérés) DNS index (DI) eloszlását a transzlokációra pozitív gyermekek hasonló paraméterével (3.2.3. *ábra* és 3.2.1. *táblázat*).



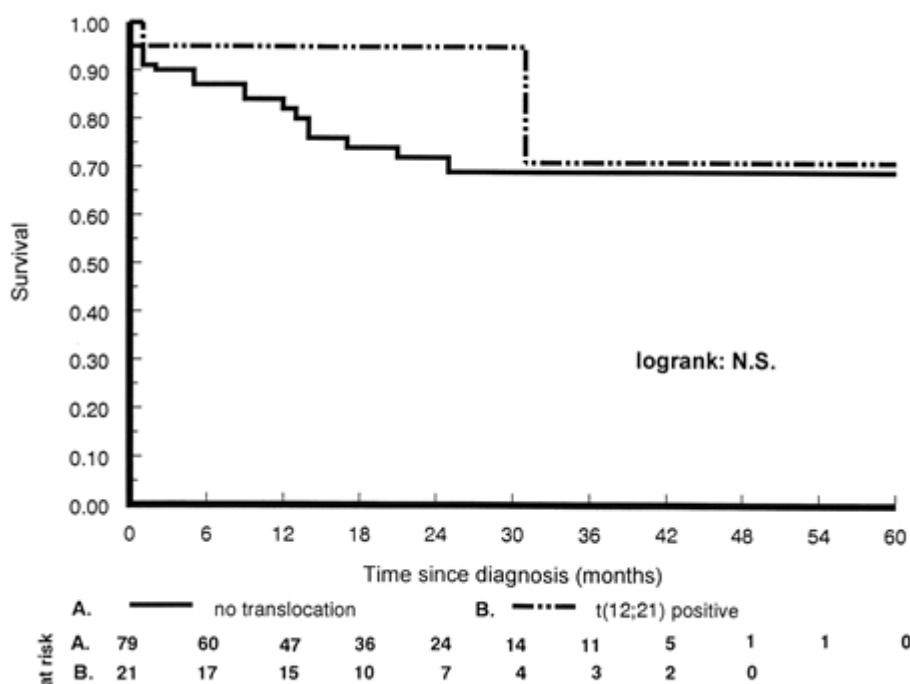
3.2.3. *ábra* A 122 válogatatlan és a 20 t(12;21) pozitív ALL-es gyermek DI eloszlásának összehasonlítása (54).

Az áramlási citometriás DI alapján a válogatatlan ALL betegek 2%-a hypodiploidnak, 72%-a diploidnak, míg 26%-a hyperdiploidnak (6% hyperdiploid A, 20% hyperdiploid B) bizonyult. E paraméter alapján a t(12;21) transzlokációra pozitív betegek megoszlása ugyanezen ploiditási csoportokban 0%, 95% és 5%.

DI	DI<1 <u>hypodiploid</u>	DI=1 <u>diploid</u>	1<DI≤1.15 <u>hyperdiploid A</u>	DI>1.15 <u>hyperdiploid B</u>	<u>Összesen</u>
t(12;21)+ betegek száma	0	19*	0	1	20
%	0	95	0	5	100

* egy betegben 75%-os diploid jellegű blastarány mellett egy minor, az össz blastpopuláció 6%-át kitevő, DI=1.80 klónt azonosítottunk

3.2.1. táblázat A t(12;21) pozitív betegek DI szerinti eloszlása (54).

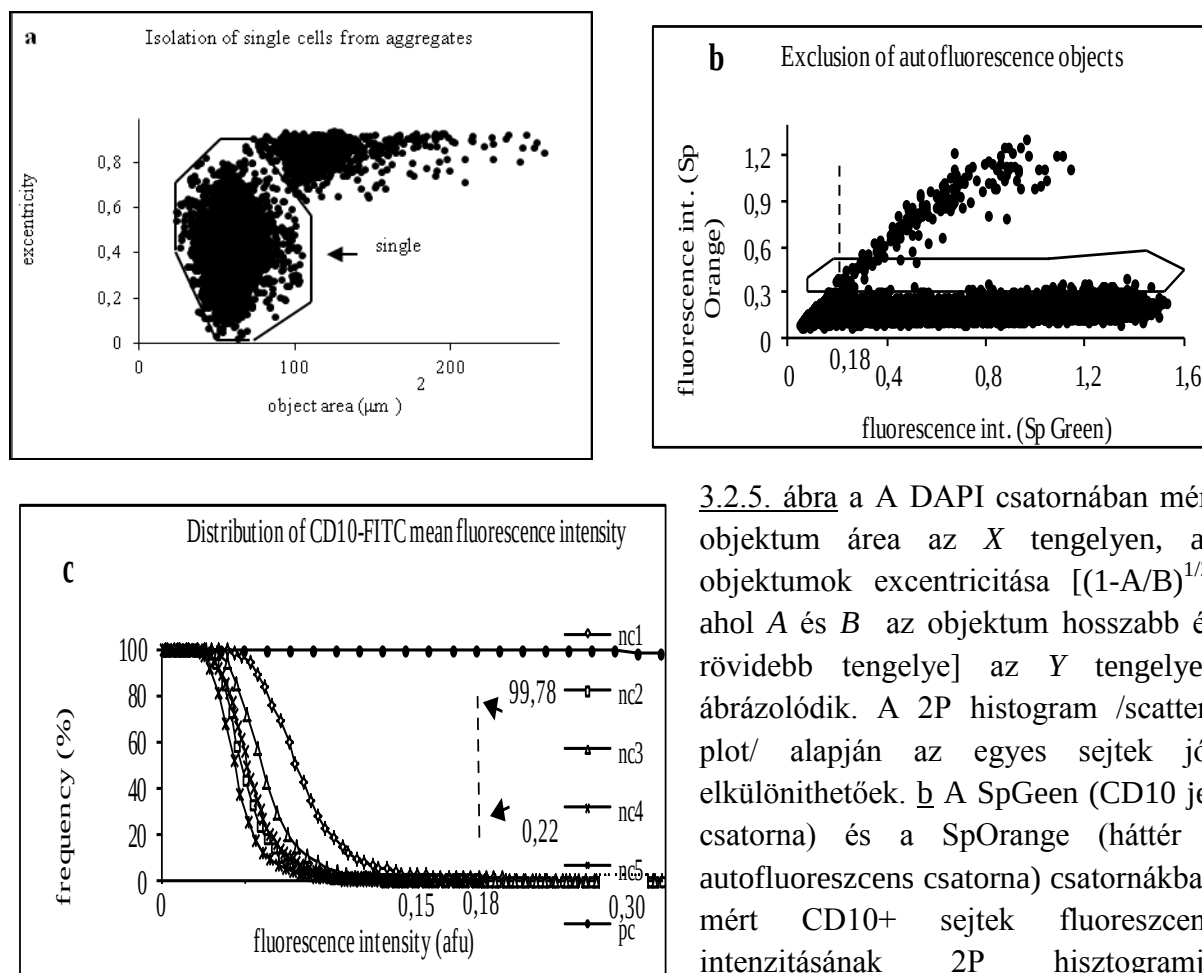


3.2.4. ábra A t(12;21) pozitív illetve negatív, BFM-ALL-95 protokoll szerint kezelt, összesen 100 ALL-es gyermek esemény mentes túlélési görbéi. P (log rank): 0.16, NS (55).

Összesen 100, egységes terápiás protokoll (BFM-ALL-95) szerint kezelt pALL beteg között 21, a t(12;21) transzlokációt hordozó pALL-es gyermek klinikai követését tudtuk elvégezni. A klinikai rizikó csoportok megoszlása a transzlokáció negatív ill. pozitív gyermekek között szignifikánsan különbözött ($\chi^2 = 15.95$, DF:2, $p < 0.001$). A t(12;21) pozitív gyermekek az alacsony rizikó (LR) csoportba sorolódtak. Az esemény mentes túlélési görbék vonatkozásában, azonban, a két csoport, a transzlokációt hordozó illetve arra negatív, nem különbözött szignifikánsan egymástól (3.2.4. ábra).

Az automatizált kombinált immunfenotipizálás (CD10) és iFISH (ETV6/RUNX1) vizsgálatok (KIIF) során az átfekvő sejtek ($7.22 \% \pm 5.64 \%$) a DAPI objektumok 2

paramétere (3.2.5.a ábra), míg az autofluoreszcens sejtörmelékek (1.07 % /0.44-3.77 %/) a SpGreen és SpOrange jelcsatornák alapján (3.2.5.b. ábra) kerültek kizárásra. Ezen processzálást követően az egysejtes sejtfelismerés specificitása 99.71 %-nak felelt meg, míg a CD10 + vs CD10- sejtek a nyert 0.49 ± 0.19 vs 0.12 ± 0.04 afu (önkéntes fluoreszcencia egység) értékek alapján, melyek $P < 0.001$ szintű szignifikáns különbséget mutattak, jobban elkülöníthetők voltak. A CD10+ és CD10- sejteket diszkrimináló fluoreszcencia intenzitás vágási pont meghatározása érdekében a negatív és pozitív sejtek CD10 fluoreszcencia intenzitásának eloszlását vizsgáltuk, az optimális szenzitivitást és specificitást a 0.18 afu határérték biztosította (3.2.5.c. ábra). Így a CD10 detektálás szenzitivitása 99.78 %-nak, specificitása 99.79 %-nak bizonyult (3.2.2. táblázat). A fals pozitívítás határérték (átlag + 2 SD) 0.51 %-ként került meghatározásra a CD10+ sejt detektálás folyamán. Az ily módon történt CD10 pozitivitás meghatározás sebessége átlagosan 33 sejt / sekundum volt



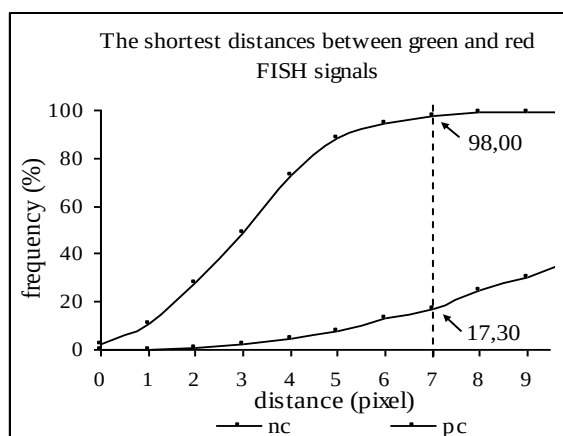
3.2.5. ábra a A DAPI csatornában mért objektum ábra az X tengelyen, az objektumok excentricitása $[(1-A/B)^{1/2}]$, ahol A és B az objektum hosszabb és rövidebb tengelye] az Y tengelyen ábrázolódik. A 2P histogram /scatter-plot/ alapján az egyes sejtek jól elkülöníthetők. b A SpGreen (CD10 jel csatorna) és a SpOrange (háttér / autofluoreszcens csatorna) csatornában mért CD10+ sejtek fluoreszcens intenzitásának 2P hisztogramja (scattergram). Az előző hisztogramon

kikapúzott egysejt DAPI objektumokon belül a mindkét csatornában magas, ezért autofluoreszcenciának minősülő objektumok kizárhatók. c A CD10 fluoreszcens intenzitás eloszlása (efu) negatív kontrol (nc1-nc5) és pozitív kontrol (pc) sejteken, reverz kumulatív hisztogram alapján (56).

3.2.2 táblázat A pozitív sejtek aránya csak a CD10 immunfluoreszcencia (IF) határérték (CD10+) illetve az ETV6/RUNX1 iFISH fúziós szignál határértékkel kombinált (KIIF) kritérium (CD10+, iFISH+) rendszer alapján (56).

Minták	CD10	CD10 és ETV6/RUNX6	A vizsgált sejtek
Negativ kontrol 1	0.20	0.02	29347
Negativ kontrol 2	0.09	0.01	61203
Negativ kontrol 3	0.24	0.06	30336
Negativ kontrol 4	0.46	0.07	17307
Negativ kontrol 5	0.10	0.01	57772
<u>Átlag±SD</u>	<u>0.21±0.15</u>	<u>0.03±0.03</u>	<u>39193±19261</u>
REH *	99.78	98.67	88326
Dilutio 10.0% *	14.36	9.48	49187
Dilutio 5.0% *	4.58	4.37	38345
Dilutio 2.0% *	2.01	1.43	49395
Dilutio 1.0% *	1.08	0.89	38023
Dilutio 0.5% *	0.67	0.46	50700
Dilutio 0.2% *	0.28	0.21	68049
Dilutio 0.1% *	0.15	0.10	50089

*Az értékek triplikátumból származnak és a negativ sejtekben higitott pozitív sejtek %-os arányát mutatják.

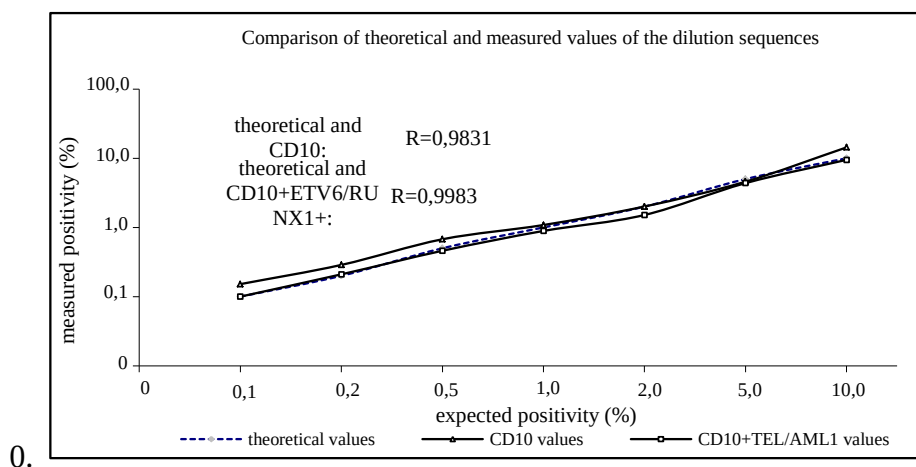


Az automatikus iFISH detektálás során az iFISH pozitivitás határt a legrövidebb piros – zöld jeltávolság alapján 7 pixel-ben (1.18 µm) határoztuk meg, ennél 98 % szenzitivitást és 82.7 % specificitást nyertünk. A relatív alacsony specificitás annak tudható be, hogy az extraszignált – nagy intenzitás variabilitása miatt – kizártuk a pozitivitás kritériumok közül (3.2.6. ábra).

3.2.6. ábra A legrövidebb, piros és zöld iFISH szignálok közötti jeltávolság eloszlás negatív (nc) és pozitív (pc) kontrol sejteken, kumulatív hisztogram alapján. A határérték 7 pixel-ben (1.18 µm) került megállapításra (56).

A CD10+ és iFISH+ kritériumok alapján az automatizált rendszer CD10+, iFISH+ (leukaemia sejt) valamint CD10+, iFISH- (haematogonium) csoportokra tudta szeparálni a szkennelt DAPI objektumokat. A KIIF módszer szenzitivitása 98.67 %, specificitása 99.97 %-nak bizonyult (3.2.2. táblázat).

A pozitív események detektálásának legalacsonyabb, még megbízható szintjét a fals pozitívitas + 2 SD alapján, $0.03\% + 0.06\% = 0.09\%$ -ban határoztuk meg, mely 9×10^{-4} gyakoriságú esemény detektálhatóságát jelenti. A későbbiekben ezt az értéket a gyakorlati szempontok alapján, a klinikai tanulmányok során 10^{-3} szintre 'rontottuk'. A KIIF alapján történt pozitívitas meghatározás nagyon jól korrelált az elméleti pozitív sejttértékekkel ($r = 0.998$) és erősebbnek bizonyult a csak immunfluoreszcencia alapján történt meghatározásnál észlelt korrelációnál ($r = 0.983$). Az átlagos különbség az KIIF pozitívitas meghatározás és az elméleti értékek között 0.26% volt, de a MRB vizsgálat szempontjából nagyon fontos $0.1\% - 0.5\%$ tartományban ez az érték mindössze 0.01% volt. (3.2.7. ábra). A kombinált immunfluoreszcencia + iFISH jelek automatizált meghatározása, kategorizálása és tárolása (KIIF vizsgálat) átlagosan sejtenként 15 msp-et vett igénybe.



3.2.7. ábra A CD10+, ETV6/RUNX1+ REH sejtvonal sejtek különböző hígításaiban az elméleti és a CD10 immunfluoreszcencia (IF) illetve a kombinált immunfluoreszcencia és iFISH (KIIF) módszer alapján mért pozitívitas értékek korrelációja, mely $r = 0.983$ -nak ill $r = 0.998$ -nak felelt meg (**56**).

A klinikai tanulmányban a követett 14 t(12;21) ETV6/RUNX1+ pALL beteg különböző módszerekkel és időpontokban meghatározott MRB adatait összefoglalóan a 3.2.3. táblázat mutatja. Mivel a SFM / KIIF módszerrel a fals pozitív arány 3×10^{-4} -nek, a választott pozitívitas határérték (átlag fals pozitív + 2 SD) pedig 9×10^{-4} -nek felelt meg, a különböző analitikai módszerekkel mért terápiás válaszokat a $\text{MRB} \geq 10^{-3}$ tartományban hasonlítottuk össze.

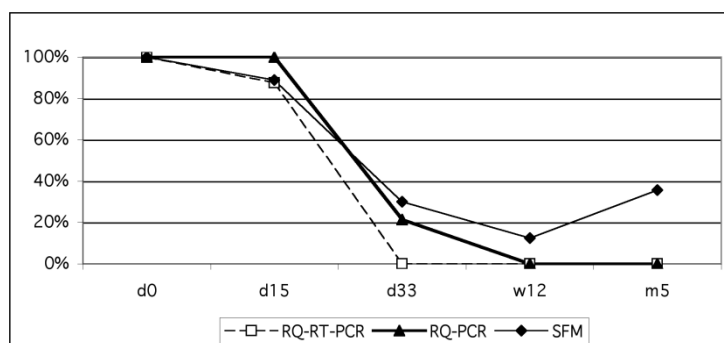
3.2.3. táblázat Tumor higulási, különböző módszerekkel mért adatok a különböző követési időpontoknál, 14 ETV6/RUNX1+ pALL betegnél (57).

Beteg	Módszer	15. nap	33. nap	12. hét	5. hó
#1	SFM	1.0*	NA	3.0< †	1.6
	RQ-PCR	1.0	2.6	3.1	3.1
	RQ-RT-PCR	0.4	3.5	3.9	5.0
#2	SFM	NA	3.0<	NA	3.0<
	RQ-PCR	NA	5.0<	NA	5.0<
	RQ-RT-PCR	NA	5.4<	NA	5.4<
#3	SFM	NA	3.0<	NA	3.0<
	RQ-PCR	NA	5.0<	NA	5.0<
	RQ-RT-PCR	NA	5.7<	NA	5.7<
#4	SFM	2.2	2.7	NA	2.5
	RQ-PCR	2.3	4.0	4.0<	4.0<
	RQ-RT-PCR	4.3	5.4<	5.4<	5.4<
#5	SFM	0.9	2.3	2.1	3.0<
	RQ-PCR IgH1 ⁺	0.5	2.6	4.0<	4.0<
	RQ-PCR IgH2	0.2	3.8	4.0<	4.0<
	RQ-PCR IgH3	0.6	2.4	4.0<	4.0<
	RQ-RT-PCR	0.6	NA	6.1	5.4<
#6	SFM	0.8	3.0<	3.0<	2.3
	RQ-PCR	0.9	3.2	5.0<	5.0<
	RQ-RT-PCR	2.0	3.9	5.7<	5.7<
#7	SFM	1.0	2.6	3.0<	3.0<
	RQ-PCR	1.4	3.8	4.5	5.0<
	RQ-RT-PCR	2.3	5.1	6.1<	6.1<
#8	SFM	2.3	NA	3.0<	1.4
	RQ-PCR	2.0	3.0	3.7	4.0<
	RQ-RT-PCR	2.4	4.2	6.3	5.0
#9	SFM	3.0<	NA	3.0<	1.9
	RQ-PCR	NA	5.0<	5.0<	5.0<
	RQ-RT-PCR	2.8	NA	6.1<	6.1<
#10	SFM	NA	3.0<	3.0<	3.0<
	RQ-PCR	1.7	3.4	4.4	4.4
	RQ-RT-PCR	NA	3.6	4.4	4.7<
#11	SFM	1.1	3.0<	3.0<	3.0<
	RQ-PCR	NA	3.0<	3.0<	3.0<
	RQ-RT-PCR	1.6	5.3	5.4<	5.4<
#12	SFM	NA	3.0<	NA	3.0<
	RQ-PCR	NA	2.5	NA	4.0
	RQ-RT-PCR	NA	4.6	NA	4.7<

#13	SFM	2.2	3.0<	NA	3.0<
•					
• Beteg	Módszer	15. nap	33. nap	12. hét	5. hó
	RQ-PCR	0.9	4.0<	NA	4.0<
	RQ-RT-PCR	NA	5.0<	NA	5.0<
#14	SFM	NA	NA	NA	3.0<
	RQ-PCR	1.2	4.0<	4.0<	4.0<
	RQ-RT-PCR	NA	5.0<	5.0<	5.0<

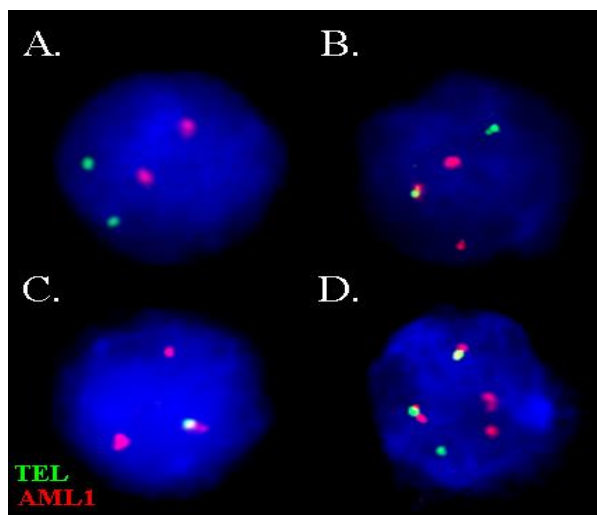
* A tumor hígulás a specifikus tárgat relatív mennyiségének (l. 2.2.k. fejezet) negatív logaritmusában került feltüntetésre; † A < szimbólum előtti érték az adott módszerrel detektálható legnagyobb tumor hígulás negatív logaritmus; NA – Nincs adat (minta hiányában); + Ebben a betegben három klónt azonosítottunk az immunglobulin nehézlánc (IgH) génátrendeződés alapján.

Csaknem minden beteg (88 % - 100 %) ebbe a tartományban esett mindhárom módszerrel a 15. napon (3.2.3. táblázat; 3.2.8. ábra). Szemben, azonban, az RNS és DNS alapú analízis eredményeivel, melyek minden esetben $MRB < 10^{-3}$ státuszt mutattak a 33. napon illetve a 12. héten, SFM/KIIF eljárással a betegek egy részénél 10^{-3} -nál nagyobb MRB-et lehetett mérni. Ezen túl, ezen beteg arány a 12. heti 13%-ról az 5. hónapra 36 %-ra növekedett, miközben ezen érték zero maradt mind az RNS, mind a DNS alapú MRB vizsgálatoknál. Az SFM/KIIF módszerrel azonosított $\geq 10^{-3}$ MRB pozitív betegek az 5. hónapnál, átlagosan, nagyobb residuumot, vagy legalábbis CD10+ és ETV6RUNX1+ target sejteket mutattak (átlag MRB érték: 1.9, tartomány: 1.4-2.5; átlag CD10+ sejt flow citométerrel: 1.3 %, tartomány: 0.9-1.7), mint a 12. héten mért MRB érték (2.1). Az egyes betegek (#1, #4, #6, #8 és #9), akiknél az SFM/KIIF módszer $MRB \geq 10^{-3}$ státuszt mutatott, ezzel a módszerrel 1.5-3.1 illetve 2.9-4.2 nagyságrenddel alacsonyabb MRB érték volt azonosítható, mint DNS illetve RNS alapú PCR analízisekkel (3.2.3. táblázat).



3.2.8 ábra A 10^{-3} -nál nagyobb MRB-et mutató betegek aránya RQ-PCR, RQ-RT-PCR illetve SFM/KIIF módszerrel a követési idő függvényében. Csak az utóbbi módszer tudott CD10-ETV6/RUNX1 dupla pozitív, leukaemia feno- és genotípusú sejteket a 12. héten illetve az 5.

hónapnál kimutatni ebben a MRB tartományban (57)



3.2.9. 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).

A FISH jelmintázat alapján interfázis citogenetikai bizonyítékunk van arra, hogy a 12. héten és az 5. hónapnál, a követett betegek több, mint 1/3-ban (5 betegben) SFM/KIIF módszerrel észlelt, dupla CD10-iFISH pozitív sejtek leukaemia prekursor sejtek és nem leukaemiás reziduális sejtek (3.2.9. ábra). Ahhoz, hogy a t(12;21)+ pALL kialakuljon, az *in utero* létrejövő monoallelikus átrendeződéshez postnatalisan másodlagos aberráció létrejötte szükséges (75%-ban a normal ETV6 (TEL) deléciója, mely LOH-t eredményez vagy a fúziós gén duplikációja). Valóban a kérdéses 5 beteg kezeletlen mintáiban komplex citogenetika volt észlelhető. 3/5-ben átrendeződés + a normál ETV6 deléciója, 1/5-ben dupla fúziós gén és 1/5-ben az előző két variációt felváltva hordozó szubklónok voltak azonosíthatóak. Ezzel szemben ezen betegek 33. nap utáni követési mintáiban a CD10+ sejtekben csak 1 fúzió és 1 megtartott ETV6 (TEL) allél volt jelen, mely leukaemia prekursor sejtre utal (3.2.9. B. ábra).

3.2.c. Diskusszió és következtetések

A t(12;21)(p13;q22) transzlokáció elenyésző arányban, kevesebb, mint 0.05%-ban mutatható ki hagyományos citogenetikával ALL-ben megbetegedett gyermekekben (58). A transzlokáció klónozását követő molekuláris vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a transzlokációban a 12-es kromoszóma TEL, (újabb nómenklátúra szerint ETV6 /59/) illetve a 21-es kromoszóma AML-1 (RUNX1) génje vesz részt (60, 61). Az ETV6 és a RUNX1 gének terméke egyaránt transzkripciós faktor, az utóbbiról tudott, hogy a haemopoiesis-specifikus gének (IL-3, GM-CSF, CSF-1, myeloperoxidase) expresszióját reguláló RUNX1/CBF β transzkripciós faktor DNS-kötő alegységét képezi. (62, 63, 64). A RUNX1 pozitív regulátora az embriogenezisben és a haemopoetikus differenciálódásban is centrális transzkripciós faktorként szolgáló HOX gencsaládnak. A DNS-hez történt kötődést követően a RUNX1 hiszton acetiláz-t (HA) rekrutál, mely 'kinyitja' a kromatint és engedi a transzkripció

progresszióját (65). A t(12;21) ETV6/RUNX1 génfüziót eredményez, mely kiméra mRNS-ként, illetve fehérjeként expresszálódik. A t(12;21) transzformáló-leukaemogen hatása az RUNX1 termék aktivitásának változásával kapcsolatos (23). Az ETV6-RUNX1 kiméra fehérje megtartja a RUNX1 DNS kötési specificitását (TGTGGT hexamer), de HA helyet hiszton deacetilázt (HDA) köt, mely 'bezárja' a kromatint és leállítja a transzkriptiót. Kis molekulású HDA gátlók klinikai tesztelése pozitív eredményeket adott ebben a betegségben (66).

Az egyik allélen bekövetkező, t(12;21) általában már prenatalis, de önmagában recesszív esemény, leukaemiát nem eredményez, csak leukaemia prekursor sejteket. Biallelikus aberráció (LOH) vagy fúziós gén dózistöbblet (duplikáció) szükséges a leukaemia kialakulásához (67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76). A fenti mechanizmust támogatja az a megfigyelés is, miszerint a t(12;21) pozitív ALL betegek kb. 75%-ában a nem átrendeződött másik TEL allél deletált, ezzel heterozigotázis veszteség (LOH) okozva, a diagnosis időpontjában (59, 66).

A hagyományos citogenetikai vizsgálattal gyakorlatilag felismerhetetlen t(12;21) eredményeként létrejövő ETV6/RUNX-1 kiméra mRNS reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével kimutatható (61). A molekuláris módszerek alkalmazásával megállapítást nyert, hogy a TEL/AML-1 fúzió incidenciája a gyermekkori ALL-ben 16-23%, és ezzel a leggyakoribb kromoszomális átrendeződés e betegcsoportban (17, 23, 77, 78, 79). Felnőttkori ALL-ben ugyanakkor nem jellemző, incidenciája mindössze 3% (78). A gyermekkori t(12;21) pozitív ALL betegek egyéb paraméterekben is külön alcsoportot képeznek az irodalmi adatok alapján. A betegek 1-10 év közöttiek, 3 év körüli halmozódással, bár egy tanulmány bimodális koreloszlást, 3 és 12 év körüli halmozódással, is leírt (23, 80). A leukaemiás sejtek B-prekursor fenotípusúak, diploid DNS állománnyal rendelkeznek, és más transzlokáció nem fordul elő bennük (17, 23). E betegcsoport prognosztikáját illetően másfél évtizede intenzív nemzetközi kutatások zajlanak. A Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport által regisztrált beteganyagon t(12;21) ilyen irányú vizsgálatok még nem történtek (2000-ig). A fentiek, valamint a Nemzetközi BFM Munkacsoporthoz csatlakozott Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport adataival kapcsolatos kompatibilitás igény is indokolta egy ilyen retrospektív és jelenleg is zajló prospektív vizsgálat végzését. Vizsgálataink során a nemzetközi közleményekben jelölt tartományba eső, 19%-os (további adatgyűjtésünk során 20.5%-os /81/) t(12;21) gyakoriságot észleltünk a gyermekkori ALL populációban. A pozitív betegek 75%-ában észleltünk kétféle mólsúlyú amplifikált terméket RT-PCR reakcióval, mely alternatív mRNS érés eredménye

(16). Ennek prognosztikai jelentőségére vonatkozó adatokat nem ismerünk. Ugyancsak megegyezett a TEL/AML-1 pozitív betegeink immunfenotípusa és koreloszlása a korábban közöltekkel (19, 82). A t(12;21) együttes előfordulását az ismert rossz prognosztikai hatású m-bcr típusú Philadelphia transzlokációval nem észleltük, mely összhangban áll azon megfigyelésekkel, miszerint a t(12;21) a kiegyensúlyozott transzlokációkat tekintve izolált genetikai aberráció/ transzlokáció gyermekkori ALL-ben (12, 83).

A t(12;21) jelenlétét a leukaemiás sejtekben több közlemény jó, vagy kiemelkedően előnyös prognosztikai hatásúnak tartja (12, 17, 20, 21, 23, 80), de ismerünk ezzel ellentétes véleményt megfogalmazó tanulmányokat is (13, 18, 22, 84, 85). Az utóbbiak a t(12;21) előnyös prognosztikai hatásával szemben általában azt hozzák fel, hogy a transzlokáció gyakorisága a recidiváló ALL csoportban megegyezik a betegség kezdetekor észlelttel. Régóta ismert és többszörösen megerősített tény, hogy gyermekkori ALL-ben a legerősebb egyedi és független prognosztikai faktor a kromoszóma szám, illetve a DNS tartalom az első remisszió időtartama, illetve az 5 éves túlélés szempontjából (86, 87, 88, 89, 90, 91). E szerint a legjobb a hyperdiploid B (MN > 50), de a hyperdiploid csoporton belül az ellentmondó adatok miatt további vizsgálatok szükségesek az 51-55 és az 56-67 kromoszómaszám, valamint a strukturális anomáliák jelenléte módosító hatásának meghatározása érdekében (92, 93, 94). A prognosztikailag ellentmondásos adatok miatt is vizsgáltuk az RT-PCR-rel azonosított betegeknél a ploeditási státuszt. Azon észleletünk, miszerint a DNS index alapján a csak kb. kétharmadban diploid válogatatlan ALL-hez képest a t(12;21) pozitív ALL betegek csaknem 100%-a diploid, összhangban áll több idevonatkozó közléssel (17, 23). Az interfázis citogenetikai vizsgálataink ugyan feltártak egy bizonyos mértékű heterogenitást, kb. 20 %-ban pszeudodiploiditást (54), de ennek szerepe és léte kétséges a későbbi vizsgálataink alapján. Ugyanakkor a hivatkozott, ellentmondásos prognosztikai szerep kérdéskörbe illik az, hogy bár a transzlokáció pozitív pALL gyerekek klinikailag alacsony rizikó csoportba sorolódtak, de az eseménymentes túlélési görbék nem különbözött a transzlokáció negatív pALL betegeitől. Ez kapcsolatos lehet azzal, hogy az új betegségek valamint a relapszusok között közel egyforma a t(12;21) incidencia, ez pedig a leukaemia prekursor állapotának létezésével lehet összefüggésben (69).

Ezen ellentmondások tisztázása a MRB, beleértve az esetleges prekursor formák detektálásának igényét is, vizsgálatát tették szükségessé. A PCR korszakban technikailag lehetővé vált, nagyon alacsony, 10^{-6} -on szintű MRB klinikai jelentősége bizonytalan, sőt inkább kétséges, de a 10^{-3} -on szintű tumor sejt redukció kimutatottan prognosztikai értékű

(95, 96, 97). A kariotipizálás, önmagában az iFISH, az áramlási citometria MRD mérésre való alkalmazhatóságára valamint az RQ-PCR és az RQ-RT-PCR eljárások eltérő biológiai jelentésére már a bevezetésben (3.2.a. fejezet) utalás történt (37, 38, 40, 41, 44, 50). A t(12;21) ETV//RUNX1+ pALL betegek kezeletlen és relapszus mintáinak illetve ilyen leukaemiában megbetegedő gyermekek köldökvéréből izolált DNS-en elvégzett klonotipikus PCR tesztek 2/14 illetve 7/14 mintában találtak prekursor leukaemia sejtekre utaló leleteket (68, 69, 70, 73). Válogatatlan köldökvér minták (567) 1 %-ában azonosítottak a mononukleáris sejtek 10^{-3} – 10^{-4} nagyságú frakciójában (becsült érték) fúziós transzkriptumot RQ-RT-PCR módszerrel. Ez az adott leukaemia kumulatív rizikójánál 100x nagyobb gyakoriság. Négy (4/6) mintából nyert sejteken elvégzett konzekutív immunfluoreszcencia / iFISH révén, a prekursor (CD10+) illetve az érett (CD10-, CD19+) B-sejtek 0.24 – 0.33 %-ban monoallelikus fúziót és intakt normal ETV6 gént mutattak ki (67, 72). Az egypetéjű ikrekben észlelt gyermekkori leukaemiák alacsony (~5%) konkordanciája, a konkordáns leukaemia általában hosszú posztnatalis latenciája alapján *in utero* kialakuló, tumor szupresszor gén (TSG), tehát recesszív és monoallelikus, primér aberrációt feltételeztek. Ennek alapján és a fenti célok miatt olyan módszerre volt szükségünk, mely fenotípus meghatározást egysejt szinten, relativ nagy sebességgel (ritka esemény detektálás) és automatizáltan, magas szenzitivitással és specificitással elvégez és a monoallelikus aberrációt is kimutatja. Az 1990-es évek elejétől egyre növekvő igény volt arra, hogy sejtojektumok fenotípusa – beleértve a morfológiát is – és genotípusa egyaránt vizsgálható legyen. Eljárást a fenotípus és a kariotípus együttes értékelésére először Teerenhovi és mtsai közöltek (98). Később interfázis sejten elvégzett kombinált fenotípus és genotípus vizsgálat kifejlesztése történt (51, 99). Olyan FICTION (fluorescence immunphenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms) eljárást dolgoztak ki, mely numerikus kromoszóma aberrációt és fenotípust egysejt szinten tudott vizsgálni (100). A fluoreszcens technológia fejlődésének köszönhetően már többszörös immunmárker jelölés és multiplex genetikai aberráció vizsgálata is lehetővé vált (53, 101-105). Ennek alapján a módszer alkalmazásra került már MRB vizsgálatára is (106, 107). Az összes addigi applikációban, azonban, az automatizált szkennelés csak a fenotípus/morfológiai kritérium(ok)nak megfelelő tárgyat azonosítását és relokalizációt lehetővé tevő kép-galéria létrehozását célozta. Az ezt követő iFISH szignál mintázat felismerés / értékelés manuálisan történt az előzetesen szelektált sejteken. Munkánk során kidolgoztuk a pALL-ben leggyakoribb fenotípust és genotípus képviselő (47, 108), CD10+ / t(12;21)(p13;q22)+ leukaemia sejtek detektálásának KIIF technológiáját, meghatároztuk az

analitikai paramétereket (szenzitivitás, specificitás). Az eljárásunkban nem csak a fenotípus márkere volt automatizáltan szelektált, de – korábbi munkánk alapján **(109)** – a 3D analízis alapján meghatározott, pozitív iFISH mintázat is. Az eljárás szenzitivitása 98.67 %-nak bizonyult, tehát a valódi pozitív sejteknek csak 1.33 %-át nem tudja azonosítani a rendszer. Még fontosabb, hogy a specificitás 99.97 %, azaz a fals pozitívitás (FP) 0.03 %. Az átlag FP + 2 SD pozitívitás határértéket ($0.09 \% = 9 \times 10^{-4}$) megállapítva a klinikai döntésekben fontos 10^{-3} szintű tumor hígulás **(29, 110)** biztosan meghatározható és a feno-/genotípus alapján galériában archivált sejtekben a monoallelikus vs. biallelikus genetikai aberráció analizálható.

A klinikai tanulmány során 14 t(12;21) pALL-ben szenvedő beteg összesen 63 csontvelő mintájában a MRB-et - DNS márkerek és a kiméra transzkriptum RQ-PCR illetve RQ-RT-PCR módszerekkel történő követése mellett - az újonnan kidolgozott KIIF eljárással monitorizáltuk. Az SFM/KIIF eljárással pozitívnak azonosított sejtekben (CD10+, 1 fúzió+) az eredeti, leukaemia specifikus második genetikai aberráció hiánya arra utalt, hogy ezen sejtelemek nem reziduális sejtek, hanem CD10+ prekursor, preleukaemiás sejtek. Ezek a 33. posztindukciós naptól jelen voltak, legnagyobb arányban, több, mint a betegek 1/3-ában az 5. hónapban, de az eredeti leukaemiában nem voltak detektálhatók. A t(12;21)+ pALL-ben megbetegedett gyerekek köldökvérsejtjein, a relabáló ETV6/RUNX1+ beteganyagon valamint a válogatatlan köldökvérmintákon végzett, fentebb már tömören kifejtett, tanulmányok mellett további bizonyítékok is vannak a t(12;21)+ pALL prekursor sejtek létezésére **(74, 75, 76, 111)**. ETV6/RUNX1+ leukaemiás csontvelőben CD34⁺, CD38^{-low}, CD19⁺ populáció azonosítható, melyek az átrendeződést bi-allelikus hordozzák, kiméra mRNS-t expresszálnak és xenograftolhatók. Ezen elemek a rák őssejtek ('cancer stem cells', 'tumor propagating cells'). Monochorionális ikerpár egyik tagját megbetegítő t(12,21)+ leukaemia esetén az egészséges ikertagban is azonosítható ez a CD34⁺, CD38^{-low}, CD19⁺ pro-B-sejt populáció a következő jellemzőkkel: i.) monoallelikus ETV6/RUNX1 átrendeződés, ii.) kiméra mRNS expresszió hiánya, iii.) a teljes IgH gén szintjén még csiravonal Ig gének, de az IgH-DJ alapján klonális populáció, iv.) átolthatóság SCID egérbe (xenograf) – reprodukciós / 'self-renewing' képesség. Az ETV6/RUNX1 gén transdukálható humán köldökvér sejtekbe és egyedüli mutációként 'ön-megújuló' (xenograf) képességet idéz elő a sejtekben, melyek CD38⁺, CD19⁺ sejtekké differenciálódnak, rezisztensek apoptotikus stimulusokra.

A kezelet t(12;21)+ betegekben a 33. héttől növekvő arányban, $10^{-2} - 10^{-3}$ gyakorisággal detektált CD10+, ETV6/RUNX1+ sejtek prekursor leukaemia sejtek kell legyenek, mert a $10^{-5} - 10^{-6}$ érzékenységu RQ-RT-PCR-rel illetve klón specifikus DNS alapú

RQ-PCR-rel nem voltak detektálhatóak és monoallelikus átrendeződést mutattak. Ezek a korlátlan növekedési potenciálra szert tett preleukaemiás sejtek relapszus forrásai lehetnek, melyek tipusosan későn alakulnak ki ebben a pALL típusban, es nem reziduális leukaemia sejtekből indulnak ki (20). Az egyetlen beteg (#1), aki a 24. hónapban relabált, az egyike volt annak az 5 betegnek, akinél preleukaemiás sejteket azonosítottunk a lefolyás során. Egy másik beteg (#7) meningealis, de nem csontvelői relapszust mutatott, mely reziduális leukaemia sejtekből kellett kiinduljon.

Összességében megállapítható, hogy a kidolgozott sejtszintű, kombinált feno- és genotipizálási módszer kezelt t(12;21)+ pALL betegekben először mutatta meg, képi valóságában is, a preleukaemiás sejteket. Valószínűsíthető, hogy az eljárás alkalmazása fontos módszer lehet a t(12;21)+ pALL monitorizálásban és a relapszusok predikciójában.

3.3. Ph+/bcr-abl átrendeződés pozitív betegségek vizsgálata iFISH--sel

3.3.1. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató akut és chronicus myeloproliferatív betegségek heterogenitásának vizsgálata

3.3.1.a. Bevezetés

3.3.1.a.1. Philadelphia kromoszóma (Ph) pozitív akut lymphoblastos leukaemia (ALL) a gyermekkori ALL-nek (pALL) mindössze 2-4%-át adja, a felnőttkori ALL-nek (aALL) jelentős részét, 25%-át képezi, míg ez a transzlokáció pathognomikus a chronicus myeloid leukaemiára (CML) (1, 2, 3, 4). A klinikailag nem ismert chronicus fázissal bíró CML-es betegekben kialakuló lymphoid blastos crisis (LBC) differenciálása *de novo* Ph+ ALL-től különösen nehéz. A CML-LBC-ra egyrészt jellemző, hogy az akut blastos folyamat komplett remissziója az alapbetegség chronicus fázisába történő konverziót jelenti, másrészt, hogy biztosan el nem kötelezett őssejt eredetű folyamatnak felel meg (5, 6). Ismert, hogy azon látszólag *de novo* Ph+ ALL betegeknél, ahol komplett remisszió kialakulása ellenére a Ph+ sejtek nem tűnnek el, sőt arányuk magas marad, chronicus fázisú – addig ismeretlen – CML-re (CML-CF) kell gondolni. Ellenkezőleg, azon betegeknél, ahol a Ph+ akut blastos folyamat komplett remissziója után a Ph kromoszóma nem volt kimutatható a csontvelőben, chronicus fázisnak megfelelő klinikai és perifériás cytologiai kép nem alakult ki, a betegség feltehetően *de novo* Ph+ ALL-nek felelt meg. Ha ezen betegeknél parciális remisszió volt csak elérhető, akkor a csontvelői blast valamint Ph+ metafázis arány korrelált egymással. Az a feltételezés alakult ki ezen az alapon, hogy a chronicus fázisba konvertálódó és nem konvertálódó Ph+ ALL különböznek a haemopoiesis azon szintjében, ahol a genetikai aberráció és a következményes klonális proliferáció kialakulnak (5). Ez a kérdéskör, azonban, ellentmondásos annak a 9 közleményben bemutatott összesen 43 Ph+ ALL beteg tanulmányozása alapján, ahol a haemopoetikus sejtvonalak Ph kromoszóma érintettségét vizsgálták (1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Többsejtvonalú ('multilineage') illetve lymphoid vonalra korlátozott Ph pozitív ALL egyaránt szerepelt az esetek között, az előbbi el nem kötelezett őssejt (uncommitted stem cell, UCSC), az utóbbi lymphoid elkötelezett őssejt (lymphoid committed stem cell, LCSC) eredetre utalt. *Schenk és mtsai (1998)* ezen vizsgálatok közül a legutóbbiként valamint addig a legnagyobb beteganyag feldolgozása alapján azt közölték, hogy a Ph+ *de novo* ALL mindegyike többsejtvonalú és ezért UCSC eredetű betegség (15). Legújabban a kérdéskört, *de novo* Ph+ ALL és CML-LBC differenciálhatóságát, aCGH (array Comparative Genomic Hybridization) módszerrel is vizsgálták (16).

Annak érdekében, hogy további – a therápia szempontjából is lényeges – információkat nyerjünk ezen ellentmondásos témakörben, 17 Ph⁺ ALL beteg sejtvonal specifikus kromoszómális aberrációját kombinált fény- és fluoreszcens mikroszkópos képanalizálással, a morfológia és az interfázis citogenetika szuperponálásával vizsgáltuk. Ezen technológia alkalmazásával a témakört sejtvonal eredet szempontjából vizsgáló addigi legutóbbi valamint legnagyobb tanulmánnyal (15) ellentétes eredményt kaptunk.

3.3.1.a.2. Az essentialis thrombocythaemia (ET) eredeti, a Polycythaemia Vera Study Group (PVSG) által meghatározott kritérium rendszerében a Ph kromoszóma hiánya szerepelt, de ebbe később az átdolgozás során a bcr-abl átrendeződés hiánya is bekerült (17, 18). A 80-as évek végén, a 90-es évek elején, azonban, olyan Ph⁺ ET-nek nevezett, Ph⁺ betegekről számoltak be közlemények, akik ezen genetikai abnormalitáson kívül egyébként mindenben megfeleltek ET-nek és az anaemia, a splenomegalia, a leukocytosis hiánya valamint normál neutrophil alkalikus phosphatase (NAP) szint jellemezte őket (19, 20, 21, 22). Bár ez a klinikai kép több szempontban is különbözött klasszikus ET-től illetve CML-től is, de az utóbbira mégis sokkal jobban hasonlított, mivel ez is blastos crisis-be (BC) torkollott. A mai általános vélemény szerint ez az entitás ET-ként kezdődő CML variánsnak felel meg. Később az essentialis thrombocythaemia újabb variánsa, az ún. bcr⁺ ET került leírásra. Ezek a betegek Ph negatívak voltak, de bcr-abl átrendeződést kellett hordozzanak, mivel molekuláris technikákkal kimutatható volt a bcr-abl kiméra mRNS expresszió (23, 24). Egy tanulmány szerint 40 ET beteg 48%-a esett ebbe a kategóriába, míg mások ettől jelentősen eltérő incidenciát (13.3%, 6.4%, 5%, <1%, 0%) közöltek (25, 26, 27, 28, 29, 30). Egy tanulmány szerint, azonban, a bcr⁺ ET-ben a kiméra transzkript expresszió mértéke a tipusos CML-hez viszonyítva 3-4 nagyságrenddel alacsonyabb (26). Az ellentmondás nem csak az előfordulási gyakoriságra, hanem a klinikopathologiai besorolásra – nevezetesen, hogy a folyamatot variáns ET-nek vagy thrombocytosisal kezdődő CML-nek kell tartani – is vonatkozott. A bcr⁺ thrombocytosis nem különbözött szignifikánsan a CML chronicus fázis thrombocytosisal (CML-CP-T) állapottól, de női túlsúly, splenomegália hiánya, < 40 G/l fehérvérsejt szám, a basophilia és az éretlen myeloid elemek valamint a csontvelői myeloid / megakaryocita hyperplasia hiánya, ritka blastos transzformáció, megtartott vagy fokozott neutrophil alkalikus foszfatáz (NAP) értékek voltak jellemzőbbek (31). A bcr-abl expresszió mellett a JAK-2 tirozin kináz mutáció vizsgálata az átfedő jellegű kórképek besorolását nem segítette, ellenben a pathogenetikai komplexitást tovább fokozta (32, 33, 34).

Ezen ellentmondások miatt egy tanulmányt kezdeményeztünk, mely 64 konzekutív, minden klinikai és laboratóriumi kritérium szerint ET-nek megfelelő betegre terjedt ki. A 64-ből 4 bcr⁺-nak, kettő Ph⁺-nak bizonyult. Molekuláris vizsgálatok szerint a bcr⁺ ET el nem kötelezett összejt (UCSC) eredetű betegség. A csontvelő morfológiai vizsgálata szerint a bcr⁺-ET nem különböztethető meg a típusos ET-től, míg a Ph⁺ ET ezen paraméterek alapján sokkal jobban hasonlít a CML típusú myeloproliferációra.

3.3.1.b. Eredmények

3.3.1.b.1. Hat pALL és 11 aALL-es beteget vizsgáltunk, akiknek megelőzően fennálló, chronicus myeloproliferatív típusú kórfolyamatra utaló adata nem volt. A betegek adatait a **3.3.1.1. táblázat** mutatja. A 17-ből 14 'common' típusú ALL-nek (cALL) felelt meg, a maradék 3 csak CD19 és CD34 markerekre volt pozitív. Mindegyik beteg perifériás vérsejtjeiben bcr-abl típusú transzlokáció volt kimutatható iFISH technikával. AZ RT-PCR vizsgálat 9 betegben (4 pALL és 5 aALL) az m-bcr, míg 8 betegben (2 pALL, 6 aALL) az M-bcr típusú kiméra expressziót illetve átrendeződést mutatta ki.

3.3.1.1. táblázat 17 Ph⁺ ALL-es beteg fenotípus, genotípus és sejtvonal specifikus genetikai adatai (35).

Beteg sorszám	Kor/Nem	Fenotípus	Philadelphia típusa	Blast ^d (%)	Ph-FISH ⁺ sejt (%)	Ph-FISH ⁺ Blast/ Egyéb sejt/szám
1	68/N ^a	CD19 ⁺ , 34 ⁺	m-bcr	89	87	134/0
2	23/F ^b	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	65	70	104/1
3	19/N ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	M-bcr	77	79	117/0
4	54/F ^b	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	41	38	60/2
5	39/F ^c	CD19 ⁺ , 34 ⁺	M-bcr	83	96	122/22
6	72/F ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	M-bcr	60	56	88/1
7	56/N ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	73	57	80/3
8	59/F ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	62	63	93/2
9	19/N ^b	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	M-bcr	31	31	17/0
10	71/N ^c	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	M-bcr	32	60	48/41
11	56/F ^c	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ^{+/+}	M-bcr	31	68	41/63
12	10/F ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	95	92	133/2
13	5/F ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	M-bcr	17	12	18/0
14	2/F ^b	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ^{+/+}	M-bcr	43	45	66/1
15	9/F ^b	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	88	54	81/2
16	8/N ^b	CD19 ⁺ , 34 ⁺	m-bcr	87	75	107/3
17	3/F ^a	CD10 ⁺ ,19 ⁺ ,34 ⁺	m-bcr	59	65	96/2

a Remisszió Ø, az indukciós kezelés korai fázisában halál következett be;

b Citológiai és citogenetikai remisszió következett be;

c Citogenetikai remisszió nem, csak citológiai következett be

d Flow citometriával nyert adat

F férfi

N nő

A flow citometriás CD45 vs SSC kapuzás valamint a CD10 és CD34 pozitivitás alapján a blastok aránya 31–95% közé esett. Ugyanezt az értéket adta jó közelítéssel a FISH pozitív vörsejtek aránya az egyes betegekben három beteg (N° 5, 10 és 11) kivételével, ahol a Ph⁺ sejtek aránya 13-, 28- illetve 37%-kal meghaladta a citometriával kapott blast számot. Kombinált fény és fluoreszcens mikroszkópos kénanalizist végeztünk mintánként mintegy 150, átlagosan 40 nem blast típusú sejtet is magában foglaló sejten. A fúziós szignál nem volt kimutatható vagy csak nagyon alacsony arányban volt jelen 14 beteg érettebb myeloid sejteket, lymphocytákat valamint erythroblastokat magába foglaló nem-blast populációiban (3.3.1.1. *ábra*). Ezek a ritka események a fals pozitivitás, tehát az aspecifikus háttér szintjét nem haladták meg. Az 5., 10. valamint a 11. számú betegben, azonban, a nem blast populáció 28 sejtjéből 22-ben, 101-ből 41-ben illetve 112-ből 63-ban bcr-abl átrendeződés (transzlokáció) volt kimutatható. Az 1., 3., 6., 7., 8., 12., 13. és 17. számú beteg esetében követéses adatok nem álltak rendelkezésre, mivel ezek a betegek az indukciós terápia korai szakában meghaltak. A 2., 4., 9., 14., 15. és 16. számú betegeknél citológiai és citogenetikai remissziót sikerült elérni, melynek során a blastok valamint a FISH pozitív sejtek aránya párhuzamosan csökkent. Az 5., 10. és 11. számú betegnél az akut betegség szempontjából citológiai remisszió alakult ki, de a Ph pozitív sejtek aránya magas maradt (38%- 81%) és a perifériás citológia chronicus myeloproliferatív típusúvá vált. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy 3 beteg kivételével a Ph⁺ ALL a lymphoid őssejt kompartmentre korlátozódott, míg a 3 betegben a többsejtvonalas Ph kromoszóma érintettség azt bizonyította, hogy a folyamat valójában klinikailag nem ismert chronicus fázisú CML LBC-nek felelt meg. A 3.3.1.2. *táblázat* foglalja össze az irodalomban ismereteink szerint eddig közölt, sejtvonal érintettség szintjén vizsgált Ph⁺ ALL betegek adatait, a sejtvonal érintettséget, az ennek vizsgálatára felhasznált módszert és a transzlokáció típusát (ha az adatok rendelkezésre álltak). Ez az áttekintés némileg eltér egy közelmúltban publikált adattól (15).

3.3.1.2. Táblázat Az irodalomban közölt Ph⁺ betegek sejtvonal érintettségi adatai (35).

	Esetszám		Vizsgálati eljárás
	Lymphoid sejt restriktió	Elkötelezetlen összejt eredet	
Abe (1985) ⁷ 1 aALL	1		in vitro kolóniák CCA
Tachibana (1987) ⁸ 2 pALL		2	in vitro kolóniák CCA
Kitano (1988) ⁹ 3 aALL	3		in vitro kolóniák CCA
Secker-Walker (1988) ¹⁰ aALL	4 (M-bcr)	1 ^a (M-bcr)	sejt szeparálás Southern blot
Kalousek (1988) ¹¹ 5 aALL	1	4	in vitro kolóniák CCA
Dow (1989) ¹² 4 pALL	2 (p185+)	2 (1 p185+, 1 NA)	in vitro kolóniák CCA
Craig (1990) ¹³ 2 aALL	2 (1 M-bcr, 1 m-bcr)		sejt szeparálás Southern blot
Secker-Walker (1993) ¹ aALL	2 (1 m-bcr, 1 M-bcr)	2 (M-bcr)	sejt szeparálás Southern blot
Anastasi (1996) ¹⁴ 3 pALL 5 aALL	4 (m-bcr) (1 pALL, 3 aALL)	4 ^b (M-bcr) 2 pALL, 2 aALL	morfológia FISH
Schenk (1998) ¹⁵ 9 aALL		9 (5 m-bcr, 4 M-bcr)	sejt szeparálás FISH
Összesen	19	24 ^c	

^aKrónikus fázisba konvertált.^bDiagnóziskor CGL morfológiai jeleit mutató, több sejtvonalú betegség és/vagy kezelést követően CGL krónikus fázisba konvertálódott, mely miatt a szerzők LBC-ként kezdődő CGL-nek minősítették.^cA CGL-LBC-nek tartott 5 beteget is magában foglalja (l. a+b pont).

NA: nincs adat

3.3.1.b.2. Tanulmányunk másik részét képező 64 beteg közül, akik klinikai és pathológiai leleteik és a PVSG kritériumai szerint megfeleltek ET-nek, 6 beteg vérsejtjeiben észleltünk RT-PCR eljárással bcr-abl kiméra mRNS expressziót. A hat beteg klinikai, laboratóriumi és molekuláris adatait a 3.3.1.3. táblázat foglalja össze. A hat betegből négyben a perifériás vérsejtekben bcr-abl átrendeződést iFISH eljárással kimutatni nem lehetett. Meglepetésre, ezen négy betegből az egyikben a konvencionális metafázis citogenetikai vizsgálat 50 metafázisból 1-ben egyértelmű Ph kromoszómát írt le. Ennek ellenére ez a négy beteg egy, a bcr⁺-ET csoportba került a további analízisek során, mivel a perifériás vérsejtek Ph negativitása valamint a mindössze 2%-os csontvelői Ph pozitivitás messze a típusos Ph⁺ CMPD-re jellemző tartományon kívül esik (ahol a haemopoiesis nagyobb részét a Ph⁺ klón uralja). A hat betegből fennmaradó kettőben a csontvelői metafázisok (56% és 80%) és a perifériás vérsejtek (48% illetve 83%) jelentős aránya bizonyult Ph pozitívnak konvencionális

metafázis analízissel illetve iFISH-sel. Ezt a két beteget Ph^+ -ET betegként azonosítottuk. A 6-ból 5 betegben a bcr-abl kiméra mRNS b3/a2, míg 1 betegben a b2/a2 típusát detektáltuk.

3.3.1.3. táblázat A kettő Ph^+ és négy bcr+ ET beteg klinikai, laboratóriumi és molekuláris adatai (36).

Betegek	1. Kor/Nem	Thrombocyta	NAP ¹	RT-	iFISH	CCA	Követés
1.	63/nő	800	261	+b3/a2	-	-	64
2.	44/nő	1016	228	+b3/a2	-	-	63
3.	71/nő	2520	229	+b3/a2	+48	56%	†
4.	29/nő	716	276	+b3/a2	-	2%	52
5.	77/nő	2273	211	+b3/a2	+83%	80%	n.a.
6.	54/férfi	965	249	+b2/a2	-	-	28

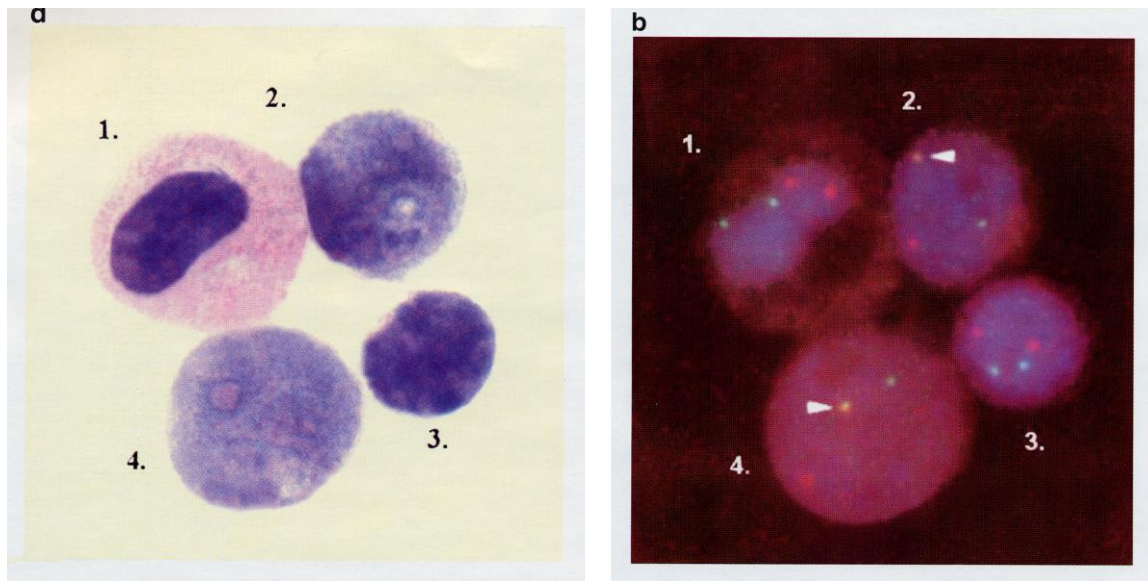
¹ normál tartomány: 260±36)

n.a. nincs adat

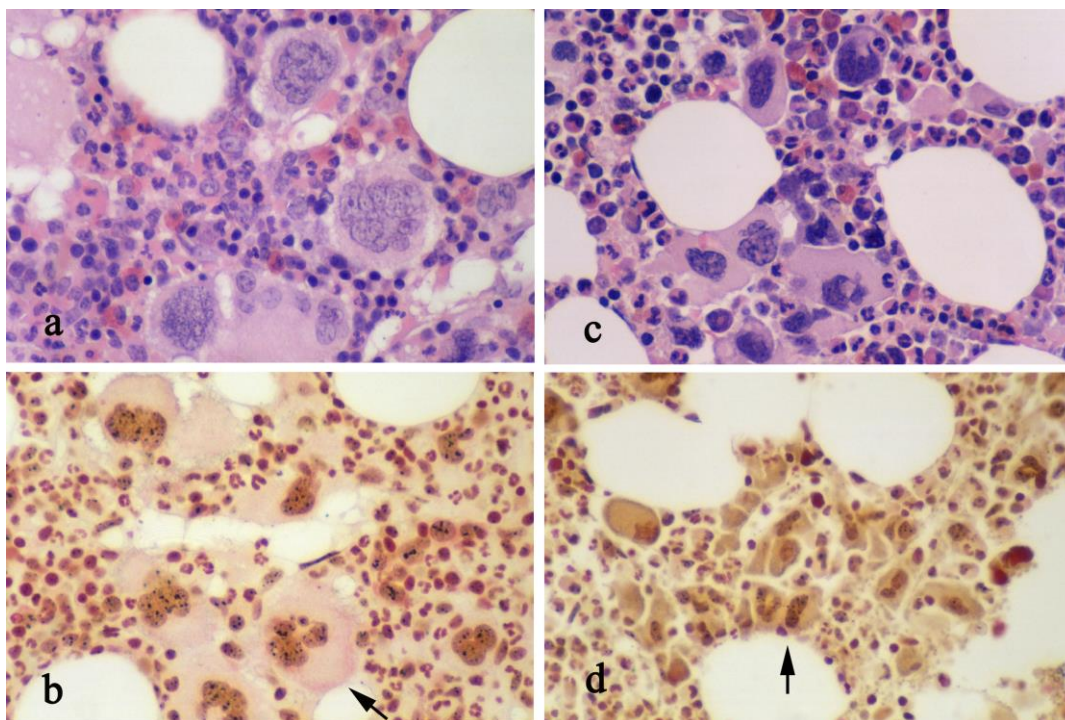
† a 32. hónapban CML-BC-ben meghalt

A nő/férfi arány 5/1 volt, a thrombocyta szám 716 G/l és 2 273 G/l (átlag: 1 382 G/l) között, míg a fehérvérsejtszám 7.8 G/l és 23.8 G/l (átlag: 14.2 G/l) között mozgott. Fontos tényező, hogy a hat beteg közül egyben sem észleltünk a perifériás vérben éretlen myeloid elemeket, a NAP index a kontrol szintjén mozgott, mérsékelt eosinophila (4% - 8%) volt megfigyelhető 2 betegnél (1. és 2. sz. beteg), basophilia (10%) egy betegnél (3.sz. beteg) és splenomegalia (kisebb, mint 3 cm) ugyancsak 1 betegnél (4. sz. beteg). Az átlagosan 57 hónapos (tartomány 33–69 hó) követés alatt egyik bcr⁺-ET beteg sem mutatott típusos CML irányú progressziót (akceleráció vagy blastos crisis). A 3. sz. beteg észlelése 32. hónapjában blastos crisisben meghalt, az 5. sz. betegről nem áll rendelkezésre követési adat.

A crista biopsiák alapján a csontvelő morfológia mind a hat esetben támogatta ET diagnózisát, a cellularitás normál / enyhén fokozott volt. A morfológiai képet a megakaryocytosis uralta, de a differenciálódó myeloid vs erythroid vonalak aránya nagyrészt megtartott volt (3.3.1.2. ábra). A csontvelői morfológia pontosabb megítélése érdekében a csontvelői cellularitást, a megakaryocyták méretét valamint celluláris aktivitását morфомetriai eszközökkel mértük és kvantitativ indexekkel jellemeztük. Ennek során először a bcr⁺ ET betegeket (1., 2., 4. és 6. sz. beteg) hasonlítottuk össze típusos, kontrol ET illetve CML betegekkal (3.3.1.4. táblázat). A típusos ET betegek mindhárom paraméterben szignifikánsan ($p < 0.001$) különböztek a típusos CML-től, i.e., az ET-ben a cellularitás jelentősen kisebb, a megakaryocyták mérete és celluláris aktivitása jelentősen nagyobb volt. A bcr⁺-ET csoport a CML-lel összehasonlítva szignifikánsan ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.05$) kisebb csontvelői cellularitást valamint nagyobb megakaryocytá méretet és – a NOR area/mag index alapján – aktivitást mutatott, de az első két paraméterben nem különbözött a típusos ET-től.



3.3.1.1. ábra a érett myeloid sejt (1), reaktív lymphocyta (3) valamint két lymphoblast (2, 4) fénymikroszkópos képe, HE festés, x 1250; b ugyanezen sejtekben a bcr (zöld) és az abl (piros) FISH jelek. Csak a lymphoblastok tartalmazznak bcr-abl átrendeződésre utaló sárga fúziós jelet, fluoreszcens mikroszkópos üzemmód, x 1250 (35).



3.3.1.2. ábra A bcr+ (a + b, 1. sz. beteg) valamint a Ph+ (c + d, 3. sz. beteg) ET csontvelői morfológiája. A nagyméretű, ezüstöződő NOR régiót mutató, nagy - polylobált maggal bíró megakaryocyták jellemzők az 1. sz. beteg csontvelőjében, míg a sokkal kisebb, gyakran mononuclearis és sokkal kisebb ezüstöződő NOR-t tartalmazó megakaryocyták a másik esetben. a + c HE festés, x 400; b + d Ag-NOR festés, x 400 (36).

A total NOR area/nucleus index a bcr⁺ ET betegekben szignifikánsan ($p < 0.01$) kisebb volt, mint a típusos ET betegeké, de még ugyancsak szignifikánsan nagyobb ($p < 0.05$), mint ugyanezen paraméter a típusos CML betegekben.

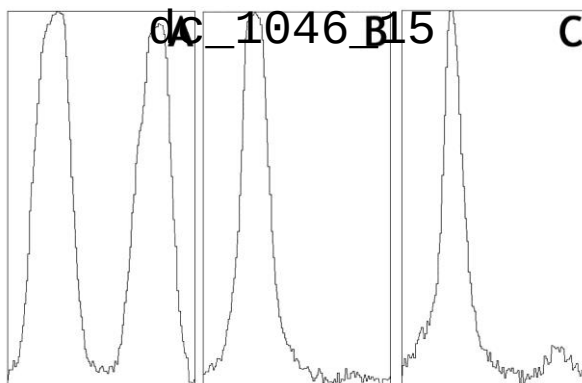
3.3.1.4. Táblázat A négy bcr⁺ ET beteg csontvelő morfológiai adatai (36).

		1. bcr⁺ET	2. Ph⁺,bcr⁺ET	3. ET	4. CML
A.	Cellularitás* (%)	23.39±6.44	19.21±9.67	19.67±5.64	1.96±1.01
B.	Megakaryocita méret (μm ² ±SD)	945.72±243.81	788.76±308.68	1017.15±179.73	480.23±28.24
C.	NOR area/nucleus (μm ²)	11.89±1.11	10.91±1.75	19.59±4.66	6.96±2.94

*az adatok a nem specifikus parenchyma arányát adják meg átlag ± S.D-ben

Ha a bcr⁺-ET csoportot kombináltuk a két Ph⁺-ET beteggel (3. és 5.sz. beteg), akkor a cellularitási index statisztikai összehasonlítása nem mutatott változást a három csoport között (bcr⁺-ET vs ET vs CML illetve bcr⁺-ET/Ph⁺-ET vs ET vs CML). Azonban a megakaryocita méret a bcr⁺-ET/Ph⁺-ET csoportban szignifikánsan ($p < 0.05$) kisebb volt, mint a típusos ET betegekben, továbbá a total NOR area/nucleus paraméterben nem lehetett már szignifikáns különbséget kimutatni a bcr⁺-ET/Ph⁺-ET csoport és a típusos CML között. Ez azt jelenti, hogy a Ph⁺-ET betegek összevonása a bcr⁺-ET betegekkel a csontvelő morfológiát – kvantitatív paraméterek alapján – típusos CML irányába tolta el, tehát a Ph⁺-ET – legalábbis két csontvelői morfológiai paraméter alapján – jóval közelebb áll a típusos CML-hez, mint a bcr⁺-ET-hez illetve a típusos ET-hez.

Perifériás vér és csontvelő minták szortírozott myeloid és lymphoid sejtpreparátumai a 4 bcr⁺-ET betegből 3 női betegnél álltak rendelkezésre. Mintegy 50%-os allél reprezentáció mellett mindhárom betegben allelikus polimorfizmus állt fenn a humán androgén receptor génben előforduló (CAG)_n trinukleotid repetitív régióban. Az X-kromoszóma inaktivitási teszt (HUMARA) monoklonalitást mutatott a vér ill. csontvelő mintákban mindhárom beteg myeloid valamint lymphoid populációjában egyaránt (3.3.1.3. ábra).



3.3.1.3. ábra A HUMARA PCR teszt gél elektroforetikus képének denzitometriás analízise. A emésztetlen lymphoid, B és C HpaII + HhaI metiláció szenzitív restrikciós endonukleázokkal emésztett, lymphoid és myeloid sejtekből nyert DNS-ből származó minta. Az egyik allél emésztésre bekövetkező eltűnése monoklonalításra utal. Ugyanazon allél hiányzik a lymphoid valamint a myeloid sejtpopulációban (36).

3.3.1.c. Diszkusszió

3.3.1.c.1. A Ph^+ ALL valamint a chronicus myeloid leukaemia (CML) lymphoblastos crisis (LBC) pathogenetikai kapcsolata azóta képezi vita tárgyát, mióta az első entitást *Propp és Lizzi*, 1970-ben leírta (37). CMPB-hez vagy myeloproliferatív szindrómához (MDS) kapcsolódó AL közötti kapcsolat megítélése kombinált egysejtes módszerek nélkül pathogenetikai, diagnosztikai és terápiás probléma (38). A CML-LBC nehezen különíthető el a *de novo* Ph^+

ALL-től. Az utóbbi fennálltát a következő jellegzetességek támogatják: *i.)* a blastos, Ph^+ klónon kívüli, normális kromoszóma garnitúrával rendelkező vérsejtek (melyet azonban csak speciális körülmények között és technikával lehet felismerni), *ii.)* klinikailag ismert chronicus fázis hiánya, *iii.)* a klonális evolúció magasabb incidenciája a diagnosziskor, i.e., a Ph kromoszómán kívüli, nagyobb számú addicionális citogenetikai abnormalitás jelenléte (1). Ugyancsak régóta ismert, hogy a Ph^+ ALL-ek egy része az indukciót követő remisszió elérése után chronicus fázisba konvertálódik, és amelyeknél ez a jelenség nem észlelhető, a blastos sejtarány proporcionálisan változik a csontvelői, Ph^+ metafázisok számával (5). Egyes molekuláris tanulmányok szerint a Ph transzlokáció ALL-ben egy 190 kD molsúlyú bcr-abl proteint eredményez, mely más, mint a Ph^+ CML-ben és ennek lymphoblastos crisisében észlelhető 210 kD molsúlyú bcr-abl protein (39, 40). Ennek alapján azt feltételezték, hogy az M-bcr típusú transzlokációt mutató Ph^+ ALL az el nem kötelezett őssejt (UCSC) eredetű CML-LBC-nek, míg az m-bcr típusú Ph^+ transzlokációt hordozó acut leukaemia lymphoid őssejt (LSC) eredetű *de novo* ALL-nek felel meg. Későbbi tanulmányok azonban kimutatták, hogy mindkét transzlokáció típus előfordul *de novo* ALL-ben, de a gyermekkori formában masszív m-bcr túlsúly észlelhető (41, 42, 43). Továbbá, alacsony mennyiségben CML-ben is jelen van a 190 kD bcr-abl protein, az esetek 90%-ában alternatív splicing eredményeként (4).

A látszólag *de novo* Ph⁺ ALL-ben két prognosztikai csoport különíthető el, az egyiket 35–47 hónap, a másikat mindössze 4–8 hónap túlélés jellemzi **(1, 14)**. A prognosztikai csoportok valamint a transzlokáció típusa között nem lehetett összefüggést kimutatni, ezért a kiindulási sejttípus valamint a haemopoetikus sejtvonalak involváltsága alapján próbálták megmagyarázni a prognosztikai heterogenitást **(44, 45)**. Ennek alapján feltételezték, hogy a hosszabb túlélésű, jobb prognózisú Ph⁺ ALL betegek többsejtvonal érintettséget (és UCSC eredetet), míg a rossz prognózisúak lymphoid sejtvonal restrikciót (és LSC eredetet) mutatnak. *Anastasi és mtsai (1996)* saját betegek valamint az irodalomban közölt esetek áttanulmányozása után arra a következtetésre jutott, hogy a többsejtvonalú betegség valójában elsőként LBC-ben megnyilvánuló CML-nek felel meg **(14)**. Az irodalomban 43, sejtvonal érintettségre vizsgált Ph⁺ ALL-t ismerünk, de ebből később – a chronicus fázisba történő konverzió miatt – 5 CML-LBC-nek bizonyult **(7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)**. Ezen esetekben a sejtvonal érintettséget *in vitro* kolóniákkal, konvencionális citogenetikával, sejtszeparálást követő Southern blot vagy FISH eljárással valamint morfológia és FISH felhasználásával vizsgálták. Ha a fenti 5 betegtől eltekintünk, akkor a maradék 38 Ph⁺ ALL beteg pontosan 50 – 50%-a UCSC illetve LSC eredetű – a publikált adatok összesítése alapján. 26 esetben a transzlokáció típusát is vizsgálták. A pALL csoportban nem volt M-bcr típusú átrendeződés egyik sejtvonal csoportban sem, míg mindkét transzlokáció típus előfordult mindkét sejtvonal csoportban az aALL-ek körében. Ha ezt a kollekciót valamint a sejtvonal érintettség szerint megegyező betegszámot nézzük, feltűnő, hogy a legnagyobb szériát vizsgáló tanulmányok egymásnak ellentmondóak, valamint, hogy – pusztán statisztikai alapon – a kétfajta sejtvonal érintettség szerinti egyenlő eloszlás nem tükröződik ezekben a 9 vs 17 (jelen tanulmány), 8 ill. 5 beteget vizsgáló tanulmányokban **(10, 14, 15)**. Pontosán, a három utóbbi tanulmány azt bizonyította, hogy a Ph⁺ ALL lymphoid őssejt eredetű folyamat, hacsak a betegség a remisszió után nem konvertálódik chronicus fázisba. Ez ellentmond a hivatkozott első tanulmánynak, ahol minden egyes esetben többsejtvonal érintettséget bizonyítottak. Magyarázatként technikai problémák, a frakcionált sejtpopulációkban molekuláris technikákkal amplifikált minor kontamináció lehetőségbe merül fel. Továbbá, ha a beteg a korai remisszió indukció periódusában meghal, vagy az első komplett remisszió idején allogén csontvelő transzplantáció történik, klinikailag lehetetlen megállapítani, hogy a betegség valódi *de novo* folyamat vagy ismeretlen CML LBC-e volt. Ez volt a helyzet 17 betegünkől 8 esetében, de mindegyik lymphoid sejtvonal restrikciót mutatott, tehát a betegség *de novo* természete nem lehetett kérdéses.

Konklúzió:

2. Jelen tanulmány vizsgálta az irodalomban legnagyobb Ph⁺ ALL beteganyagot kombinált morfológia és FISH technikával, mely véleményünk szerint a sejtvonal érintettség megítélésére a legpontosabb eljárás. Az eljárásnak azért van különös jelentősége, mivel *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 IKZF1 gén lokuszok valamint a 14q32 régióban az IgH és TCR lokuszok veszteségei (**46, 47, 48.**).
3. 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 Ph⁺ ALL (**1**) létezésére nem találtunk bizonyítékot.
4. Tanulmányunk összhangban van *Anastasi és mtsai (1996)*(**14**) 8 betegen, hasonló methodológiával végzett vizsgálatainak eredményével, de jelen tanulmány töréspont heterogenitást is kimutatott a LSC eredetű Ph⁺ ALL-ben.
5. A prognózis és a kezelési stratégia a CML-LBC-ben valamint a *de novo* Ph⁺ ALL-ben még a tirozin kináz gátlók korszakában is eltérő, ezért a sejtvonal érintettség korrekt vizsgálata fontos és a rutin diagnosztikai procedúra része kell legyen.
6. 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 leírt egyedi veszteségek alapján lehetségesnek látszik (**48**). Ennek alapján a Ph⁺ *de novo* AML a jövőbeni WHO klasszifikációkban külön entitásként szerepelhet.

3.3.1.c.2. Az ET valamint a CML diagnosztikus kritériumait a PVSG és legújabban a WHO 'Classification of Neoplastic Diseases of the Haematopoietic Tissues' rögzíti (**18, 33**). A két betegség klinikopathológiai jellemzői általában jól elkülönülnek. A típusos ET-t az izolált, extrém thrombocytosis, az enyhe leukocytosis és basophilia vagy ezek hiánya, megtartott NAP aktivitás, a hepato-splenomegalia hiánya, női túlsúly és kiváló prognózis jellemzik (**49, 50**). A csontvelő morfológiát az enyhe–extrém, diffúz vagy csoportképződést mutató, megnagyobbodott és hyperlobulált megakaryocytákból felépülő megakaryocytosis jellemzi, általában a cellularitás szignifikáns növekedése és más sejtvonalak morfológiai eltérései nélkül (**51**). Ellenkezőleg, a CML-t a periférián az egész myeloid vonalat involváló jelentős leukocytosis, az érett granulocytákban a NAP aktivitás csökkenése vagy hiánya, hepato-splenomegalia, enyhe férfi túlsúly és acceleratio ill. terminális blastos crisis irányú progresszió jellemzik. A csontvelő morfológiát a proliferatív, masszív, differenciálódó

myeloid túlsúlyt mutató velőállomány dominálja, megakaryocytosis vagy anélkül. A megakaryocyták azonban jellegzetesen kicsik (u.n. CML megakaryocyták) (51). A genetikai kritériumok ugyancsak meghatározottak. Az ET Ph kromoszóma és bcr/abl átrendeződés negatív, míg CML-ben a Ph és bcr-abl expresszió kimutathatósága a diagnózis *sine qua non*-ját képezik (18, 37). A szigorú diagnosztikus kritériumok ellenére létezik 'szürke zóna' az ET és a CML között, melyet Ph⁺ ET illetve bcr⁺ ET állapotként/betegségként írtak le. Az elsőt ET-ként kezdődő CML-nek is nevezik, mivel bizonyos idő – néha évek – múltán a betegség típusos CML irányba progrediál és végül blastos crisis fejlődik ki (19, 22, 52). A bcr⁺ ET azonban – incidenciáját, prognózisát és klasszifikációját illetően – sokkal ellentmondásosabb kórállapot. Egyes kutatók a CML egy klinikai variánsának tekintik, míg mások ezzel határozottan nem értenek egyet (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31).

A PTE Pathológiai Intézetében egy periódusban egymást követően diagnosztizált 64 ET beteg között 4 bcr⁺ esetet (6.3%) találtunk. Ez az incidencia sokkal közelebb van ahhoz az értékhez (5%), amit egy tanulmányban 20 ET beteg között észleltek, de jelentősen különbözik attól a magas incidenciától (48%), amit egy másik publikációban 40 ET beteg vizsgálata alapján közöltek (24, 25). Ezen betegek az átlagosan 57 hónapos követési idő alatt CML irányú progressziót, acceleratiót vagy blastos crisist nem mutattak. Ez összhangban van azon közölt adatokkal, miszerint nincs bizonyíték arra – egy beteg kivételével, akinél a betegség kezdete után 12 évvel akut leukaemia alakult ki, – hogy a bcr⁺ ET betegekben blastos crisis alakulna ki (28, 53). Jelentős női túlsúlyt észleltünk, mely arra utal, hogy ez nem csak az ET kezdetű CML-t, de a bcr⁺ ET-t is jellemzi. A b3/a2 bcr-abl transzkript dominált, mind a Ph⁺, mind a bcr⁺ ET-ben, mely közölt adatokkal összhangban van (24, 54). A csontvelő morfológia kvantitativ jellemzésére 3 paramétert használtunk. Kettő ezek közül, a cellularitás és a megakaryocyták mérete, már kvalitatív morfológiai megítélés alapján is jól tudottan jelentősen különbözik típusos CML-ben illetve ET-ben. Feltételeztük továbbá, hogy az extrém thrombocytosis jellemzett ET a total NOR area/nucleus paraméterrel leírt celluláris megakaryocyták aktivitásában is különbözik a típusos CML-től (55, 56). Dokumentált, hogy a bcr⁺ vs bcr⁻ thrombocythaemiák között szignifikáns különbségek állnak fenn a thrombocyták méretében és reaktivitásában is, az utóbbi csoport javára (57). Valóban, mindhárom paraméterben az ET és a CML szignifikánsan különbözött, azaz, a cellularitás alacsonyabb, a megakaryocyták nagyobbak és aktívabbak ET-ben. Az a tény, hogy a csontvelő cellularitásában és a megakaryocyták méretében a bcr⁺ ET a típusos ET-től nem, míg a CML-től mindhárom paraméterben szignifikánsan különbözik arra utal, hogy a bcr⁺ ET csontvelő morfológiája jelentősen eltér CML-től és nagyon hasonló típusos ET-hez, valamint

mindkettővel megegyezően el nem kötelezett összejt szintű betegség (58). Továbbá, a Ph⁺ ET és a bcr⁺ ET betegek adatainak összevonása az ET-hez képest a megakaryocyták méretének szignifikáns csökkenését valamint a megakaryocyták aktivitásának a típusos CML-lel szemben fennálló szignifikáns különbsége eltűnését eredményezte, mely azt jelenti, hogy a Ph⁺ ET betegek kvantitativ indexek által jellemzett csontvelő morfológiája sokkal inkább CML, mint ET típusú. Ez lehetett az az állapot, melyet a myeloproliferatív betegségek egy korábbi klasszifikációjában 'borderline' CML-ET-ként írtak le (59). Következtetéseink:

1. Egy tanulmány keretében – ismereteink szerint – az irodalomban közölt legnagyobb számú ET beteg molekuláris és a csontvelő morfológiájának kvantitativ jellemzését végeztük el.
2. Az egyébként az ET kritériumait kielégítő bcr⁺ ET incidenciája nagyon alacsony.
3. Bár a bcr⁺ ET és a CML is el nem kötelezett összejt eredetű, adataink nem utalnak arra, hogy az előbbi a CML form fruste állapota lenne, sokkal inkább az ET egy variánsa.
4. 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 elsőben is, van egy Ph kromoszóma pozitív klón. Alapos okunk van feltételezni, hogy ezen klón expanziójának mértékében mutatkozó különbség többé-kevésbé elkülönülő kliniko-pathologiai entitásokat eredményez, mely a csontvelő morfológiában is követhető.
5. Valóban, egyre gyarapodik azon közlemények száma (~ 30 esetleírás), ahol a bcr-abl pozitivitás illetve a JAK2V617F mutáció egyidejű vagy egymást követő fennállását igazolták egy betegség lefolyása során (60). Kb 55%-ban a bcr-abl pozitivitás és CML-szerű kép volt a primér elváltozás. Ezek alapján fel kell tételezni, hogy több, mint egy genetikai mutáció is kialakulhat a csontvelőben a chronicus myeloproliferatív betegségekre predisponáló milliőben. Ezen szubklonális heterogenitás állapotban az egyik mutáció domináns ('driving'), de – például –therápia (Imatinib) indukálta szelekciós nyomás hatására az addig nyugvó ('dormant', 'passanger') mutáció 'driver'-ré alakulhat, mely új klinikai képet eredményez. Mindezt experimentális adatok is alátámasztják (47). JAK2V617F pozitív ET típusú, majd később bcr-abl⁺ CML típusú folyamattá transzformálódott betegségben a tumorsejtekből származó kolóniák in situ molekuláris vizsgálata dupla mutációt tartalmazó klónok mellett egyes genetikai hibát tartalmazó klónokat is azonosított. Ez a szubklonális heterogenitás profil azonban a tirozin kináz inhibitor (Dasatinib) illetve hidroxüreakezelést követő molekuláris remisszió során jelentősen megváltozott, a korábban nagy többséget képviselő dupla mutáns klónok eltűntek, csak mindkettőt külön-külön tartalmazók maradtak.

3.3.2. Ph+/bcr-abl átrendeződést mutató ritka kórképek

3.3.2. a. Bevezetés

3.3.2.a.1. A 9. és a 22. kromoszóma között kialakuló és egy kisméretű, ún. Philadelphia (Ph) kromoszómát eredményező kiegyensúlyozott transzlokáció az összejt eredetű klonális betegség, a chronicus myeloid leukaemia genetikai karakterisztikuma (**61, 62**). Az ennek nyomán kialakuló kiméra gén egy új – tirozin kináz aktivitással bíró p210 fehérjét kódoló – 8.2 kilobázis (kb) nagyságú bcr-abl mRNS expressziójához vezet (**63, 64**). A Ph pozitív CML betegek haemopoetikus sejtjei a Ph pozitivitás és a bcr-abl expresszió vonatkozásában azonban heterogének (**65**). Nem csupán a reziduális haemopoesist képviselő Ph kromoszómára és bcr-abl mRNS expresszióra negatív populáció létezik, de a haemopoetikus kolóniák változatos aránya mutathatja a Ph⁺, bcr-abl mRNS⁻ geno- és fenotípust (**66, 67, 68, 69, 70**). Ezen 'nyugvó' állapot (dormant state, silencing) jelentősége, méginkább pathomechanismusa nem ismert, de nyilvánvalóan komoly problémát jelent a terápia, beleértve a poszt-transzplantációs állapot monitorizálása valamint az autológ csontvelő transzplantációra felhasznált, RT-PCR által detektált kiméra mRNS expresszió alapján megítélt összejt kompartment szelekció területein.

Jelen tanulmányunkban egy olyan beteget írunk le (ld. 2.3.2.a.1. pont), akinek a klinikai és laboratóriumi adatai a betegség kezdetén CML-re nem voltak jellegzetesek, azonban a meta- illetve interfázis citogenetika Ph és bcr-abl átrendeződés pozitivitást mutatott ki, bcr-abl mRNS expresszió érzékeny RT-PCR eljárással viszont nem volt detektálható. A konstansan magas Ph⁺ vörsejtarány mellett a betegség idővel p210 mRNS pozitivitást mutatott, melyet csontvelői morfológia változása is kísért.

3.3.2.a.2. A különböző indolens B-sejtes malignus lymphomák (B-ML) chronicus myeloproliferatív betegségekkel (MPB) együtt is előfordulhatnak. Szórványos közlések szerint CMPB-vel, főként chronicus myeloid leukaemiával (CML) egy időben vagy azt követően is kialakulhat myeloma multiplex (MM), chronicus lymphoid leukaemia (CLL) vagy hajás sejtes leukaemia (HCL) (**71, 72, 73, 74, 75, 76**). A HCL ritka, elkülönülő klinikopathológiai entitás, mely a B-ML-nak mindössze 2%-át adja (**77**). Egyes publikációk szerint a második malignomák, nevezetesen a Hodgkin és non-Hodgkin lymphomák valamint a pajzsmirigy carcinoma, gyakorisága HCL-ben – különösen interferon kezelést követően – magasabb (**78, 79, 80**). Ph⁺ CML és HCL együttes előfordulását közlő esetekben a daganatok klonális kapcsolát nem vizsgálták (**81, 82, 83**). Ugyancsak nem áll rendelkezésre az irodalomban – ismereteink szerint – a MPB-gel vagy mellett kialakuló ML-k incidenciájára

vonatkozó adat. Egy ko-egzisztáló indolens B-ML diagnózisa – a MM-től eltekintve, ahol a könnyűlánc monoklonalitás immunhistológiával könnyen kimutatható – nem egyszerű feladat önmagában a crista biopsia histológiája alapján, mivel a különböző mértékű lymphocytás infiltrátum a MPB-k jól ismert jellegzetessége **(84)**. A paraffinos blokkból extrahált DNS-en elvégzett, az immunglobulin nehézlánc gén (IgH) átrendeződés kimutatására irányuló polimeráz láncreakció (PCR) hasznos eszköznek bizonyulhat, de a PCR eredmény interpretálása két okból is problémás lehet. Egyrészt, az ál-monoklonalitás az alacsony számú B-sejt klónt tartalmazó minták jól ismert sajátsága **(85, 86, 87)**, másrészt a MPB-eket el nem kötelezett (UCSC) eredetű folyamatoknak tartják általánosságban, mely azt is jelenti, hogy B-sejtjeiknek legalábbis egy része klonális **(88)**.

Annak érdekében, hogy a ko-egzisztáló B-ML incidenciájára valamint a molekuláris technikákkal kombinált histologia diagnosztikus kapacitására vonatkozóan adatokat kapjunk, 106 konzekutív MPB-ben szenvedő beteg valamint 40 B-ML-s és 50 más malignomában szenvedő beteg staging céljára vett crista biopsiás mintáit (lsd. 2.3.2.a.2. pont) vizsgáltuk rutin histopatológiai és IgH génátrendeződés PCR eljárásokkal. Vizsgálataink arra utalnak, hogy – morfológiai alapon nem feltétlenül felismerhetően – valódi monoklonális B-sejtes infiltrátum – klinikailag nem vagy manifeszt módon – előfordulhat MPB-ekben és ezek egy része klonális kapcsolatban is áll egymással.

3.3.2.b. Eredmények

3.3.2.b.1. A betegség kezdetén hepatosplenomegalia, leukocytosis és thrombocytosis uralta a klinikai – laboratóriumi képet (lsd. 2.3.2.a.1. pont; 3.3.2.1. táblázat) **(131)**.

Bár alacsony arányban előfordultak a periférián éretlen myeloid elemek és a myeloid differenciálódás zavarának morfológiai jelei, basophilia nem volt észlelhető és az alkalikus foszfatáz aktivitás nagyrészt megtartott volt. A csontvelő hisztológia megtartott erythropoesis mellett jelentős, éretlen–mononucleáris megakaryocytosis és differenciálódó myeloid vonalat tartalmazó proliferatív velőállományt mutatott **(3.3.2.1.a. ábra)**. A molekuláris vizsgálatok látszólag ellentmondó eredményeket adtak. Az RT-PCR eljárás sem p210, sem p190 típusú bcr-abl mRNS terméket nem mutatott ki a perifériás vérsejtekben, ugyanakkor ezen sejtelemek 86%-a iFISH módszerrel bcr-abl átrendeződésre pozitív volt **(3.3.2.2. ábra)**. Az M-bcr illetve m-bcr specifikus RT-PCR eljárásokat kétszer és két különböző primer szettel is megismételtük, de egyik teszt sem mutatott bcr-abl mRNS amplifikációt.

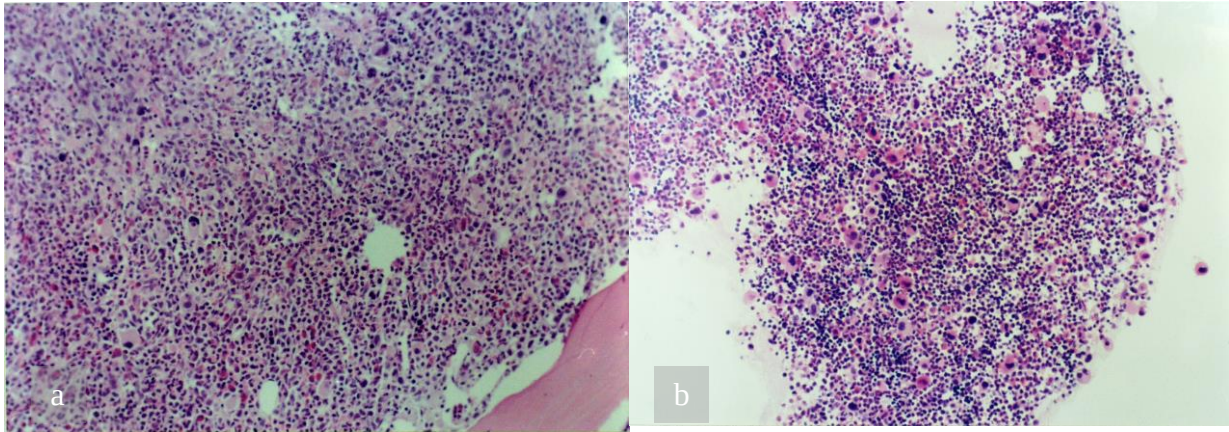
3.3.2.1. Táblázat A beteg 32 hónapos követése során nyert morfológiai, laboratóriumi és molekuláris leleteinek összefoglalása

Vizsgálatok sorszáma	FVS	THR	HTC	RT-PCR	Ph+ Sejtek (%) iFISH / CCA	Hisztológia/Citológia
1	43	685	42.0	Negatív	86 +/-n.a.	CMPB-CF GAPA: 250
2	25	613	33.0	b3/a2+	81+/-n.a.	CMPB-CF GAPA: 48 Fibrosis, 8% Bazophil
3	7	406	44.6	Negatív	57+/-n.a.	CMPB-CF
4	7	748	39.5	Negatív	90 +/-100	CMPB-CF
5	38	136	30.2	n.a.	95+/-n.a.	CMPB-BC CD13+, CD33+, CD34+, blastok

1. vizsgálat: kezeletlen állapot; 2., 3., 4. és 5. vizsgálat: az 5., 17., 27. és 32. követési hónapnak felel meg. FVS: fehérvérsejtszám G/l; THR: thrombocyta szám G/l; HTC: haematocrit; RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció; b3/a2+: p210 típusú bcr/abl chimera mRNS expresszió; iFISH-: interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció; CCA: konvencionális citogenetikai analízis; GAPA: granulocita alkalikus foszfatáz aktivitás (normál tartomány: 206±36); CMB: Ph⁺ chronikus myeloproliferatív betegség atypusos vonásokkal; CF: chronicus fázis; BC: blastos crisis; n.a.: nincs adat

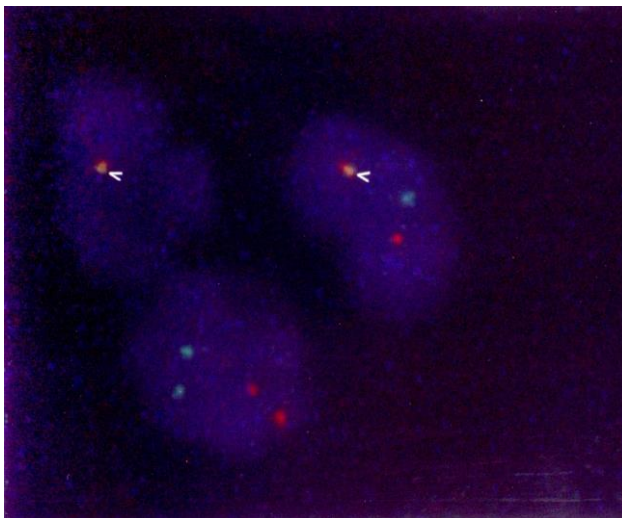
Az RNS preparátum minősége megfelelő volt, mivel a β -actin és a bcr-abl törtésponttól közvetlenül telomerikusan elhelyezkedő, a normal abl-ben valamint a bcr-abl mRNS-ben is jelenlevő a2–a3 exon régiót reprezentáló mRNS szakasz jól volt amplifikálható RT-PCR-rel. Ezen leletek egy CML típusú, de transzkripcionálisan inaktív ('silent') Ph kromoszómát hordozó, atipusos csontvelő morfológiával és citokémiával járó CMB-re utaltak. A követés 5. hónapjában a vizsgálatok jelentősen eltérő histológiai és molekuláris leletekkel szolgáltak.

A crista biopsia szignifikáns erythroid szupresszió mellett dominálónan differenciálódó granulocita–megakaryocita proliferációt mutatott grade I retikuláris rostsaporulat mellett. Ezt a GAPA csökkenése és 8 %-os basophilia kísérte (3.3.2.1.b.-c. ábra). Továbbá, az iFISH-sel kimutatott, továbbra is magas perifériás Ph⁺ sejtarány mellett a p210 típusú bcr-abl mRNS termékre az RT-PCR teszt egyértelmű pozitivitást adott. A molekulásúly valamint az amplifikált termék szekvencia vizsgálata transzkripcionálisan aktív b3/a2 típusú translokációt bizonyított (3.3.2.2.-3.3.2.4. ábrák). Két további követéses vizsgálat a 17. és a 27. hónapban a proliferatív, de differenciálódó myelo- megakaryopoesist (az utóbbi enyhe csoportképződési tendenciája mellett) és az éretlen erythropoesis megjelenését mutatta. A bcr-abl átrendeződést mutató sejtek aránya a periférián továbbra is magas volt, 57% és 90% között változott. A csontvelői metafázis citogenetika is megerősítette a klasszikus Ph kromoszóma jelenlétét (27. hónap), 36 mitosisból mindegyik pozitív volt.

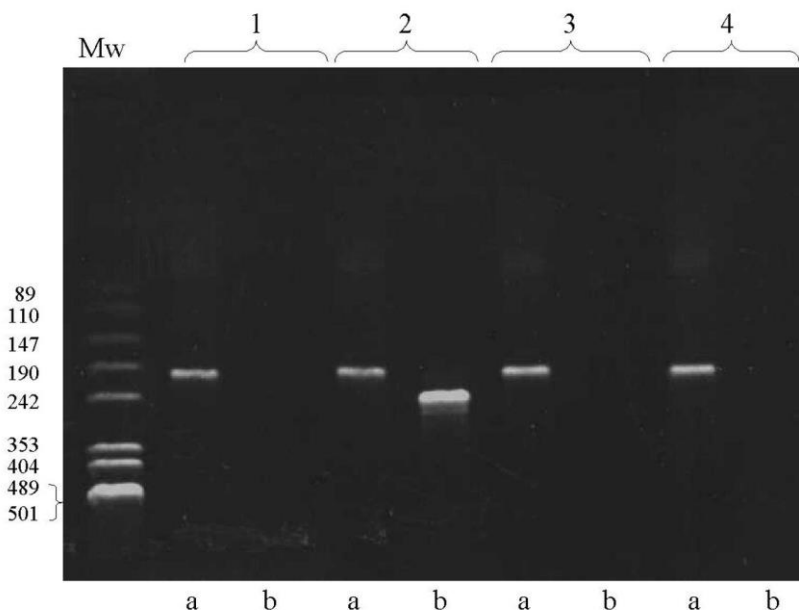


3.3.2.1. ábra A betegség kezdetén a csontvelő aspirátum hisztológiája jelentős éretlen megakaryocytosist valamint differenciálódó erythro- és granulopoesist mutat (a); a 2. vizsgálat (5 hónappal a betegség kezdete után) során vett crista biopsiában az erythroid vonal jelentős suppressziója mellett domináló granulo- és megakaryopoesis látható (b); perifériás vörsejtek alkalikus foszfatáz reakciója: négy, csaknem negatív érett myeloid elem mellett (→) feltűnő a magok hiperszegmentációja (c)

Formol-paraffin metszetek, HE festés, x 100 (a and b); alkalikus foszfatáz citokémiai reakció, x 1000 (c) (131).



3.3.2.2. ábra Az első vizsgálati időpontból származó perifériás vörsejtek bcr-abl átrendeződés specifikus iFISH analízise. A sárga fúziós jelek (►) az átrendeződést bizonyítják (részletek l. 2.3.2.c.7. pont), x 1300 (131).



3.3.2.3. ábra Az abl 2-3 RNS kontrol (a) valamint a Lion-féle, 199 illetve 246 bp terméket adó M-bcr ‘nested’ RT-PCR (b) tesztek agaróz gél elektroforetikus képe az 1., 2., 3. és 4. vizsgálat (magyarázat a 3.3.2.1. táblázatban) során. Mw molekulasúly standard (**131**).

BCR 13

Clone1.: GTG AAA CTC CAG ACT GTC CAC AGC ATT CCG CTG ACC ATC AAT AAG GAA GAT GAT
 Clone2.:
 Clone3.:

BCR 14

GAG TCT CCG GGG CTC TAT GGG TTT CTG AAT GTC ATC GTC CAC TCA GCC ACT GGA TTT AAG

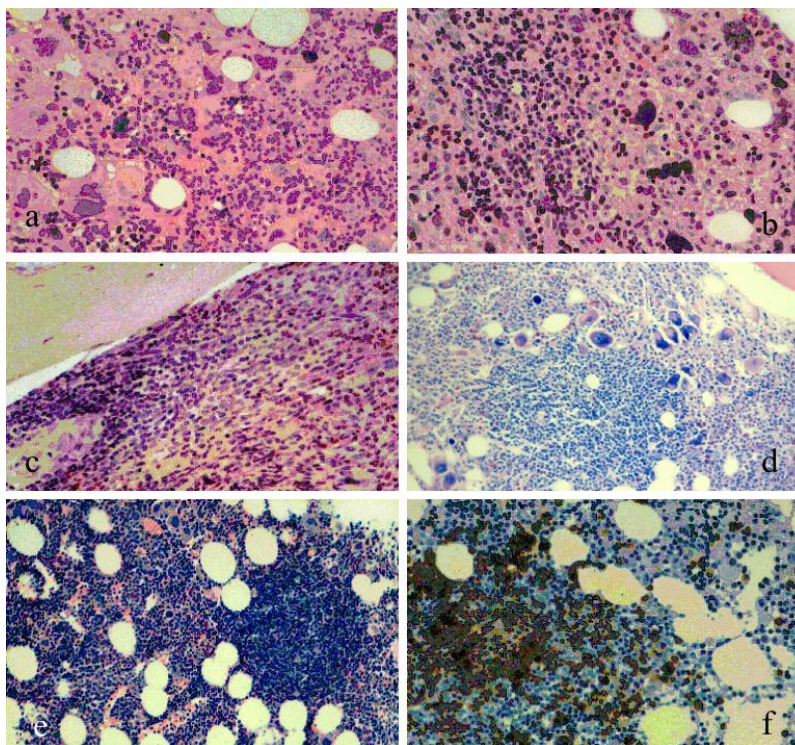
ABL 2

CAG AGT TCA AAA GCC CTT CAG CGG CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT CAG GGT CTG

ABL 2

AGT GGA GCC GCT CGT TGG AAC TCC AAG GAA AAC CTT CTC GCT GGA CCC AGT GAA AAT

3.3.2.4. ábra Az amplifikált DNS-t klónoztuk és három bakteriális DNS izolátumot szekvenáltunk. Csak identikus (...) és egyedi szekvenciákat nyertünk. Ez a szekvencia megfelelt a bcr gén 13. exonja (b2) telomerikus régiójának (123 651.-123 699. bázis), a teljes 14. exonnak (b3) (124 417.-124 491. bázis) valamint az abl gén 2. exonja (a2) centromerikus régiójának (49 889.-50 011. bázis). A szekvencia megfelel a b3/a2 típusú transzlokációnál leíró transzkriptumnak (**131**)



3.3.2.5. ábra Különböző mennyiségű és topografikus eloszlást mutató lymphocytás infiltrátum MPB betegek csontvelőiben. **a** ET, morphologiailag infiltrátum nem azonosítható, HE, x 100; **b** ET, gyér interstitiális infiltrátum, HE, x 100; **c** CEL /HES, mérsékelt paratrabeculáris infiltrátum, HE, x 60; **d** MPB-NOS, noduláris infiltrátum, Giemsa, x 40; **e** MPB-PV, interstitialis és noduláris infiltrátum, Giemsa, x 40; **f** MPB-NOS, részlegesen B-sejt marker pozitív noduláris infiltrátum, CD20 immunhisztológiai jelölés, x 100 (**89**).

A két követési időpontban, azonban, a különböző módszerekkel és triplikátumban végzett RT-PCR eljárások egyaránt negatívak maradtak M-bcr ill. m-bcr kiméra mRNS termékre jó minőségű RNS izolátum mellett.

További 5 hónap múlva a fehérvérsejt szám rapidan emelkedett, a flow citometria a CD45 vs SSC diagram alapján 39% CD13, CD33, CD34 pozitív blastot írt le, a periférián 95%-ra nőtt a blastokat is magában foglaló Ph⁺ sejtarány. Sajnálatos technikai okok miatt a blastos crisis időszakában bcr-abl mRNS expresszióra nem tudtuk vizsgálni a betegséget.

3.3.2.b.2. A tanulmányban vizsgált 106 MPB közül 31 a klinikai – patomorfológiai – molekuláris leletek (bcr-abl átrendeződés és expresszió pozitivitás iFISH és RT-PCR technikákkal) alapján CML-nek felelt meg. A nem osztályozható MPB kategória (MPB-NOS) képviselte a második legnagyobb csoportot 29 beteggel, 28 beteg tartozott az essentiális thrombocytosis (ET), 15 a polycythaemia vera (PV) és 3 a chronicus eosinophilsejtes leukaemia/hypereosinophil szindróma (CEL/HES) kategóriába. A lymphocyták aránya a csontvelőkben széles tartományban mozgott. A morfológiai megítélés szerint 34-ben (32%) a lymphoid populáció mennyisége illetve eloszlása a szokásosnál több illetve attól eltérő volt. A lymphocytá infiltrátum jellege a diffúz szórványos/enyhe infiltrátumtól a kisebb–nagyobb

noduláris típusúig terjedt illetve ezek kombinációinak felelt meg (3.3.2.5. *ábra*). A 105. sz. CML-es beteg crista biopsiájának egyetlen velőűrében (de a sorozatmetszetek során más velőűrben nem) a csontvelőt teljes egészében egy specifikus indolens B-sejtes ML-ra patognomikus diffúz lymphoid infiltrátum váltotta fel (90). Az infiltrátumokban a CD3 vs CD20 pozitív sejtarány nem mutatott jellegzetes eltérést két beteg kivételével; az egyikben (96. sz. beteg) masszív, CD5 – CD23 ko-expressziót is mutató CD20 pozitív infiltrátum volt megfigyelhető (3.3.2.6.a. *ábra*), míg a másokban (105. sz. beteg,) homogén – diffúz (1 velőűrben, lsd. fent) illetve szórványos CD20 – DBA44 pozitív infiltrátum volt jelen (3.3.2.8. *ábra*) (90). A többi esetben, morfológiailag fokozott lymphoid tartalommal vagy anélkül, B-ML-ra pathognomikus fenotípust, CD5-CD20, CD5-CD20-CD23, CD10-CD20 ko-expressziót, cyclin D1 pozitivitást vagy könnyűlánc restrikciót nem észleltünk.

Az IgH génátrendeződés irányú PCR vizsgálatot a 106 crista biopsiás minta paraffinos blokkjából izolált DNS-en elvégezve a poliklonalitás vs monoklonalitás kritériumait, különös tekintettel a hígított mintákban nyert reprodukálhatóságra, vizsgáltuk. Monoklonális mintában a DNS progresszív hígítása mellett triplikátumban egy (vagy kettő biallelikus átrendeződés esetén) – enyhén csökkenő denzitású, de változatlan molsúlyú diszkrét csík volt megfigyelhető. Ezzel szemben poliklonális mintákban nem reprodukálható oligoklonalitást, sőt nagyobb DNS hígítás mellett monoklonalitást utánzó diszkrét amplifikációs csíkot nyertünk (3.3.2.7. *ábra*). Ezért a PCR amplifikációt akkor tekintettük monoklonálisnak, ha egy (v. kettő) diszkrét csík volt nyerhető triplikátumban és legalább 10x hígított DNS mellett is. A monoklonalitás végső bizonyítékának azt tekintettük, ha identikus és azonosítható szekvenciákat kaptunk egy termék több klónjából. Szekvenálást a kontrollként szolgáló B-ML-s betegek csontvelőjének IgH PCR termékein nem végeztünk, de ezekben az esetekben a monoklonalitást csak akkor fogadtuk el, ha a csontvelői valamint az eredeti biopsia (nyirokcsomó vagy extranodális szövet) PCR amplikonjának molsúlya megegyezett. A 106 MPB csontvelő mintából az IgH CDR III régió PCR amplifikációja 81 (76%) esetben volt sikeres (3.3.2.2. *táblázat*). Első megközelítésben a 81-ből 18 minta tűnt monoklonálisnak, de a fenti kritériumokat valamint a szekvenálás eredményét figyelembe véve ez végül 4 (5%) CMB crista biopsia – 1 CML és 3 MPB-NOS – esetében nyert bizonyítást.

Ezen négy esetből kettőben (1 MPB-NOS, 96. sz. beteg; 1 CML, 105. sz. beteg) a csontvelői morfológia nagyfokban gyanús, sőt pathognomikus volt lymphomára, míg a maradék két esetben a mikroszkópos megjelenés nem utalt lymphoproliferatív betegség fennálltára.

3.3.2.2. táblázat A csontvelőben izolált DNS-ben amplifikálható CDR III régiót valamint monoklonális IgH génátrendeződést mutató esetek továbbá a klinikailag manifest lymphomás betegek megoszlása a különböző MPB, B-ML illetve reaktív (nem MPB, nem B-ML) csoportban (89).

	Esetszám	Amplifikálható CDR III	Monoklonális IgH Génátrendeződés	Klinikailag manifest. ML
MPB				
CML	31	23	1	1
MPB-NOS	29	22	3	1
ET	28	22	-	-
PV	15	11	-	-
CEL/HES	3	3	-	-
Összesen:	106	81	4 (5%)	2
B-ML				
18 CLL, 9 FL, 7 MM, 4 MZL, 1 HCL, 1 WM	40	31	24 (77%)	40
Reaktív Crista Biopsia	50	43	-	-

Összehasonlításként, a 40 kezelt indolens B-ML-s beteg crista biopsiájából 31 esetben volt sikeres a CDR III régió amplifikálása és ezek közül 24 (77%) monoklonális IgH génátrendeződést mutatott. Ez a szám a morfológiai megítélés tartományába esik (a 31-ből 21-ben /68%/ önmagában a morfológia alapján ML-s csontvelői érintettséget véleményeztünk). Az 50, egyéb, nem B-ML-s kontroll beteg crista biopsiájából egyben sem találtunk monoklonalitást. A szomatikus hipermutáció vizsgálatot a csontvelői monoklonális IgH génátrendeződéssel identikus átrendeződést mutató perifériás vérsejtek amplifikált DNS-én végeztük el. Ez a 4, csontvelői monoklonális B-sejtes kompartmentet tartalmazó MPB betegből háromban állt rendelkezésre (3.3.2.3. táblázat). A 96. sz. betegben a germline génnel teljes szekvencia identitást találtunk, míg a 71. és 105. sz. betegekben 80.4% illetve 82.2% volt csak az azonosság. Az utóbbi két betegben a CDR I + CDR II régióban észlelt R/S arány meghaladta ugyanezen arányt az FR II + FR III régióban valamint az elméletileg várható R/S arányt a CDR I + CDR II régióban. Ezek szerint az utóbbi két betegben szomatikus hipermutáció és antigén hatásra kialakuló pozitív szelekció, tehát post-follikuláris, míg az első betegben pre-follikuláris eredetű monoklonális B-sejtes populáció bizonyítható.

Az egyéb, az IgH PCR eredmények alapján elvégzett flow citometriás fenotipizálás valamint a klinikai adatok retrospektív kiértékelése a 4, csontvelői monoklonális B-sejtes populációt mutató CMPB-s betegből 2-ben klinikailag is nyilvánvaló lymphomát igazolt.

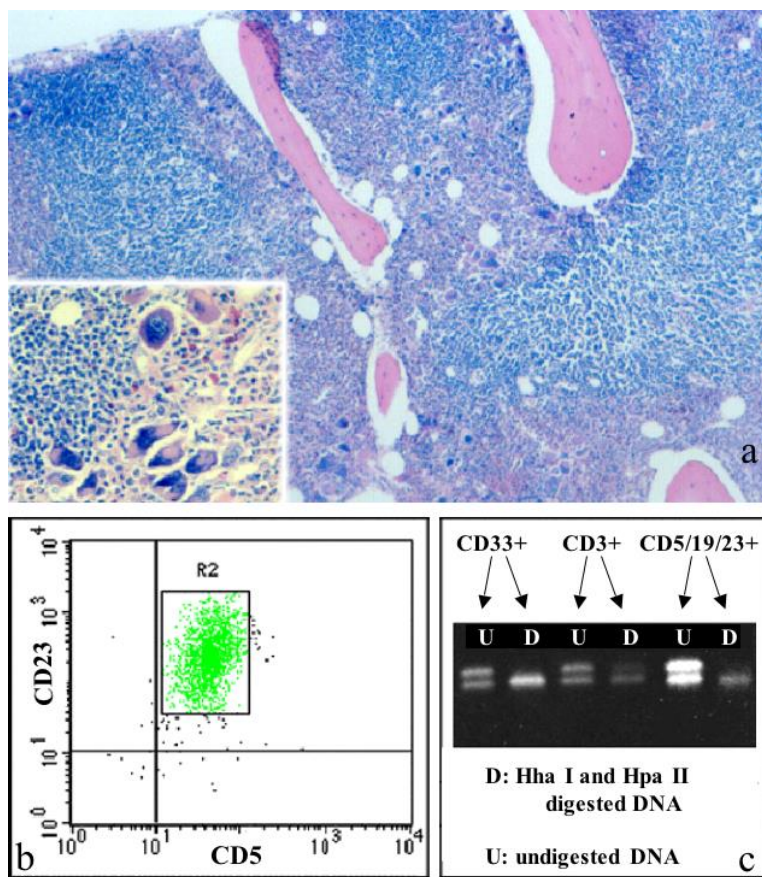
3.3.2.3. táblázat A négy csontvelői monoklonális IgH génátrendeződést mutató betegből három szomatikus hipermutáció analízise (89).

Ny.cs.	Germline gén	Identitás (FRII - FRIII)	Identás (CDRI + CDRII)	Észlelet R/S arány		Elméletileg várt R/S arány (CDRI + CDRII)
				CDR I + CDRII	FRII + FRIII	
1. #71	IGHV4-39*01	90,7%	80,4%	6/1=6,000	8/2=4,000	4,073
2. #96	IGHV1-69*06	100,0%	100,0%	-	-	
3. #105	IGHV4-59*07	93,8%	82,2%	4/1=4,000	3/3=1,000	3,796

A 96. sz.betegben alternáló thrombocytosist és lymphocytosist találtunk a beteg anamnesisében. A periférás vérsejtek immunfenotipizálása CD5-CD19-CD23 ko-expressziót valamint sejtfelszíni lambda könnyűlánc restrikciót mutatott, melyek CLL fennálltát igazolták. A nőbeteg perifériás flow szortírozott myeloid valamint CD5-CD19-CD23 ko-expresszáló leukaemias sejteiből nyert DNS-en elvégzett X-kromoszóma kötött klonalitási vizsgálat (HUMARA PCR teszt) monoklonalitást és ugyanazon inaktivációs mintázatot mutatott a két sejtcsoportban (3.3.2.6.b.-c. ábra).

A 105. sz. betegben (betegtörténet: lsd. 2.3.2.a.3. pont) típusos CML állt fenn, a konvencionális citogenetika Ph kromoszómát talált 20 metafázisból 18-ban, a perifériás vérsejtek 96%-a mutatta a bcr-abl átrendeződést iFISH technikával, az RT-PCR a b2/a2 valamint a b3/a2 típusú bcr-abl kiméra mRNS expresszió együttes fennálltát, a PCR a csontvelői DNS-ben monoklonális IgH génátrendeződést, a morfológiai vizsgálat pedig egyetlen velőűrben homogén, más velőűrökben szórványos – csak immunhistológiailag detektálható – HCL típusú B-ML-ra utaló eltérést talált (3.3.2.8. és 3.3.2.9. ábrák).

A perifériás kenetek gondos újraértékelése ritka, mononuclearis hajas sejteket tárt fel, a tartarát rezisztens savi phosphatase (TRAT) pozitív sejtek aránya 0.4% volt. A fenotipizálás szerint a perifériás sejtek 0.5%-a CD11c-CD19 ko-expressziót és sejtfelszíni kappa könnyűlánc restrikciót mutatott, melyek együttesen megerősítették és kétségen kívül bizonyították ko-exisztáló HCL fennálltát. Egymást követő (konzekutív) immuncitologiai és iFISH jelölésekkel vizsgáltuk a CML és a HCL klonalis kapcsolatát. A periférás vérsejtek citopreparátumain CD11c és CD19 kettős jelölést alkalmaztunk majd az ezt követően, ugyanazon lemezekon elvégzett iFISH preparátumon a korábban digitalizált megfelelő látómezőket relokalizáltuk.

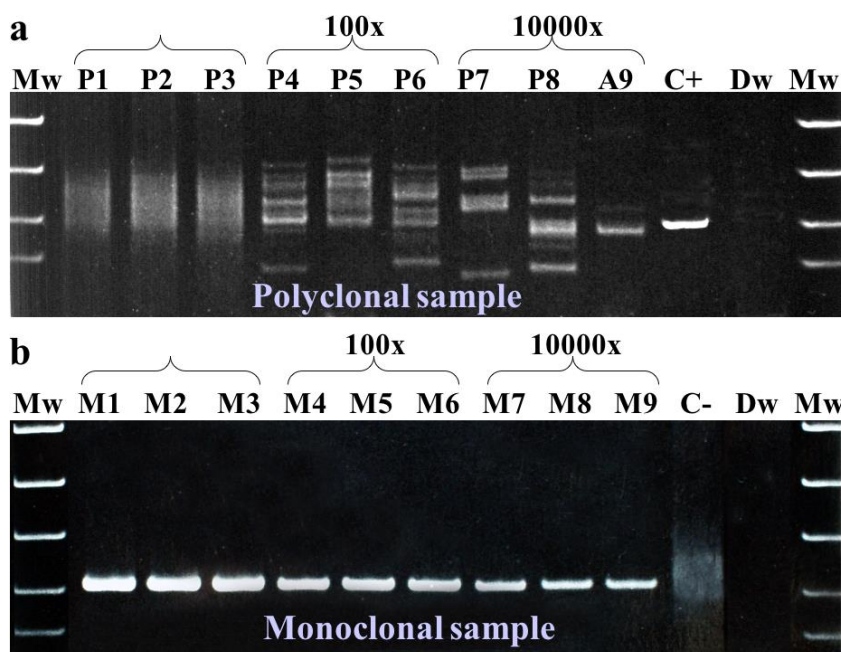


3.3.2.6. ábra a MPN-NOS (96. sz. beteg), a hypercelluláris, proliferáló myeloid vonalat és polimorf megakaryocytosist mutató csontvelő parenchymában masszív noduláris és interstitialis lymphoid infiltrátum azonosítható, Giemsa, x 40 és x 200 (inszert); b a flow citometriás immunfenotipizálás a CD19+ fehérvérsejtek CD5–CD23 ko-expresszióját mutatja; c HUMARA teszt - a PCR termék elektroforetikus szeparálása, a flow szortírozott myeloid sejtek (CD33+), T-sejtek (CD3+) és CLL sejtek (CD5+/CD19+/CD23+) közül csak a T-sejtekben volt amplifikálható mindkét,

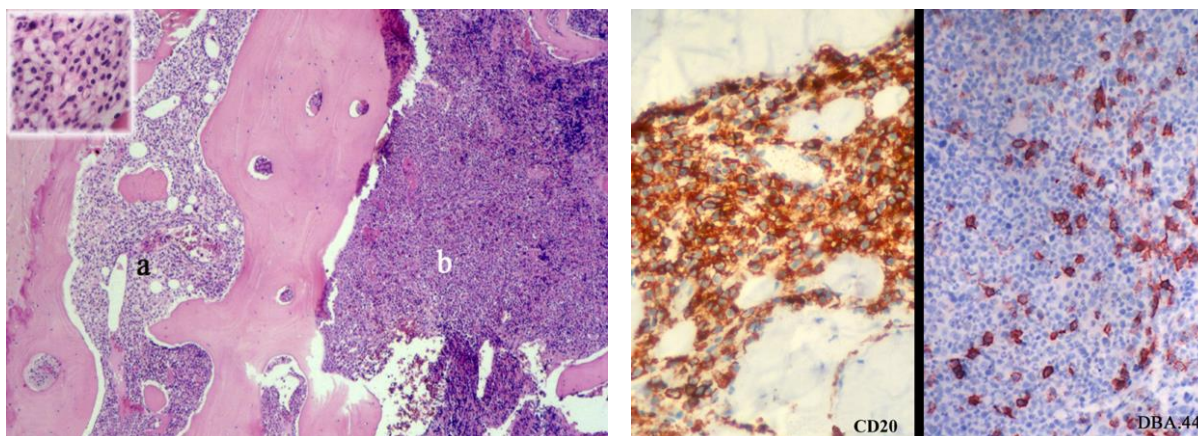
trinukleotid repetitív szekvenciát tartalmazó allél Hha I és Hpa II metiláció szenzitív endonukleáz emésztést követően, az eredmény a myeloid és a CLL-es sejtek ugyanazon X kromoszóma inaktivációs mintázatára valamint monoklonalitására utal (89).

3.3.2.7. ábra Crista biopsiá paraffinos blokkjaiból extrahált DNS-ek higitatlan (1-2-3), 1000 x (4-5-6) valamint 10 000 x higitott (7-8-9) triplikátumain a 2.3.2.c.4. pont szerint amplifikált IgH gén CDR III régió PCR termékeinek elektroforetikus szeparálása.

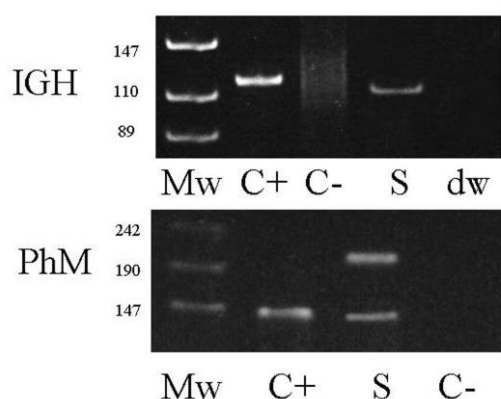
Különböző amplifikációs mintázatot ('pattern', P) észleltünk a 'kenet-től



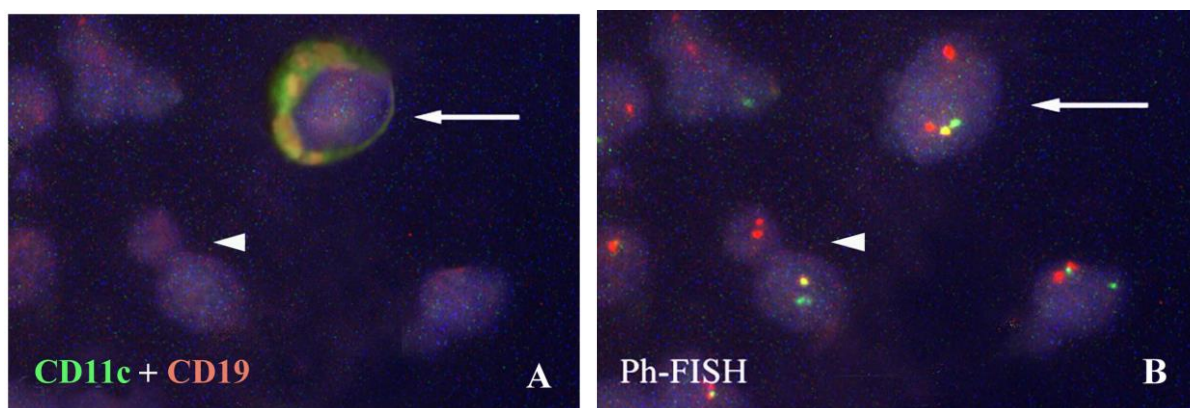
(P1-P3) a nem reprodukálható oligoklonalitáson (P4-P8) át az egyszeres amplifikációs csíkig (ál-monoklonalitás, P9) poliklonális mintákban (a), míg konzekvens egyforma molsúlyú amplifikátum volt észlelhető a különböző higitások mellett is a monoklonális mintában (b), C+ pozitív kontrol, C- negatív kontrol, Dw desztillált víz, Mw molekulásúly marker (89).



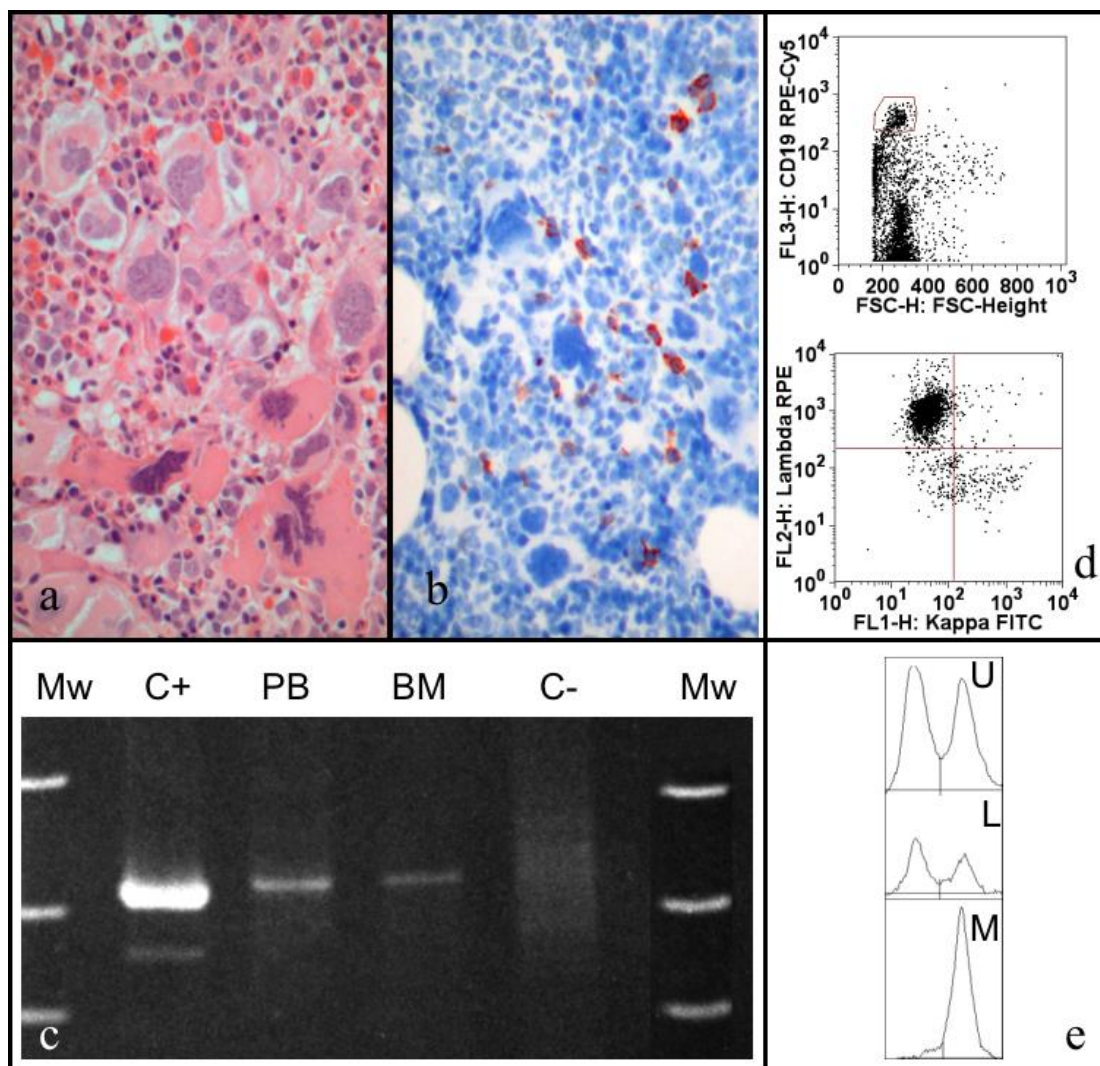
3.3.2.8. ábra HCL (a) illetve CML (b) típusú csontvelői infiltrátum ugyanazon crista biopsia szomszédos velőűreibe, HE, 40 x; inszert: az (a) ábrarészlet nagyobb nagyítású képén jól látható a HCL-re jellemző 'lépesmész' rajzolat, HE, 400 x; a CD20+ és DBA.44 + mononuclearis sejtelemek az (a) ábrarészletnek megfelelően homogén lemezben infiltrálnak, míg más területeken morfológiailag nem azonosítható módon szóróványos vannak jelen a myeloid proliferátumban, 100 x (90).



3.3.2.9. ábra A crista biopsia paraffinos blokkjából extrahált DNS mintából (S) PCR eljárással kimutatott monoklonális IgH génátrendeződés valamint a perifériás vérmintából (S) RT-PCR eljárással detektált b2/a2 és b3/a2 típusú bcr-abl kiméra expresszió (PhM) elektroforetikus képe, C+ és C- pozitív és negatív kontrol minták, dw desztillált víz, Mw molekulásúly standard (90)



3.3.2.10. ábra a CD11c (zöld) és CD19 (piros) ko-expresszáló perifériás vér mononuclearis sejtek (↔), b ugyanazon preparátum iFISH reakciója, bcr próba: piros, abl próba: zöld, kék DAPI háttér magfestés; az (a) látómező relokalizációja a bcr-abl átrendeződésre valamint +22-re utaló 1 sárga fúziós jelet és 2 piros szignált mutat a CD11c- CD19 pozitív mononukleáris (↔) és negatív segmentált magvú sejt (◀) magjában egyaránt (90).



3.3.2.11. ábra MPN-NOS (71.sz. beteg). **a** Jelentős polimorf megakaryocytosissal kísért trilinearis proliferáció, HE, 320 x; **b** a normális tartományba eső, szórványos, érett CD20 pozitív B-sejtek a velőállományban, CD20 immunhisztológiai festés, 100 x; **c** a perifériás vérből (PB) valamint a csontvelőből (BM) izolált DNS-ből egyforma molekulásúlyú amplifikátummal jellemzett monoklonális IgH génátrendeződés, gél elektroforézis, Mw molekulásúly standard, C+ és C- pozitív és negatív kontrol minták; **d** sejtfelszíni lambda könnyűlánc restrikciót ($\lambda/\kappa = 12.5$) mutató, a reaktív B-sejtektől CD19- SSC karakterisztikumában elkülönülő minor perifériás vérsejt populáció; **e** a CD45 vs SSC diagram alapján azonosított flow szortírozott vérsejt populációkból izolált DNS-en elvégzett HUMARA PCR teszt eredményének elektroforetikus – denzitometriás kiértékelése, U az emésztetlen DNS-ből nyert két, eltérő molsúlyú ampikon a trinukleotid repetitive régióra vonatkozóan heterozigotizásra utal, a lymphoid sejtek (L) a metiláció szenzitív restrikciós endonukleáz emésztést követően is megtartották a heterozigotizást, mely poliklonlitásra utal, míg a myeloid sejtek (M) – monoklonalitásra utalóan - az emésztést követően a heterozigotizást elvesztették, csak az egyik allél volt amplifikálható (89).

Ezen kísérletek azt mutatták, hogy a nagyszámú, a fenti két márkerre negatív myeloid elem mellett szórványos, mononuclearis, CD11c-t és CD19-et ko-expresszáló sejt fordult elő, melyek tartalmaztak egy Ph kromoszómának megfelelő sárga fúziós valamint egy extra piros szignált (3.3.2.10. ábra). Az additionalis vörös szignál (abl próba) +9-nek vagy a nem átrendeződött 9-es kromoszóma abl próba területében (kb. a közepén) bekövetkezett törésének egyaránt megfelelhet. Mindkét márker a myeloid valamint a CD19-CD11c pozitív mononukleáris sejtekben egyaránt előfordult. A flow citometriával, kombinált feno- és genotípus vizsgálattal valamint citokémiával meghatározott egyes vérsejt szubpopulációk arányait a 3.3.2.4. táblázat mutatja.

3.3.2.4. Táblázat Flow citometriával, kombinált immunfluoreszcenciával és iFISH-sel valamint a citokémiával meghatározott fehérvérsejt szubpopulációk arányai (105.sz. beteg) (90).

	Lymphocyták %-a*	FVS %-a
Lymphocyták*	100.0	7.3**
CD3 ⁺	92.5	6.8
CD19 ⁺	7.8	0.6
CD19 ⁺ +CD11c ⁺	6.5	0.5
◇CD19 ⁺ +CD11c ⁺ +FISH ⁺		0.4
○TRAP ⁺		0.4

* CD13⁺, CD14⁺, CD33⁺, CD34⁺, CD56⁺ mononuclearis sejtek a CD45-SSC diagramon

** a 'kövér betűs' adatok flow citometriás analizisből származnak

◇ az adat a relokalizációs kísérletből származik

○ multifokális tartarát rezisztens acid foszfátáz pozitivitás

A 71.sz. betegben a perifériás vérben a csontvelői monoklonális IgH amplifikátummal megegyező mólsúlyú és szekvenciájú IgH génátrendeződés hátterében flow citometriásan kimutatható volt a 7.3% mononuclearis lymphoid populáció egy 8.7%-os, eltérő CD19–FSC karakterisztikumot és kappa sIg könnyűlánc restrikciót mutató szubpopulációja, de klinikailag lymphoma nem volt nyilvánvaló. A CD45 vs SSC plot alapján flow szortírozott myeloid és lymphoid populáció közül az elsőben monoklonalitás volt kimutatható, de a másodikban a heterozigotitás elvesztése (LOH) nem volt igazolható (3.3.2.11. ábra). A hét hónapos követés során B-ML nem alakult ki.

A 24. sz. betegtől perifériás vér immunfenotipizálásra nem állt rendelkezésre, a primér csontvelő vizsgálatot követően röviddel meghalt szekunder infekcióban és a boncolás lymphomára utaló eltérést nem mutatott.

3.3.2.c. Diszkusszió

3.3.2.c.1. A kiméra mRNS expressziója – melynek a Ph^+ , bcr-abl mRNS⁺ állapot az egyik végétét jelenti – regulációjának vizsgálata nagy jelentőségű a CML pathogenesisre átfogóbb megértése valamint a betegség és a poszt-transzplant állapot monitorizálása szempontjából **(69, 70, 91, 92, 93)**. A tanulmányban egy olyan beteget írtunk le, akinél a 32 hónapos követés alatt ötször végeztünk molekuláris vizsgálatokat. Bár a perifériás vörsejtek végig és magas arányban Ph^+ pozitívak voltak, a kiméra mRNS expresszió a chronicus fázis során csak egyszer volt detektálható, de nem a betegség kezdetén és későbbi lefolyásán. A bcr-abl expresszió CML irányú morfológiai és citokémiai változásokkal járt együtt. Ez azt jelenti, hogy ezen Ph^+ CMB lefolyása során bcr-abl mRNS negatív állapotot azonosítottunk nem izolált haemopoetikus kolóniák, hanem az egész perifériás vörsejt populáció szintjén.

Jól ismert, hogy a pozitív és a negatív PCR eredményeket körültekintően kell értékelni. A vizsgálatok során a b2a2 ill. b3a2 valamint az e1a2 típusú törések révén képződő p210 valamint p190 típusú bcr-abl fúziós mRNS-t detektáló RT-PCR reakciókat alkalmaztunk, ezek közül az elsők jellemzik a CML-t. Több oka is lehet annak, hogy fals negativitás miatt nem tudtuk detektálni a p210 mRNS-t: 1. gyenge minőségű RNS izolátum vagy az RNS degradálódása, 2. az alkalmazott PCR technika alacsony szenzitivitása, 3. e19a2 típusú transzlokáció (μ -bcr régió), 4. az abl 2. és 3. exonja közötti töréspont, mely a2 exon nélküli fúziós gént eredményez. A kontrol vizsgálatok az első kettő valamint az utolsó alternatíva ellen szóltak. Az RNS minőségét ellenőrző RT-PCR-ek egyértelmű amplifikációt adtak nem csak a β -actin-ra, de az M-bcr régiótól közvetlenül telomerikusan elhelyezkedő a2-a3 régióra is. A bcr-abl mRNS rövidebb féléletidejéről – mely napokig fel nem dolgozott vérmintáknál illetve mélyhűtötten hónapokig tárolt RNS-nél is specifikus kiméra mRNS degradációt okozhat – vannak adatok **(94)**, de esetünkben az RNS izolálás a mintavételtől számított 1 órán belül, az RT-PCR reakciók pedig 24 órán belül megtörténtek. Másrésről a b2a2 illetve b3a2 típusú transzlokáció detektálására két különböző primer szett felhasználásával végzett RT-PCR vizsgálatok érzékenysége megfelelő volt, kontrol vizsgálatokban reprodukálható pozitivitást nyertünk 10^{-7} hígítás mellett is. A nagyon ritka e19a2 típusú transzlokációt nem vizsgáltuk RT-PCR-rel, de három érv is ennek fennállta ellen szól esetünkben: 1. μ -bcr régióban bekövetkező transzlokáció klinikailag és citológiaiilag elkülönülő entitást, a kifejezett neurophil differenciálódással és thrombocytosissal járó CML-t eredményezi, de esetünkben ez nem állt fenn **(4)**, 2. ez a transzlokáció a iFISH során hibridizált bcr és abl szekvenciák közötti DNS szakaszt – a b3a2 és a b2a2 típusúhoz

viszonyítva – 540 bp ill. 615 bp-ral nyújtaná meg, mely a FISH szignálok fúziója helyett nagy valószínűséggel azok ko-lokalizációját eredményezte volna **(95)**, 3. a lefolyás során végzett 4 RT-PCR vizsgálati minta közül az egyikben egyértelműen kimutatható volt a mólsúly valamint a szekvencia alapján b3a2 – p210 típusú bcr-abl kiméra mRNS, mint a metafázis citogenetikával is igazolt klasszikus Ph kromoszóma terméke.

A t(9;22)(q34.1;q11.21) patogénomikus a CML-re, de a betegség többlépcsős fejlődése során nem az első transzformáló hatás: Ph⁺ CML-es betegek Epstein-Barr vírussal transzformált, Ph⁻ és bcr-abl mRNS⁻ lymphoid sejtvonalai a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz analízis alapján monoklonálisnak bizonyultak **(63)**. Kb 30%-ban monoklonális Ph-haemopoiesis azonosítható dasatinib indukálta remisszióban levő CML betegekben, hasonló eltérést azonban IFN- α terápia mellett is leírtak **(96, 97)**. Így legalább két fejlődési stádium lehetősége merült fel, az első során – nem ismert transzformáló tényező hatására – az őssejt kompartment klonális proliferációban megnyilvánuló növekedési előnyre tesz szert, a másodikban pedig kialakul a jellegzetes Ph kromoszóma és a CML-es fenotípus. A molekuláris vizsgálatok tükrében azonban még a Ph⁺ klón is heterogén a p210 kiméra mRNS expressziója vonatkozásában. CML-es betegek Ph⁺ haemopoetikus kolóniáinak 25%-ában (tartomány: 0%-60%) bcr-abl expresszió nem volt kimutatható érzékeny RT-PCR módszerrel. Ha a kolóniákat IFN- α jelenlétében generálták, akkor ez az arány 95%-ra növekedett **(65, 67)**. Flow szortírozott korai haemopoetikus valamint sejtvonal-elkötelezett progenitorok továbbá 'long-term culture-initiating cells' (LT-CICs) és poszttranszplant betegek sejtmintáinak vizsgálata nem csak nagy különbségeket (nagyságrendeket) tárt fel a p210 mRNS expressziójának mértékében, de nagyszámú nem expresszáló, néma ('silent', 'dormant') klónt is **(66, 68, 69, 70, 99)**. E megállapítás a tirozin kináz inhibitor (TKI) terápiás korszakra is igaz **(100, 101)**. Ezen adatok arra utalnak, hogy a Ph⁺ klón egy (változó) frakciója nem-expresszáló. Napvilágot látott azonban ezzel ellentétes adat is: 5 CML-es beteg kolónia képző sejtei valamint az LT-CIC 100%-ban Ph és bcr-abl mRNS pozitívak voltak **(102)**.

Konklúzió:

1. Az irodalmi adatok nagy többsége szerint a CML-es betegekben egy labilis, Ph⁺, de nem expresszáló progenitor kompartment is létezik. Tanulmányunk szerint ez az állapot ('silencing') az egész differenciálódó sejtvonalra kiterjedhet.
2. Az irodalomban ilyen közlést – legalábbis az általunk alkalmazott molekuláris kritériumokat használva – nem ismerünk.

3. A nem-expresszáló Ph⁺ állapot tovább stratifikálhatja a CML típusú betegség többlépcsős pathogenesisét és komolyan figyelembe veendő a kvantitativ PCR monitorizálási eredmények értékelésénél.

3.3.2.c.2. Ezt a tanulmányt két ok miatt végeztük. Egyrészt haematopathologusok számára a crista biopsiák lymphoid populációjának megítélése – reaktív vagy lymphomás – konstans probléma. Másrészt nem voltak az irodalomban a Myeloproliferatív Betegségek (MPB) valamint a B-sejtes ML ko-incidenciájára vonatkozó adatok. Egy publikáció szerint Ph- MPB-ekben feltűnően magas a monoclonális T-sejt receptor génátrendeződés, morfológiailag / klinikailag lymphoma hiányában, melynek rossz prognosztikai szerepet tulajdonítottak (**103**). Ezért 106 kezeletlen MPB-ben szenvedő beteg crista biopsiás anyagának a morfológiai vizsgálata mellett IgH génátrendeződés irányú molekuláris analízist is végeztünk. Arra is választ vártunk, hogy a klonalitási vizsgálatokat befolyásolhatja-e az el nem kötelezett összejt eredetű MPN-ákban a lymphoid populáció legalábbis egy részének klonális jellege.

A benignus lymphoid infiltrátum gyakori lelet csontvelőben és mennyiségük a nemmel, korrall és esetleges autoimmun betegség fennálltával változik (**104**). A nagyméretű (> 0.6 mm átmérőjű) és számos (> 4 db egy 1 cm-es crista biopsiában) aggregátum leírására javasolták a 'noduláris lymphoid hyperplasia' – kevésbé elterjedt – elnevezést is (**105**). Bár bizonyos morfológiai sajátosságok – centrális lokalizáció, heterogén citológia és immunfenotípus, éles határok, finom retikulín hálózat, centrum germinatívumok jelenléte – indolens B-ML-val szemben az infiltrátum inkább reaktív jellegére utalhatnak, a differenciál diagnosztikának önmagában morfológiai, abszolút kritériumai nincsenek. Ez a diagnosztikai probléma különösen felszínre kerül MPB -k esetén, ahol a szórványos interstitialis, foltos söt noduláris lymphoid infiltrátumok sokkal gyakrabban fordulnak elő, mint reaktív állapotokban (**84, 106**). Az IgH génátrendeződés molekuláris vizsgálata a problémát megoldó eszköznek tűnhet, de a fals monoklonalitás jól dokumentált jelenség kis biopsziákban – mint gyomorbiopsziák, szövet fragmentumok, mikrodisszekált reaktív nyirokcsomók, söt T-sejtes ML – valamint saját eredményeink szerint is (**85, 86, 87, 107**). A fals monoklonalitás oka lehet a B-klónok alacsony száma (vagy a B-sejtek aktuálisan alacsony száma vagy a topografikusan szegregált mikro-B-sejt klónok jelenléte), vagy amplifikációs előny ('preferential priming') a konszenzus primereknek a különböző IgH génátrendeződések irányában fennálló eltérő affinitása miatt (**108, 109**).

Bár a 106 CMPB crista biopsia 32%-ában mutatkozott morfológiailag növekedett lymphoid kompartment, a 81 amplifikálható CDR III régióval bíró csontvelőből csak 4 (5%) mutatott monoklonális IgH génátrendeződést a felállított kritériumok alapján.

Összehasonlítva, az indolens B-ML-s betegek csontvelőiben a morfológiai és molekuláris vizsgálat a pozitivitás megítélésében jó konkordanciát (68% vs 77%) mutatott. A négy csontvelői monoklonális IgH génátrendeződést mutató CMPB betegből 2-ben klinikailag is nyilvánvaló, specifikus szubtypusú lymphoma állt fenn. Az egyikben az együttesen fennálló és kezeletlen állapotban felismert CML és HCL között klonális kapcsolat is bizonyítható volt **(90)**. A HCL-ban magas (8.7%) a szekunder malignomák aránya és ez interferon alfa-2b-vel kezelt betegekben még jelentősen, 19%-ra, megemelkedik **(78, 79, 80)**. Ismereteink szerint HCL és Ph⁺ CML együttes előfordulását két esetben írták le, de ezekben a CML 12 illetve 48 hónappal követte a már kezelt HCL kialakulását és a klonális kapcsolatot egyik esetben sem vizsgálták **(81, 82)**. Jelen esetünkön kívül csak egy beteget közöltek, akinél a kezeletlen állapotban CML és HCL együttesen fentállt **(83)**. A nem osztályozható MPB és CLL együttes fennállását mutató másik betegben a myeloid és a lymphoid leukaemiás sejtek a mikroszatellita LOH ugyanazon mintázatát mutatták, mely nem egyértelműen, de legalább 50%-os valószínűséggel felveti a chronicus myeloproliferatív betegség és az indolens B-sejtes lymphoma klonális kapcsolatát. Az IgH CDR III régió PCR amplifikációja és a szekvencia analízis azért is előnyös, mert az utóbbi meghatározó prognosztikai információt hordoz **(110)**. A maradék kettő, monoklonális csontvelői IgH génátrendeződést mutató esetben klinikopathológiailag lymphoma nem volt bizonyítható. Az egyik esetben (71.sz. nőbeteg), azonban, egy minor (0.64 %) perifériás B-sejt populáció volt kimutatható, mely a slg könnyülánc restrikció valamint az IgH génátrendeződés szerint is monoklonálisnak bizonyult. Ennek klonális kapcsolatát az egyébként bizonyítottan monoklonális myeloid sejtekkel nem lehetett igazolni, mivel a HUMARA teszt nem elég szenzitív ahhoz, hogy ilyen kis populációk kimutathatók legyenek. A rövid követési idő alatt ezen lelet klinikai jelentőségére nem derült fény, de a több módszerrel valamint a csontvelőben és a periférián is igazolt monoklonális B-sejt populáció miatt jogosan feltételezhetjük egy lymphoma fejlődésének korai stádiumát.

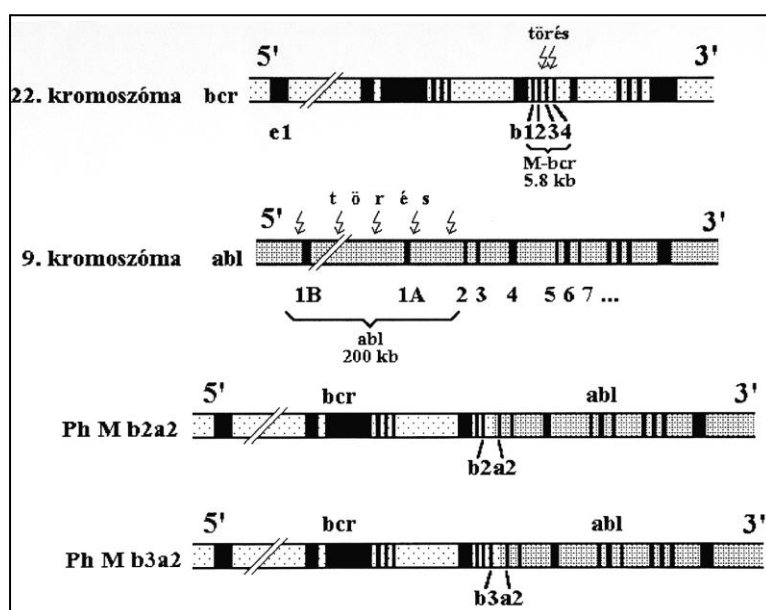
Összegezve: 1. MPB-ekben sokkal gyakrabban detektálható morfológiailag fokozott mennyiségű érett lymphoid populáció a csontvelőben, mint amilyen arányban monoklonális IgH génátrendeződés PCR-rel kimutatható; 2. A klonális B-sejt populáció (5%) illetve a klinikopathológiailag manifest B-ML (2.5%) sokkal gyakoribb CMPB-ben, mint az a 31 per 100.000 lakos európai nem Hodgkin ML incidenciából következne **(111)**; 3. Ez azt jelenti, hogy MPB-ekben, különösképpen a több fejlődésben levő formát inkorporáló nem osztályozható (NOS) csoportban, monoklonális B-sejt populáció kialakulására predispozíció létezik; 4. Bár a monoklonális B-sejt populáció nem jelent lymphomát – melyet, pl., az α -

nehézlánc betegség, a *Helicobacter pylori* indukálta gastricus B-sejt proliferáció vagy a Sjögren betegség is mutat, melyekben a monoklonális, de nem lymphomás B-sejt növekedés a lymphomagenesis irányába mutató egy fejlődési fázist képvisel – jogosan feltételezhetjük, hogy abban a két esetünkben, ahol a csontvelői monoklonális B-sejt populáció ellenére klinikopathológiailag lymphoma nem volt igazolható, fejlődésben levő lymphomákról volt szó; 5. Mivel ebben a két esetben nem volt semmilyen, B-sejt abnormalitásra utaló alarmírozó morfológiai jel, nem állíthatjuk azt, hogy morfológiailag felismerhető lenne egy pre-klinikai lymphoma állapot MPB-ben; 6. A flow citometriás és a szomatikus mutáció (SM) analízis adatok szerint a perifériás, naiv – prefolliculáris valamint a postfolliculáris B-sejtekből egyaránt kialakulhat B-ML MPB-ben, mely az egyes MPB-ekben előforduló precursor B-sejt eredetű blastos crisis-től (BC) eltérő pathogenesisre (lymphomagenesisre) utal, továbbá a SM vizsgálat prediktív korai pre-B BC illetve fejlődésben levő lymphoma differenciálásában, mint azt a 71.sz. beteg is mutatja; 7. A MPB-ben észlelhető magasabb monoklonális B-sejt incidencia nem magyarázható azzal, hogy MPN-ben a B-sejtek egy része klonális – melyet legjobban az mutat, hogy CML-ben az érett B-sejtek 29–69%-a a neoplastikus el nem kötelezett őssejt (UCSC) populációhoz tartozik, (112) – mert az IgH génátrendeződés a haemopoetikus hierarchia egy magasabb szintjén történik, mint ahol az UCSC kompartment klonális expanziója végbemegy. Ezért, egy klonális márkert akvirálása az UCSC szintjén nem jelent a különböző lymphoid progenitorokban identikus IgH génátrendeződést. Ha ez lenne az eset, akkor – figyelembe véve az IgH PCR teszt kb 1%-os érzékenységét – MPN-ákban sokkal nagyobb arányban (ldt fent) lehetne monoklonális IgH átrendeződést kimutatni; 8. Ez azonban azt jelenti, hogy a MPN-hoz klonálisan kapcsolódó B-sejtek a többlépcsős cancerogenesis első fokára már felléptek, és – szemben a normál B-sejtekkel – kevesebb addicionális aberráció szükséges ahhoz, hogy preklinikai vagy manifest lymphoma alakuljon ki. A MPB lymphoid vonal irányú progresszióját a CML-BC-ek 20–30%-át adó precursor B-sejt eredetű Ph⁺ LBC példázza. A fentiekben egy másik jellegű lymphoid progressziót írtunk le MPB-ekben, mely nem ismert, de az előzőtől biztosan eltérő pathogenesisű folyamat.

3.3.3. A chronicus myeloid leukaemia molekuláris monitorizálása

3.3.3.a. Bevezetés

A chronicus myeloid leukaemia (CML) a leggyakoribb chronicus myeloproliferatív betegség (CMB), incidenciája 1-1.5/100 000 lakos/év körül mozog hazai és nemzetközi adatok szerint (**33, 113, 114, 115**). A CML nem csak klinikai, laboratóriumi illetve patológiai, hanem genetikai értelemben is jól definiált betegség. E betegségre jellemző, patognómikus molekuláris eltérés a humán daganatokban elsőként leírt Philadelphia (Ph) kromoszóma, mely a 9-es és a 22 kromoszóma között létrejövő kiegyensúlyozott transzlokáció eredményeként alakul ki és konvencionális cytogenetikával jól azonosítható (**116**). Molekuláris szinten a 9-es kromoszómán lévő *abl* gén a 22-es kromoszóma *bcr* génje mellé kerül és génfúzió eredményeképpen *bcr-abl* kiméra gén keletkezik (**117, 118**). A törés a 22-es kromoszóma 5.8 kb nagyságú M-*bcr* – a b2 és b3 vagy a b3 és b4 exonok közötti intron – régióban, míg a 9-es kromoszómán az *abl* 2-es exon előtti 200 kb hosszúságú régióban következik be (**119, 120**) (**3.3.3.1. sz. ábra**).



3.3.3.1. sz. ábra A Philadelphia transzlokáció során a *bcr* és az *abl* génben érintett töréspont régió valamint a b2a2 és a b3a2 típusú M-*bcr* transzlokáció sémás ábrája (**121**).

Ennek megfelelően a transzlokáció vagy b2/a2 vagy b3/a2 típusú. Ha az M-*bcr* régióban a törés a b3-b4 exonok között következik be, ugyanazon betegben b3/a2 és b2/a2 típusú kiméra mRNS is képződhet, mivel a b3 exon alternatív mRNS érés révén kieshet. Más típusú, citogenetikailag Ph kromoszóma formájában megnyilvánuló törés is előfordul (m-*bcr*, μ -*bcr*) (4). A fúziós génről 8.2 kb nagyságú kiméra *bcr-abl* mRNS íródik le, melynek protein

terméke 210 kD-os és a normális abl proteinhez képest fokozott tyrozin kináz aktivitással bír **(122, 123)**.

A CML típusú betegség fenotípus kiváltója és fenntartója a bcr-abl gén expresszió, mely széles tartományban mozoghat **(124, 125, 126, 127)**. Ennek egyik véglete a nem expresszáló, néma ('silent', 'dormant') Ph kromoszóma, mely nem csupán egyes haemopoetikus kolóniák, hanem speciális esetekben a teljes haemopoiesis szintjén is létezhet **(128, 129, 130, 131, 132, 133)**. A tumortömeget – illetve fordítva – a reziduális haemopoiesist viszont a Ph kromoszómát illetve bcr/abl átrendeződést hordozó – illetve erre negatív – sejtek teljes haemopoiesisen belüli aránya képviseli. A bcr-abl expresszió vs tumortömeg vs betegség reprezentáció kérdéskör a legújabb tirozin kináz inhibitor (TKI) terápiás korszakban sem jutott nyugvópontra **(101)**. Molekuláris remisszióban levő CML-es betegekben ma sem ismert az exakt betegség állapot, így a TKI-ok hosszútávú túlélésre gyakorolt hatása, mivel a legérzékenyebb kvantitativ reverz transzkripció PCR sem képes azonosítani a relabáló betegeket **(100)**. Ezért a még az α -interferon (α -IFN) terápiás érában végzett tanulmányunknak is van impaktja a jelen adatok tükrében is.

A kezelés hatékonyságának molekuláris monitorizálásában tehát a tumortömeg nagyságát valamint a bcr-abl kiméra gén expresszióját szükséges vizsgálni. Az előbbi meghatározásához (α -IFN terápiás éra) vizsgáltuk a bcr-abl átrendeződést (Ph-kromoszóma) hordozó sejtek arányát fluorescens in situ hibridizációval a perifériás vérsejtek interfázis magjain (iFISH), az utóbbi meghatározásához pedig kvantitativ, kompetitív reverz transzkripció polimeráz láncreakciót (Q-RT-PCR) dolgoztunk ki **(121, 134)**. A 68 beteg összesen 155 vérmintáin végzett vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy a két biológiai paraméter milyen tartományt képvisel, mutat-e korrelációt kezeletlen betegekben és milyen változást mutat kezelés hatására, mivel a tanulmány lezárásig csak a Ph^+ sejtek arányával jellemzett tumortömeget vették a therápiás válaszok követésében alapul. A hazai irodalomban ilyen jellegű molekuláris monitorizálásról (a tanulmány lezárásáig) nem számoltak be CML-ben, a néhány nemzetközi közlés eredménye pedig ellentmondásos volt **(124, 125, 126, 135, 136)**. Emellett a TKI terápiás érárt reprezentáló 197 beteg 1165 csontvelő illetve vér vizsgálati anyagán is vizsgáltuk a két paraméter összefüggéseit, az előbbit (tumortömeg) kariotipizálással és iFISH eljárással, az utóbbit (expresszió) valós idejű kvantitativ PCR (RQ-PCR) módszerrel **(97)**. A monitorizálás során felmerülő igény kapcsán vizsgáltuk az iFISH jelek automatizált kiértékelésének lehetőségét is **(137)**.

3.3.3.b. Eredmények

Hatvannyolc bcr-abl átrendeződésre pozitív CML-es beteg összesen 155 mintájában kvantitatívan vizsgáltuk a bcr-abl expressziót (α -INF éra). Egy követett beteg mintája kivételével (aki azonban a betegség kezdetén pozitív volt) minden mintában detektálható volt a bcr-abl kimera mRNS. Csak olyan betegeket vontunk be a tanulmányba, akik vagy b3a2 vagy b2a2 típusú expressziót mutattak, akik mindkettőt, azokat kizártuk a vizsgálatból. Csak egy beteg esetében észleltük a fenti expressziós minta változását a követés során: betegsége a diagnosiskor b3a2 típusú expressziót mutatott, mely azonban a későbbiek folyamán kevert expresszióba fordult, ezért a feldolgozásból kizártuk. A 68 betegből 33 (48.5%) expresszáta a b2a2, míg 35 (51.5%) a b3a2 típusú transzkriptumot. Nem volt érdemi különbség a két expresszió típusnak a különböző citogenetikai válasz csoportokban történő megoszlásában, eltekintve a komplett citogenetikai válasz kategóriától, ahol a b2a2 expresszió 5x gyakoribb volt, mint a b3a2 típusú (10 vs 2 beteg).

iFISH vizsgálat és eredmény mind a 155 mintából rendelkezésre állt. Az 51 kezeletlen beteg perifériás vérsejtjeinek (PV) átlagosan $76\% \pm 11\%$ -a bizonyult Ph^+ -nak. A dupla Ph kromoszómát tartalmazó sejteket nem vettük súlyozottan figyelembe. A követéses minták megoszlása a különböző citogenetikai válasz csoportokban (iFISH-PV) a következő volt: komplett (n=12), major (n=29), minor (n=36), nincs válasz (n=27).

A Q-PCR tesztel a legalacsonyabb detektálható bcr-abl mennyiség 0.01 fM volt, az összes mintát figyelembe véve a bcr-abl mennyisége 0.01-1000 fM, míg a bcr-abl transzkriptum szám/ μ g RNS 16 és 1 000 000 (átlag: 38 200) között változott. A Q-PCR-rel detektálható legkisebb abl mennyiség 3 fM volt, az összes minta alapján az abl mennyisége 10 – 1000 fM, míg az abl transzkriptum/ μ g RNS 1 260 és 3 990 000 (átlag: 317 000) között változott. Egy minta kivételével mindegyikben detektálható és kvantálható volt a bcr-abl expresszió. Ezt a követéses mintát valódi PCR negatívnak fogadtuk el – az érzékenységi határt figyelembe véve, – mivel az abl jól amplifikálható volt. Az abl transzkriptum számot belső standardként határoztuk meg és a bcr –abl expressziót a bcr-abl vs abl transzkriptum szám arány/ μ g RNS-ben is kifejeztük. Kettő szeparált RT reakció helyett a bcr-abl valamint az abl Q-PCR reakciókhoz szükséges cDNS-t egy és ugyanazon RT reakcióban állítottuk elő, mely a bcr-abl/abl arány kalkuláció hibáját 150%-ról 20%-ra csökkentette. A bcr-abl/abl arány 0.01% és 100 % között változott.

3.3.3.1. Táblázat Abszolút számban valamint bcr-abl / abl arányban kifejezett bcr-abl transzkripció a különböző citogenetikai válasz csoportokban (iFISH perfériás vér) valamint kezeletlen CML-es betegekben (121).

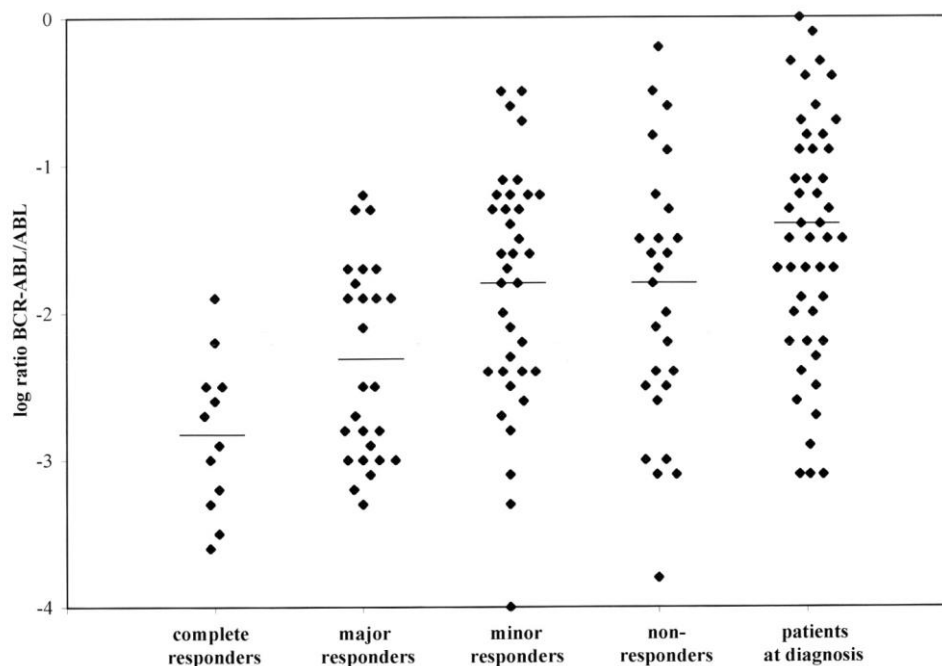
Citogenetikai válasz	Betegek száma	transcript/ μ g RNS	Bcr-abl/abl arány (%)
komplett (0%)	12	20-1590 (431; 508)*	0.025-1.26 (0.28; 0.34)*
Major (1-33%)	29	20-7960 (1150; 1560)	0.050-6.31 (1.18; 1.59)
minor (34-66%)	36	16-126000(11500; 25000)	0.010-31.6 (5.28; 8.24)
Nincs válasz (>66%)	27	16-252000 (20000; 51800)	0.016-63.1 (6.75; 13.5)
Kezeletlen beteg	51	40-1000000 (96500; 201000)	0.079-100 (20.0; 37.8)

* Az átlag és a standard deviáció zárójelben.

Bcr-abl transzkriptum szám az egyes citogenetikai válasz csoportokban széles tartományban változott, de egy csökkenő tendencia, nevezetesen 5, 4 majd 2 nagyságrend különbség volt azonosítható a minimum és maximum értékek között a kezeletlen betegek, majd a nem válaszoló illetve minor válasz végül a major illetve a komplett válasz csoportban (3.3.3.1. táblázat). Az összes mintában összehasonlítva a Ph⁺ vérésejtek arányát a bcr-abl transzkriptum számmal vagy a bcr-abl/abl aránnyal egyaránt gyenge korrelációt észleltünk ($r = .30$ és $r = .31$). Egyedi betegek szintjén vizsgálva a két paramétert megállapítható volt, hogy az optimális, azaz mindkét érték folyamatos (és jelentős) csökkenése csak a betegek egy hányadában volt megfigyelhető. Nagyrészt minden egyéb kombináció előfordult, például, nem csökkenő tumortömeg mellett (citogenetikai válasz hiánya) szignifikánsan csökkenő (zuhanó) bcr-abl expresszió vagy ennek fordítottja.

A kezeletlen betegek bcr-abl expresszióját összehánlítva a különböző citogenetikai válasz csoportokban észleltekkal megállapítható volt, hogy ez a nem válaszoló és a minor válasz csoporttól szignifikánsan nem ($p > 0.01$), csak a major és a komplett citogenetikai választ adók értékeitől különbözött szignifikánsan ($p < 0.001$) (3.3.3.2. ábra). Továbbá, citogenetikai válasz csoportokon belül az egyetlen szignifikáns különbség a bcr-abl expresszióban a minor és a major válaszolók között volt ($p < 0.01$), míg ilyen a nem válaszolók és a minor csoport illetve a major és a komplett citogenetikai választ adók között nem volt regisztrálható.

A TKI korszakban – a nemzetközileg bevezetett citogenetikai és molekuláris válasz kategória definíciók miatt is – különös tekintettel vizsgáltuk a csontvelői kariotipizálás alapján meghatározott citogenetikai válasz típusok valamint a csontvelői iFISH+ sejtarány összefüggéseit. Az eredmények szoros korrelációt mutattak ($r = 0.96$, $n = 94$).

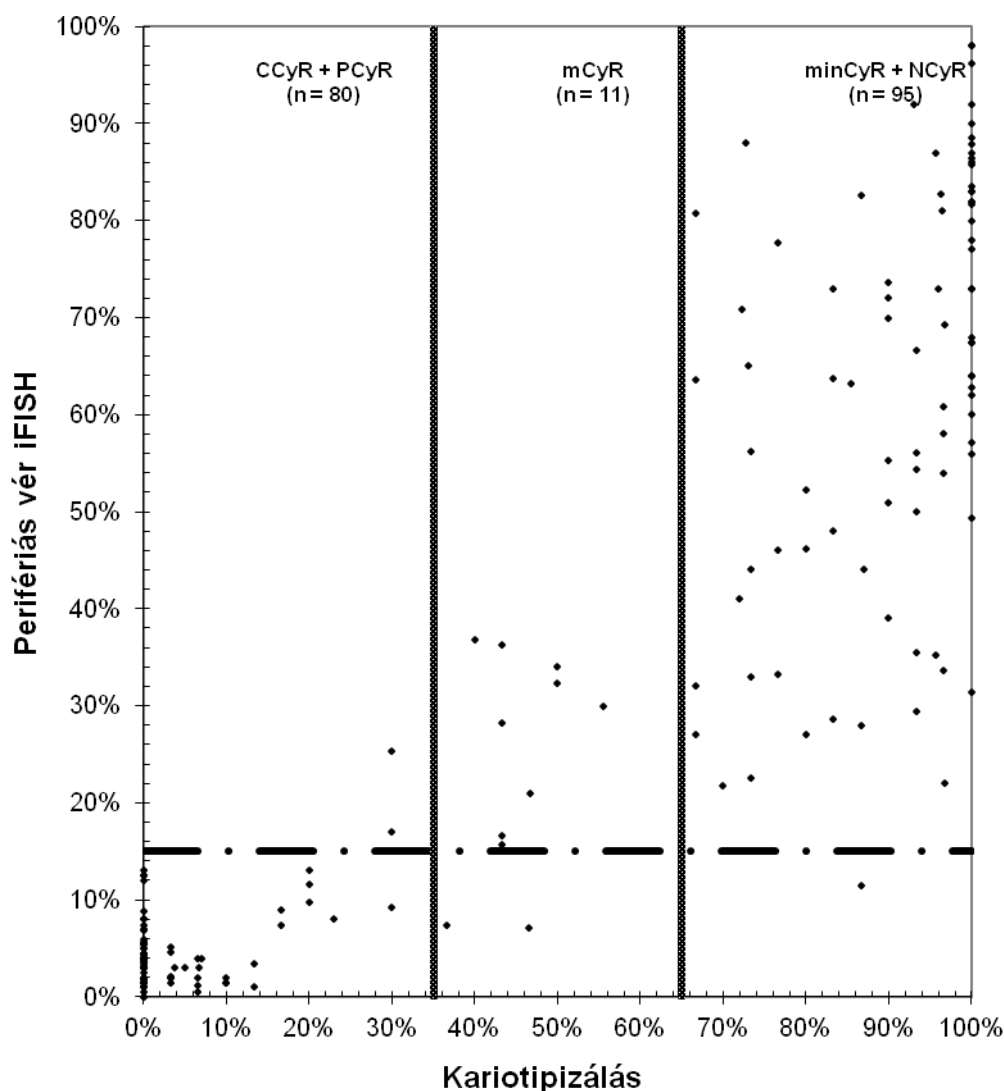


3.3.3.2. ábra A bcr-abl/abl arányban kifejezett bcr-abl expressziós értékek megoszlása valamint ezek átlagai az egyes citogenetikai válasz csoportokban. Ebben a paraméterben csak a major és a komplett citogenetikai választ adók különböztek szignifikánsan ($p < 0.001$) a kezeletlen betegektől valamint a többi, α -IFN kezelt betegtől (nincs válasz vagy minor citogenetikai válasz csoport) (134).

Megállapítottuk, hogy 15 %-os 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 %) (3.3.3.3. ábra).

Az automatizált iFISH vizsgálatok során a DAPI+ magok felismerési kritériumrendszere alapján a sejtmag felismerés szenzitivitása 88.7 %-nak bizonyult. A morfolometriai paraméterek alapján nyert szkettergram segítségével az egyedi sejtek 99.9 %-os tisztasággal voltak a további analízishez kikapuzhatóak (3.3.3.4. ábra).

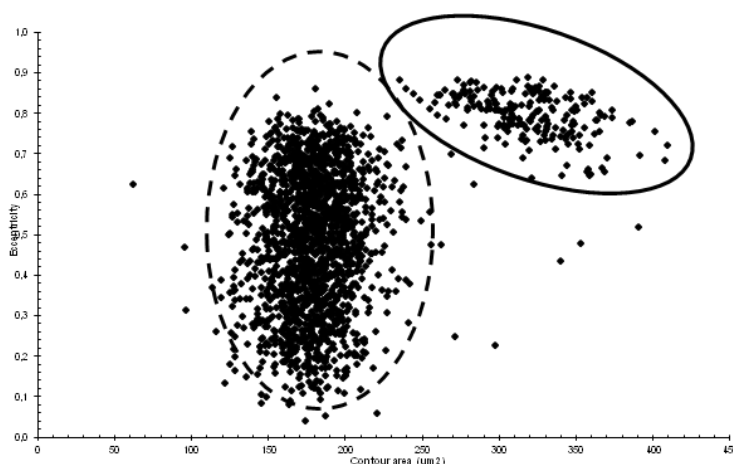
Az iFISH szignal detektálás során a piros szignálszám korrekten került felismerésre a magok 84.9 %-ában, míg a zöld szignálszám 80.9 %-ban, tehát mindkét színben a szignálszám korrekten került felismerésre a sejtmagok 68.7 %-ában. A korrekt felismerés legfőbb akadályai a következők voltak: hasadt szignál, , random kolokalizáció, nagy háttér



3.3.3.3. ábra A kariotipizálás illetve perifériás vérmintán elvégzett iFISH eredményeinek összevetése (97).

fluoreszcencia, egy magban az iFISH jelek közötti nagy intenzitás különbség valamint autofluoreszcens artefaktok.

Az iFISH szignál távolság mérések során meghatároztuk a különböző színű szignálok közötti legrövidebb távolság eloszlást 100 %-ban Ph negatív illetve pozitív minták sejtmagjain, majd a legrövidebb távolság vágási pontot 0 – 10 pixel között változtatva meghatároztuk a helyesen pozitívnak illetve negatívnak felismert magok %-os arányát, azaz a rendszer szenzitivitását valamint specificitását (3.3.3.5. A-C ábra). A legjobb transzlokációs mintázat felismerés és így a legjobb állapot (Ph+ ill. Ph-) besorolás 5 pixel-nél (0.84 μm) adódott.

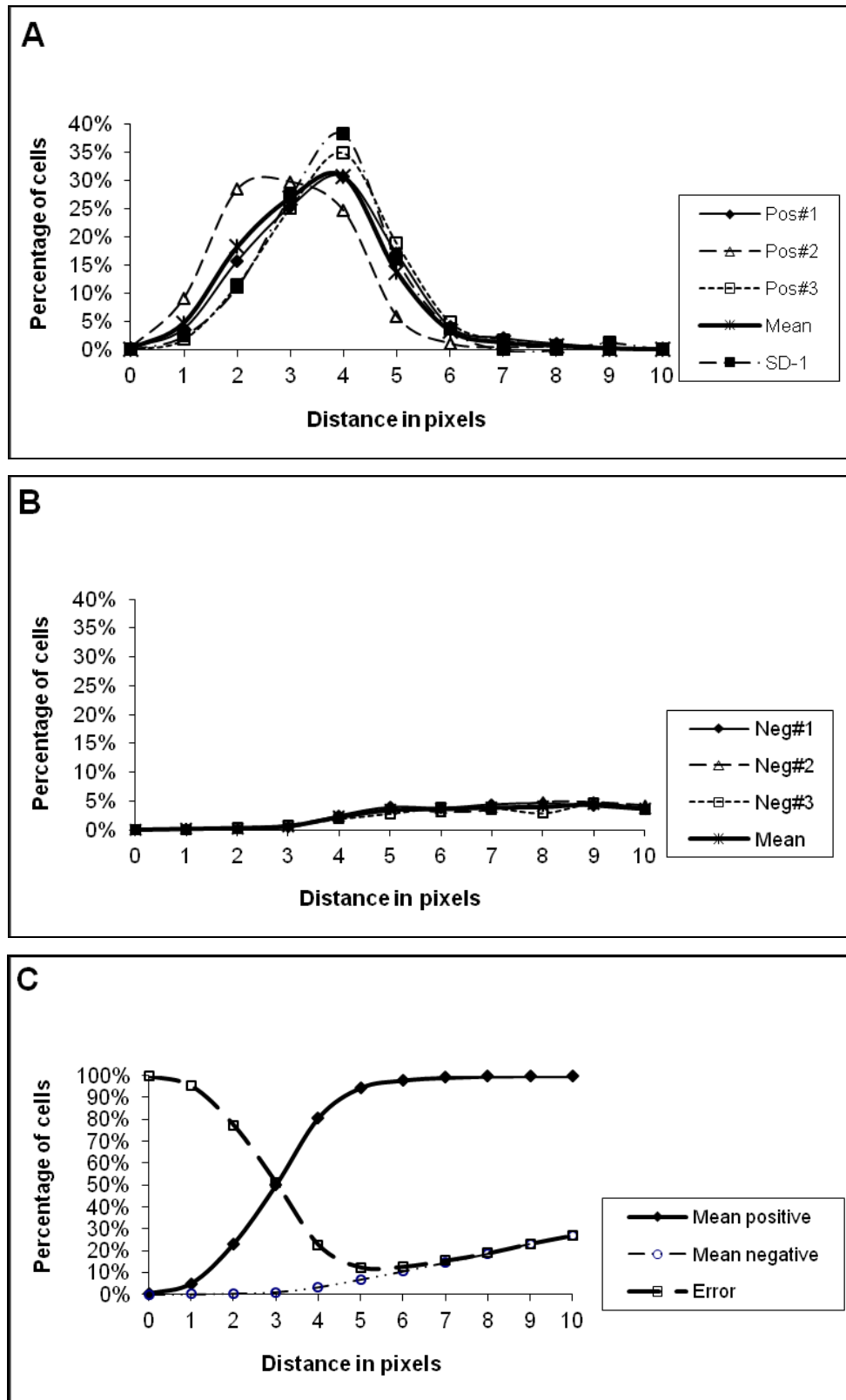


3.3.3.4. ábra A DAPI+ sejtmagok kontur área és excentricitás paraméterei alapján nyert szkettergram. Szaggatott vonal: izolált, nem átfedő sejtek, folytonos vonal: átfedő vagy összetapadó sejtek. Az excentricitást az objektumra helyezett virtuális ellipszis hosszabb (A) és rövidebb (B) átlója alapján, a következő képlet szerint számolta a rendszer: $\sqrt{1 - \frac{B}{A}}$ (137).

A fals pozitív arány (FPR) és a fals negatív arány (FNR) a manuális illetve az automatizált értékelésnél 5.8% ($\pm 1.5\%$) és 2.7% ($\pm 7.3\%$) illetve 7.0% ($\pm 2.7\%$) és 5.5% ($\pm 8.0\%$) értékeknek bizonyult. A kétfajta értékelés eredményei erős, lineáris korrelációt mutattak ($R^2 = 0.985$). Manuálisan minden esetben 200 sejt került kiértékelésre, ez a szám az automatizált vizsgálatnál átlagosan 1,177 (380 - 3,520) volt. Manuális értékeléssel az egyes minták átlagaitól való eltérés tartománya kb 4-szerese (8.3% vs 32.2%) volt az automatizált értékelésnél nyertnek. Ez a tartomány az interobserver variabilitást reprezentálja.

3.3.3.c. Diszkusszió

A tanulmányban CML-ben szenvedő 51 kezeletlen és 104 IFN- α kezelt beteg követéses vérmintáit vizsgáltuk bcr-abl expresszióra és a tumortömeg mennyiségére annak érdekében, hogy a két paraméter kapcsolatát a betegség monitorizálása szempontjából feltárjuk. Az első céljára kompetitív, kvantitativ RT-PCR-rel határoztuk meg a bcr-abl/abl arányt. A felhasznált kvantitativ PCR más volt, mint amit e célra eredetileg alkalmaztak, de az alap principium attól nem különbözött (138). A tumortömeget a bcr-abl átrendeződésre pozitív perifériás vérsejtek százalékos arányával jellemeztük. Erre iFISH-t alkalmaztunk konvencionális citogenetikai analízis (CCA) helyett, mivel az elsónél a mintavételi hiba kisebb, a sejtenyésztés során előforduló klonális szelekcióval nem kell számolni és a molekuláris átrendeződéseket is kimutatja (139, 140, 141). CML-ben a iFISH valamint a CCA eredményei között jó korrelációt írtak le, mely szerint a tumortömeg jellemzésére mindkét



3.3.3.5. ábra. A legrövidebb szignál távolság eloszlása pozitív (A) illetve negatív (B) mintákban, 1 pixel = 0.168. C: a legrövidebb jeltávolság vágási pont alapján diszkriminált pozitív sejtek %-os aránya (Y tengely) pozitív illetve negatív sejtekben. A helytelen besorolás aránya (error) összességében 5 pixel-nél (0.84 μ m) volt a legalacsonyabb, 12.5 % (137).

3.3.3.2. Táblázat. A manuális és az automatizált jelfelismerés összehasonlítása (l. 2.3.3.a. pont) (137)

	Manuális eredmények (%)				Automatizált eredmények (%)			
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>Átlag</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>Átlag</u>
<u>N-1</u>	<u>6.3</u>	<u>3.6</u>	<u>7.9</u>	<u>5.9</u>	<u>9.0</u>	<u>6.5</u>	<u>8.0</u>	<u>7.8</u>
<u>N-2</u>	<u>7.3</u>	<u>3.5</u>	<u>8.0</u>	<u>6.3</u>	<u>6.0</u>	<u>9.0</u>	<u>7.0</u>	<u>7.3</u>
<u>N-3</u>	<u>3.8</u>	<u>3.8</u>	<u>8.4</u>	<u>5.3</u>	<u>3.5</u>	<u>5.5</u>	<u>5.5</u>	<u>4.8</u>
<u>P-1</u>	<u>66.5</u>	<u>50.0</u>	<u>49.0</u>	<u>55.2</u>	<u>47.5</u>	<u>54.0</u>	<u>55.5</u>	<u>52.3</u>
<u>P-2</u>	<u>96.1</u>	<u>94.2</u>	<u>91.9</u>	<u>94.1</u>	<u>95.5</u>	<u>91.5</u>	<u>89.5</u>	<u>92.2</u>
<u>P-3</u>	<u>89.2</u>	<u>84.8</u>	<u>93.2</u>	<u>89.1</u>	<u>82.0</u>	<u>84.0</u>	<u>84.5</u>	<u>83.5</u>

<u>SD-1</u>	<u>94.6</u>	<u>98.0</u>	<u>99.3</u>	<u>97.3</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>95.6</u>
<u>CML1-18</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>	<u>.....</u>
<u>dev.átlagtól</u>								
<u>átlag</u>	<u>1.5</u>	<u>1.9</u>	<u>-1.2</u>		<u>0.2</u>	<u>-0.1</u>	<u>-0.1</u>	
<u>tartomány</u>	<u>20.7</u>	<u>11.4</u>	<u>22.9</u>		<u>8.3</u>	<u>6.0</u>	<u>8.2</u>	

technika megfelelő (142, 143). Azonban a két technikával vizsgált célpopuláció csak részleges átfedést mutat, ezért az aktuális számok eltérőek lehetnek (144, 145, 146, 147). A monitorizálás véresejt mintákon történt, mivel ez a legegyszerűbb és leggyakoribb módszer és a csontvelő és a vér citogenetikai eredményei között jó korreláció áll fenn CML-ben (148)

A két paraméter együttes követése fontos lehet CML monitorizálásában, mivel a bcr-abl kiméra termék interakcióba lép a p145 összejt faktor receptorral (SCF-R) és a negatív növekedési stimulust dózis függő módon megszünteti (149, 150). Így, a bcr-abl expresszió mérése a betegség malignus potenciáljának kvantitálását jelenti. Másrészt a tumortömeg ismerete a betegség kezdetén illetve ennek változása kezelés hatására minden daganat kezelési stratégia kulcsfontosságú eleme. A bcr-abl kvantitálása a iFISH átlagosan 5-100 % közötti mérési tartományát nagyságrendekkel növeli, s bár a 10^{-6} szintű minimális reziduális betegség szerepe a klinikai döntéshozatalban vita tárgyát képezi, egy rákos sejtburjánzást előidéző aberráns molekula koncentrációjának 5 nagyságrendnyi skálán történő változását figyelmen kívül sem célszerű hagyni (135).

A tanulmány befejezéséig 5, IFN- α kezelt CML-es beteg monitorizálásában kvantitativ PCR-t és citogenetikát felhasználó publikációt ismerünk. Négyben CCA-t, egyben CCA-t és iFISH-t egyaránt alkalmaztak. Ezekből kettőben az expressziót csak komplett citogenetikai választ mutató CML-es betegekben vizsgálták (151, 152). A tanulmányunkban

észlelt, ugyanilyen citogenetikai válaszcsoportba tartozó betegek expressziójának alsó határértékei nagyon hasonlóak voltak a közölt eredményekhez, de mi csak 2 nagyságrendnyi különbségeket észleltünk – szemben a közölt 4 nagyságrenddel – ebben a csoportban. Egy harmadik tanulmányban a bcr-abl expresszió szintjét statisztikailag nem korreláltatták a különböző citogenetikai válasz csoportokban, de az individuális betegek szintjén az esetek többségében nem találtak korrelációt a citogenetikai válasz és a Q-PCR adatok között **(153)**.

A maradék két tanulmányban a citogenetikai csoportokat *Kantarjian et al (1995)* nyomán a csontvelői metafázis valamint interfázis adatok alapján állították fel, mely eltér attól, amit mi a tanulmányunkban használtunk **(143, 146, 154)**. Egy iFISH tanulmányban, ahol a kezeletlen betegek átlagos Ph⁺ vörsejtjeinek aránya 76% ± 11%, a nem válaszolók illetve a minor választ mutatók közötti 94%-os Ph⁺ sejtarány határ felállítása nem valósítható meg. Miután kezeletlen betegeinkben a Ph⁺ vörsejtek aránya a felső harmadban mozgott, tanulmányunkban a minor és a major citogenetikai választ úgy határoztuk meg, hogy ez az érték a középső illetve az alsó harmadban legyen. Emiatt adatainkat csak ezen különbségeket figyelembe véve lehet összehasonlítani a hivatkozott két munkával, melyben azt találták, hogy a bcr-abl expresszióban szignifikáns különbség volt az egyes citogenetikai válasz csoportok között, kivéve a kezeletlen betegek és a nem válaszolók között (egyik tanulmányban) valamint a parciális válasz (< 35 % Ph⁺ metafázis) és a komplett citogenetikai válasz csoport között (másik tanulmány). Tanulmányunkban a nem és a minor válaszolók nem, csak a major és a komplett válaszolók bcr-abl expresszió szintjei különböztek szignifikánsan a kezeletlen betegekeitől. Továbbá, a komplett és a major válaszolók szignifikánsan különböztek a bcr-abl /abl arányban a minor és nem válaszoló csoporttól, de egyik sem különbözött ebben a paraméterben az első illetve a második kategóriában egymástól. Ez azt jelenti, hogy a bcr-abl expresszió, tehát a malignus fenotípus szignifikáns változása szempontjából a perifériás vörsejtekben iFISH-sel meghatározott reziduális tumortömeg csak két kategóriában prediktív: 33%-nál kevesebb vagy több Ph⁺ sejt marad a kezelés hatására (major citogenetikai válasz vagy annak hiánya). Ezen megfigyelésünk összhangban lehet azon közléssel, hogy csak azon α-IFN kezelt CML-es betegek mutatnak szignifikánsan hosszabb túlélést, akikben legalább major citogenetikai válasz alakult ki **(154)**. A Ph⁺ perifériás vörsejtarány (tumortömeg) valamint a bcr-abl expresszió szintje között összességében – kezeletlen és kezelt betegben is – gyenge korrelációt találtunk, mellyel egyező és ellentétes közlések is vannak **(143, 146, 153)**. A korreláció hiánya azonban nem meglepő, hiszen a bcr-abl expressziójában megnyilvánuló nagyságrendnyi különbségek, ennek pozitív korrelációja a myeloid differenciálódással

valamint a nem-expresszázó, néma ('silent') állapot jól dokumentáltak (**100, 155, 156, 157, 158, 159, 160**). A két paraméter nagyrészt independentes változását betegeink is jól demonstrálták, ahol is a két paraméter korrelált változása mellett minden egyéb variáció is előfordult.

A tirozin kináz inhibitor korszakban végzett vizsgálataink még tovább pontosították az iFISH eljárással meghatározott bcr-abl+ perifériás tumortömeg arányának prediktív szerepét. 15 % alatti perifériás Ph+ arány 96.3 %-os illetve 97.9 %-os pozitív illetve negatív értékkel prediktív major citogenetikai válaszra nézve. A perifériás iFISH Ph+ sejtarány meghatározása felértékelődött. A CML legújabb (2014) 'diagnosis, monitoring and management' összefoglalója szerint, a 6. és 12 hónapos negatív perifériás (!) iFISH eredmény stabil komplett citogenetikai választ (CyCR) jelez (**101**). Ugyanezen állásfoglalás szerint a RQ-PCR szerinti bcr-abl expresszió, a major molekuláris válasz (MMR; bcr-abl kópiaszám < a nemzetközi skála /IS/ szerinti kezeletlen szint 10^{-3} része) jelentősége vitatott, mivel CCyR esetén a MMR-t adó illetve nem mutató betegek túlélési adatai nem különböznek egymástól. Ez azt jelenti, hogy CCyR-t produkáló betegeknél a legmegbízhatóbb (és legegyszerűbb) monitorizálás a perifériás Ph+ iFISH meghatározás. Ehhez elsőként irtuk le komplett morfometriai paraméterekkel, részletes statisztikai vizsgálattal valamint vetettük össze manuális meghatározással az automatizált mikroszkópos, 3D jelmintázat felismerésen alapuló Ph+ sejt meghatározást.

Következtetéseink:

1. A bcr-abl expresszió és a perifériás tumortömeg nem korrelál egymással kezeletlen betegeknél és nagyrészt egymástól függetlenül változik α -IFN kezelt CML-es betegeknél.
2. Kevesebb, mint 33%-os perifériás reziduális tumortömegnek (major perifériás vér iFISH citogenetikai válasz) van csak a szignifikáns bcr-abl expresszió csökkenés elérése szempontjából prediktív ereje.
3. Tirozin kináz inhibitorral kezelt CML-es betegeknél az iFISH-sel kevesebb, mint 15% Ph+ perifériás vérsejt 96.3 % illetve 97.9 % pozitív és negatív prediktív értékkel jelzi a major citogenetikai választ (MCyR). Ez is jelzi a perifériás vér iFISH vizsgálatának jelentőségét a Ph+ CML monitorizálásában.
4. 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 iFISH értékelő mikroszkópos eljárást dolgoztunk ki, elsőként.

3.4. Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív B-sejtek klonális evolúciója T-sejtes lymphomákban

3.4. a. Bevezetés

Hodgkin és Reed-Sternberg típusú, egy és többmagvú óriássejtek reaktív és daganatos körülmények között is előfordulhatnak. Az első gyakorlatilag kizárólag mononucleosis infectiosában lehetséges, míg az utóbbira számtalan példa van. Tumoros, HRS típusú vagy szerű sejtek létezhetnek anaplasias carcinomától diffúz nagy B-sejtes lymphomán (DLBCL), T-sejt gazdag B-sejtes lymphomán (TCR-BCL), anaplasias nagy sejtes lymphomán (ALCL) vagy perifériás T-sejtes lymphomán (PTCL) keresztül – nyilvánvalóan – klasszikus Hodgkin lymphomáig (cHL) terjedő spektrumú daganatokban. Morfológiai differenciál diagnosztikai probléma kevéssé merül fel, ha a HRS sejtek éretlen, agresszív típusú lymphoma sejtek között fordulnak elő, de akkor igen, ha a szórványos HRS sejtek egy kevertsejtes vagy monoton, de mindenképpen differenciálnak tűnő háttérben helyezkednek el.

A PTCL nem csak morfológiai, de immunfenotípusban is átfedést mutathat cHL-val, mivel a PTCL-ben előfordulhatnak CD30–CD15 és T-sejt marker pozitív HRS típusú sejtek egy eosinophileket, lymphocytákat, histiocytákat és plasmasejteket felvonultató kevertsejtes háttérben **(1)**. Ezt az entitást a közelmúltban CD30⁺ és CD15⁺ HRS-szerű sejteket tartalmazó PTCL-ként közölték, mely valószínűleg legalább egy részét képezi – de lehet, hogy a létét is megkérdőjelezi – a nagyon ritka T-sejt eredetű cHL-ként leírt elváltozásoknak **(2, 3)**. A PTCL és a cHL közötti differenciálást tovább komplikálja az 1999-ben leírt, a cHL-t utánzó, PTCL ritka variánsaként közölt 3 eset **(4)**. Ezek a PTCL típusú daganatok konstansan Epstein-Barr vírus (EBV)⁺ és CD30⁺, T-sejt marker negatív HRS típusú sejteket tartalmaznak, melyek CD15 és B-sejt marker expressziója változó, pozitívak és negatívak is lehetnek. Ezen HRS sejtek 'egy-sejt' molekuláris analízise B-sejtes genotípust, de a monoklonalitás hiányát találta. Az eredményeket úgy interpretálták, hogy ez a komponense a PTCL-nek nem neoplastikus és a PTCL asszociált immunszuppresszió következtében EBV hatására bekövetkező reaktív, poliklonális – oligoklonális B-sejt propagációnak felel meg. A PTCL patomorfológiát azonban nagyon komplexé teszi az EBV⁺ elszórt, immunoblast jellegű sejtek vagy az EBV⁺ éretlen B-sejtekből felépülő homogén sejtlemezek jelenléte. Ezen körülmények a PTCL vs T-sejt gazdag B-sejtes lymphoma valamint a kompozit PTCL és cHL illetve DLBCL differenciálását illetve diagnosztikáját jelentősen megnehezítik **(5, 6, 7, 8, 9, 10)**.

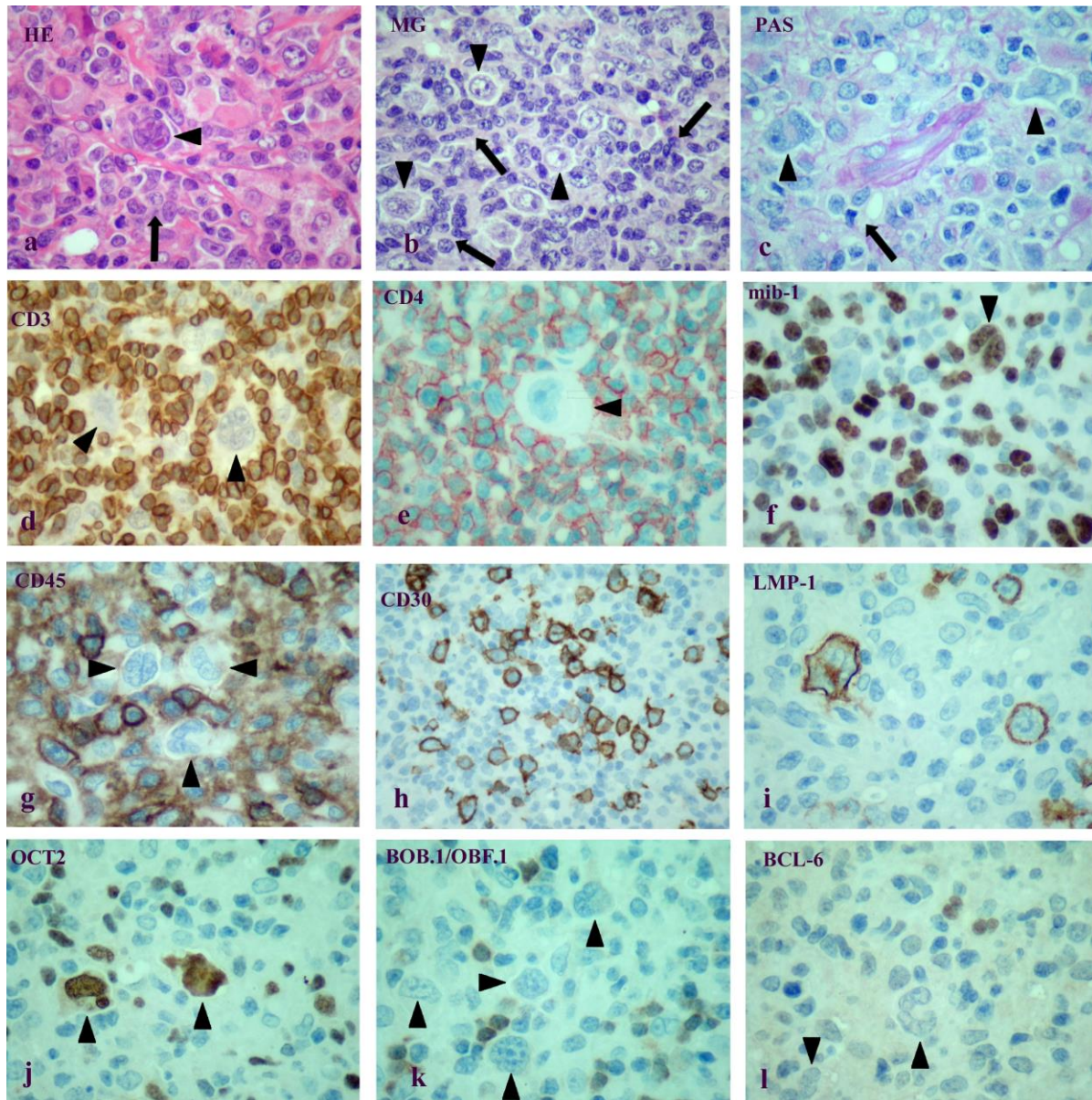
Jelen tanulmányban három, szórványos, EBV⁺ HRS sejteket tartalmazó PTCL esetét írjuk le (betegtörténet: lsd. 2.4.a.1.-3. pont). Egy esetben a HRS-szerű sejtek aktivált B-sejt

fenotípust és poliklonális immunglobulin nehézlánc (IgH) génátrendeződést mutattak. A másik kettő esetében, azonban, az izolált HRS sejtekben monoklonális IgH génátrendeződés és a cHL HRS sejtjeivel megegyező fenotípus volt bizonyítható. Ennek alapján azt a konklúziót vontuk le, hogy a PTCL által előidézett immunszuppresszióban EBV infekció/reaktiváció hatására atipusos, morfológiailag, geno- és fenotípusban a cHL HRS sejtjeitől megkülönböztethetetlen óriássejtek alakulhatnak ki.

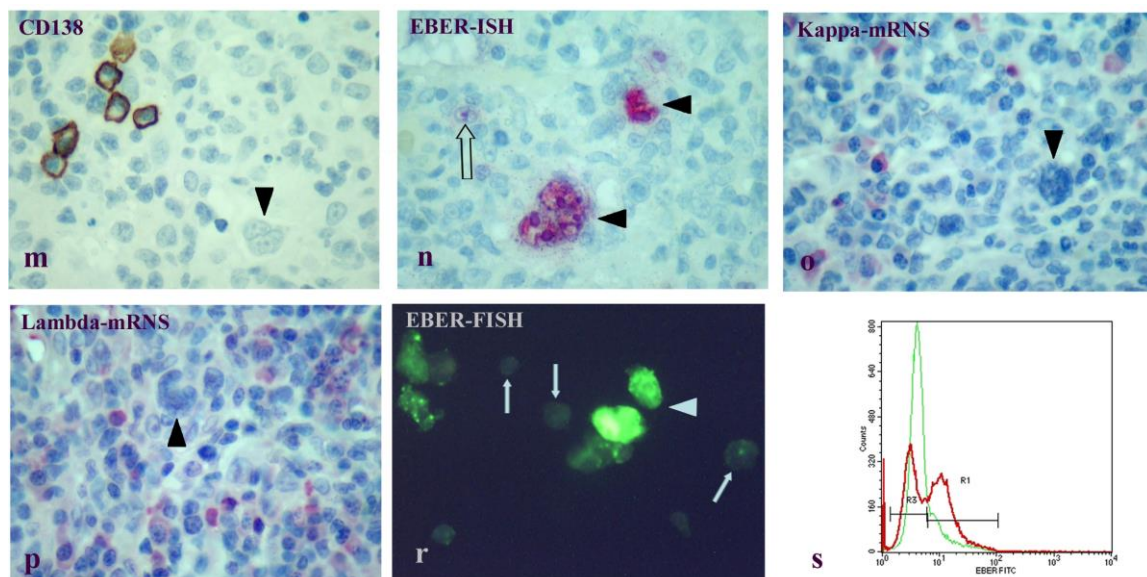
Ezen rendkívül egyedi konstelláció és a tisztázatlan patogenezis miatt archivált 365 PTCL anyagát vizsgáltuk meg EBV pozitivitás és nem T-sejtes proliferátum szempontjából. Az utóbbi gyakoriságát, a növekedési mintázata jellegét, a fenotípusát és az immunglobulin nehézlánc gén (IgH) állapotát kívántuk megállapítani.

3.4.b. Eredmények

3.4.b.1. Patohisztológiai leletek Mindhárom nyirokcsomóban az alapszerkezet elmosott volt és a szöveti képet szabálytalan magvú, kis–középnagy sejtekből felépülő infiltrátum uralta. Gondos vizsgálat alapján az infiltráló sejtek citológiai atipia jeleket mutattak az 1.sz. esetben, míg az atipia sokkal nyilvánvalóbb volt a másik két esetben. A reaktív celluláris háttér plasmasejtekből, epithelioid sejt irányú transzformációt nem mutató histiocyták kis csoportjaiból, nagyszámú (1.sz. eset) vagy kevés (3.sz. eset) eosinophil sejtből valamint kifejezett, arborizáló magas endothelű venula (HEV) hálózathálóból állt. ‘Kiégett’, atrophias centrum germinativumok egyik laesioban sem fordultak elő. Mindhárom elváltozásban és az infiltrátumok teljes területén szórványos mono- és multinuclearis óriássejtek voltak megfigyelhetők. Az 1. és a 3.sz. esetben a nagy sejtek HRS sejtekre emlékeztető vesiculáris magchromatinnal és inclusio-szerű, óriás nucleolussal rendelkeztek, míg a 2. sz. esetben a nagy sejtek inkább mononuclearis, nagyrészt immunblast illetve centroblast jellegű sejteknek feleltek meg és az inclusio jellegű nucleolus csak kevésbé jellemezte őket (3.4.1.a.-c. ábra). Megemlítendő, hogy az 1. sz. betegből a terápia sikertelenség miatt vett második, majd harmadik nyirokcsomó és bőrbopsia mindenben a fenti szövettani leírásnak megfelelő elváltozást mutatott, de óriássejtek már egyáltalán nem fordultak elő benne.

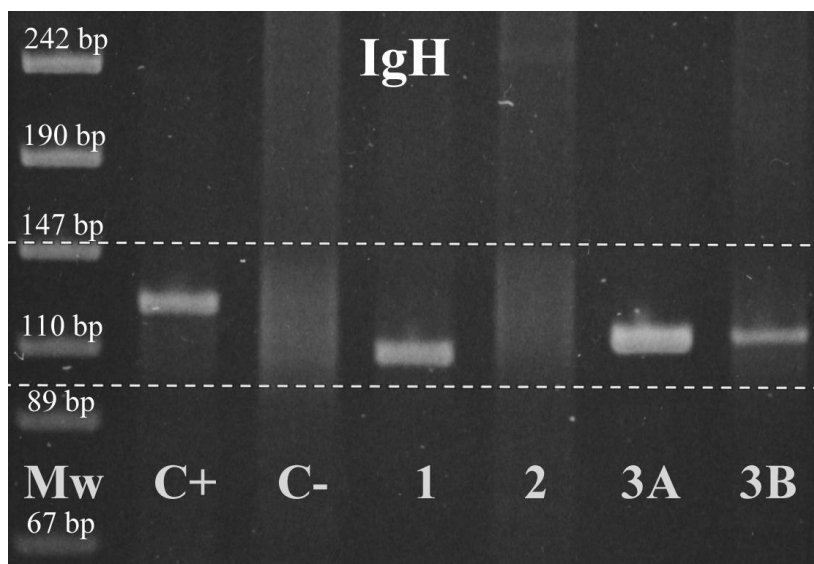


3.4.1. ábra A három PTCL-ban észlelt morfológiai, immunhistológiai és in situ hibridizációs leletek. A kis – közepes nagyságú, atypusos sejtekből (nyilak), kevert gyulladásos sejtelemből és szórványos, nagyméretű HRS-szerű sejtekből (nyílhegyek) felépülő PTCL morfológiai spektruma az 1. sz. (a), a 2. sz. (b) valamint a 3. sz. (c) betegben. A HRS-szerű sejtek egy része a 2. sz. esetben inkább immunoblast-centroblast jellegű mononuclearis elemnek felel meg. d-i az 1. sz. nyirokcsomót mutatja, az atypusos háttérsejtek homogénen pozitívak CD3 (d) és CD4 (e) markerekre, de ezekre a HRS-szerű sejtek negatívak; nem csupán a HRS-szerű sejtek pozitívak proliferációs markerrel, de a kis- középnagy háttér T-sejtek is magas proliferációs frakciót mutatnak (f), a HRS-szerű sejtek CD45 negatívak (g), CD30 (h) és LMP-1 (i) pozitívak, a kis nagyítású kép (h) szemlélteti a szórványos CD30+ HRS-szerű sejtek denzitását. j-m 3. sz. beteg, a HRS-szerű sejtek erős nuclearis pozitivitást mutatnak OCT2 transzkripció faktorra (j), de negatívak BOB1/OBF.1 transzkripció ko-aktivátorral (k) valamint BCL-6 (l) és CD138 (m) markerekre (reaktív B-sejtek, plasmasejtek pozitív belső kontrollként szolgálnak mind a négy esetben);



3.4.1. ábra A három PTCL-ban észlelt morfológiai, immunhistológiai és in situ hibridizációs leletek. /folytatás/

n-p 1. sz. eset, a HRS-szerű sejtek erős nuclearis jelölődése mellett néhány, szórványos kis sejt (üres nyíl) is pozitív EBER *in situ* hibridizációval (n), sem kappa (o) sem lambda (p) könnyűlánc mRNS expressio nem mutatható ki a HRS-szerű sejtekben, de a reaktív plasmasejtek pozitívan jelölődnek. r pozitív nagy (fehér nyílhegy) és negatív kis (fehér nyilak) magok a suspensióban elvégzett EBER-FISH reakcióval; s az EBER-FISH reakcióval jelölt magok flow citometriás fluoreszcens eloszlás görbéi, zöld vonal: reaktív nyirokcsomó, piros vonal: 1.sz. beteg, R1: szortírozó ablak. h 200 x, a többi kép esetében 400 x, HE hematoxylin-eosin, MG metilált Giemsa, PAS, perjódsv-Schiff reakció (11).



3.4.2. ábra Az IgH gén FR III PCR amplifikációs termék gél elektroforézis képe. Mw molekulásúly standard, C+ és C- pozitív és negatív kontrol, 1, 2 és 3B az 1.sz., 2.sz. és a 3. sz. beteg nyirokcsomóból flow szortírozott, EBER+ óriássejtekből nyert DNS-nek felel meg, 3A 3.sz. beteg teljes szövet DNS extraktum. A 'kenet' típusú gékép a 2. sz. beteg EBER+

óriássejtjeinek polyclonalis jellegére utal, míg ezen típusú sejtek az 1. sz. és a 3. sz. beteg esetében monoclonalis IgH génátrendeződést mutatnak. A 3. sz. beteg esetében a teljes szöveti DNS-ből valamint az EBER+ óriássejtekből izolált DNS-ből megegyező mólsúlyú amplifikátum volt nyerhető (11).

3.4.b.2. Immunhisztológiai leletek A diffúzan infiltráló, kis – középnagy, atipusos sejtekből felépülő infiltrátum mindhárom esetben közepes – magas proliferációs rátát mutatott, negatív volt a vizsgált B-sejt markerekkel, míg legalább három T-sejt markerrel pozitívnak bizonyult, ezen belül az 1. sz. eset homogén helper fenotípust, míg a másik kettő cytotoxikus jellegűt mutatott (3.4.1.d.-f. ábra). A diffúz infiltrátum immunfenotípusát összefoglalóan a 3.4.1. táblázat mutatja.

3.4.1. táblázat A tömeges, kis – középnagy sejtes tumor immunhistológiai fenotípusa a három nyirokcsomóban (11).

Betegek	CD3	CD4	CD5	CD8	Granzyme-B	TIA-1	CD45	CD45RO	CD20	CD79a
#1	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
#2	+	n.a	n.a	+	n.a	+	+	+	-	-
#3	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-

n.a.: nincs adat

Ezek a leletek a citológiai atipia valamint a reaktív komponens egyéb morfológiai jellegzetességei miatt a továbbiakban nem szubtipizálható PTCL-NOS (PTCL - nem osztályozható) fennálltára utaltak mindhárom esetben. A három nyirokcsomóban előforduló HRS-szerű sejtek immunfenotípus leleteit a 3.4.2. táblázat foglalja össze.

3.4.2. táblázat A HRS-szerű sejtek immunhistológiai fenotípusa a három PTCL-ben (11).

PTCL	T/B-sejt markerek	CD15	CD30	CD45	ALK-1	LMP-1	EBNA-2	OCT2	OBF.1/BOB.1	Bcl-6	CD138
#1	- / -	-	+	-	-	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#2	- / +	-	+	+	-	+	--/+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#3	- / ++	--/+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

n.a.: nincs adat

Az 1. és a 3. számú tumorban a HRS-szerű sejtek következetesen negatívak voltak az összes vizsgált T-sejt markerre valamint ALK-1, EBNA-2 és CD45 markerekre, de ugyancsak konzekvensen pozitívnak bizonyultak CD30-ra és EBV asszociált LMP-1-re (3.4.1.g.-i. ábra). Továbbá, részleges pozitivitás volt megfigyelhető a 3. esetben CD20/CD79a B-sejtes valamint CD15 markerekre. A B-sejt specifikus transzkripciós faktor, OCT2 és ko-aktivátor, OBF.1/BOB.1 valamint a BCL-6 és a CD138 expresszió csak a 3. esetben volt vizsgálható. Mindegyik HRS-szerű sejt pozitív volt OCT2-re és negatívnak bizonyult OBF.1/BOB.1, CD138 és BCL-6 markerekre (az utóbbival a nagy sejtek kb 5%-a gyenge nuclearis pozitivitás mutatott) (3.4.1.j.-m. ábra). A HRS-szerű sejtek a 2. esetben eltérő fenotípussal rendelkeztek: bár negatívak volt T-sejtes markerekre, ALK-1-re, CD15-re, de pozitívnak bizonyultak B-sejtes valamint CD30, CD45, LMP-1 és - szórványosan – EBNA-2 markerekre.

3.4.b.3. Molekuláris leletek A teljes paraffinos szövet extraktumból elvégzett antigén receptor génátrendeződés vizsgálatok mindhárom tumor esetén sikeresen elvégezhetőek voltak. A T-sejt receptor gamma (TCR γ) génátrendeződés mindhárom esetben monoklonálisnak bizonyult, megerősítvén a morfológiai–immunhistológiai alapon felállított PTCL diagnózist. Az IgH génátrendeződés vizsgálat teljes szöveti DNS extraktumban poliklonalitást mutatott az 1. és a 2. számú tumorokban, de monoklonalitás volt kimutatható a 3. sz. esetben. Mindhárom esetben el tudtuk végezni az EBV asszociált EBER FISH reakciót a paraffinos blokkokból extrahált magokon. A flow citometriás vizsgálat során a fluoreszcens intenzitás alapján elkülöníthető EBER⁺ valamint EBER⁻ magokat reprezentáló fluoreszcens eloszlás görbék átfedő részeinek analízise az EBER⁺ frakció átlagosan 82 %-os tisztaságát mutatta (3.4.1.r.-s. ábra). A flow szortírozott, EBER⁺ magokból extrahált DNS-en elvégzett IgH génátrendeződés PCR teszt poliklonalitást mutatott a 2. sz. esetben, de monoklonalitás volt igazolható az 1. és 3. számú esetekben (3.4.2. ábra). A szubklónozott PCR termék többszörös izolátumainak szekvencia vizsgálata ezt az eredményt mindkét esetben megerősítette. Az EBER⁺ szortírozott magokból valamint a teljes szövetből extrahált DNS-ből amplifikált és klonális V gén régió mólsúly valamint szekvencia alapján is identikus volt a 3. számú esetben. A monoklonális IgH génátrendeződést mutató, kettő EBER⁺ nuclearis preparátumból izolált DNS közül a 3. számú esetben sikeres volt az egész variabilis régió amplifikálása. Az így nyert FRI-CDRI-FRII-CDRII-FRIII szekvencia stop kodont, deléciót, inszerciót és duplikációt nem tartalmazott, tehát funkcionálisnak bizonyult és az IgHV4-59*01 germline génnel volt azonosítható. A teljes szekvencia 96.2%-os, míg a CDRI + CDRII régiók 93.3%-os identitást mutattak a germline génnel. Ez a lelet – 98%-os határértéket figyelembe véve – arra utal, hogy a gén (és a gazdasejt) szomatikus hipermutáción ment keresztül. Az R/S érték az FR régiókban 2.0 volt. Az amplifikált termék 20 szubklónjának szekvencia vizsgálata intraklonális diversitást, azaz 'ongoing' szomatikus hipermutációt nem mutatott.

Az in situ hibridizáció a morfológiailag azonosítható HRS sejtekben masszív intranuclearis EBER pozitivitást mutatott, emellett – azonban – szórványosan kis, reaktív sejteknek tűnő elemek is pozitívak voltak (3.4.1.n. ábra). Az 1. és 3. számú esetben – a HRS sejtek fenotípusa valamint a klonális IgH génátrendeződése miatt – vizsgáltuk az Ig könnyűlánc gének expresszióját ISH-val (a HRS sejtekben – aspecifikus phagocytosis miatt – gyakran lehet immunhisztológiával könnyűláncokat kimutatni). A két esetben a HRS sejtek egyikében sem lehetett sem kappa, sem lambda könnyűlánc mRNS-t kimutatni, míg a háttér reaktív plasmasejtjei pozitivitást és poliklonális reakciót mutattak (3.4.1.o.-p. ábra). A teljes szövet

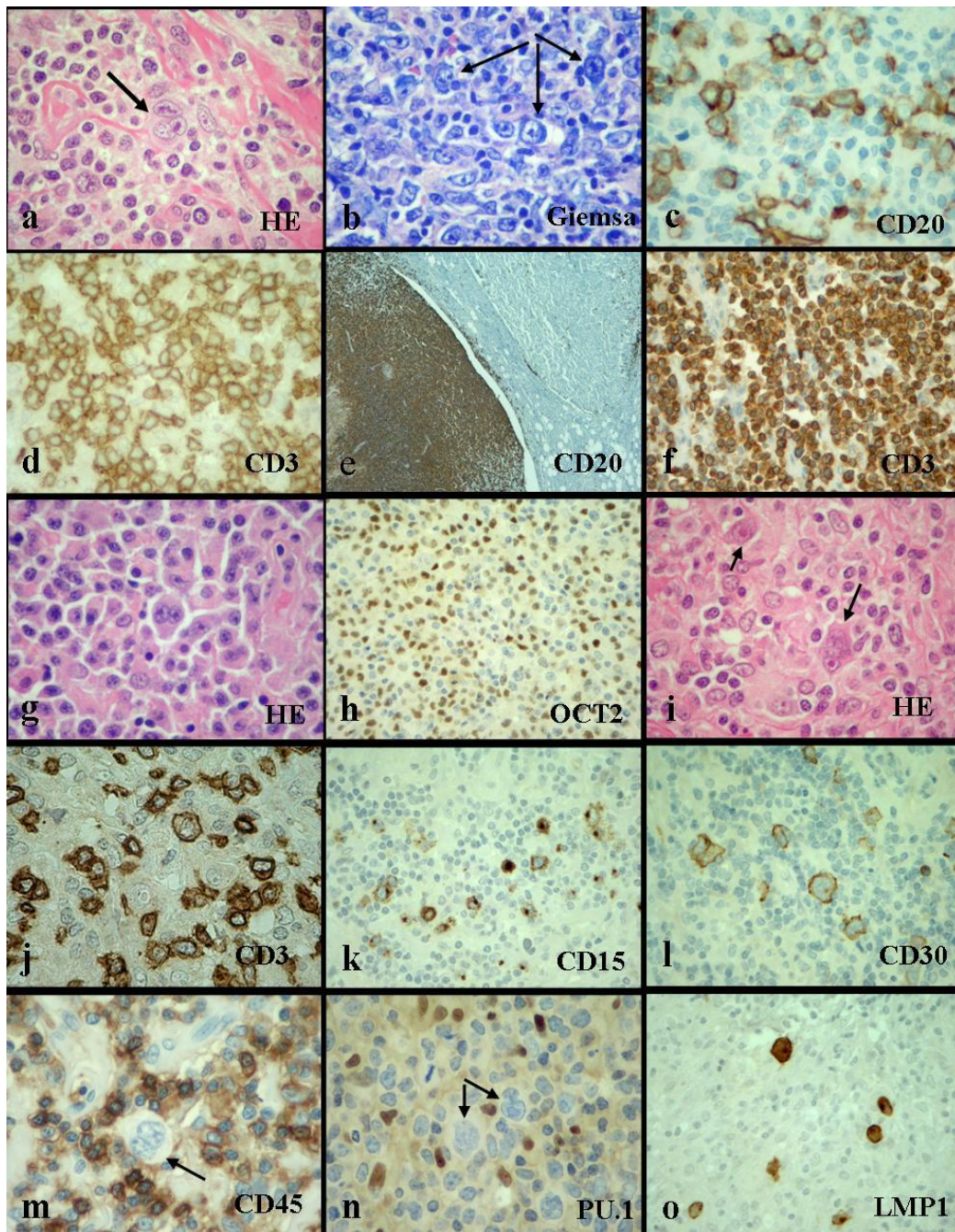
extraktumból, az EBER⁺ szortírozott magokból izolált DNS-ből nyert molekuláris leleteket valamint az ISH eredményeit a 3.4.3. táblázat foglalja össze.

3.4.3. táblázat A három, szórványos HRS sejteket tartalmazó PTCL-ben nyert molekuláris (PCR és ISH) leletek összefoglalása (11).

Betegek	TCR γ	IgH		EBER-ISH	kappa-mRNS-ISH	lambda-mRNS-ISH
	Teljes szövet extraktum		EBER+pozitív szortírozott magok	Óriás sejtek paraffinos metszetben		
#1	monoklonális	polyklonális	monoklonális	+	-	-
#2	monoklonális	polyklonális	polyklonális	+	n.a.	n.a.
#3	monoklonális	monoklonális	monoklonális	+	-	-

n.a.: nincs adat

Az archivált nagyszámú PTCL pusztán morfológiai (immunhisztologia és ISH nélküli) vizsgálata alapján azonosítható volt 2 csoport. Egyikben a PTCL sejtek nyilvánvaló citológiai polimorfizmusa miatt a HRS típusú sejtek alig voltak megkülönböztethetőek a PTCL tumorsejtektől, a másik csoportban a PTCL mérsékelt atípiája és relatív kissejtes jellege alapján a folyamat cHL-ra emlékeztetett (3.4.3.a-b. ábra). A 300, EBV⁺ éretlen B-sejt populációra vizsgált PTCL-ből 12-ben észleltünk EBV⁺ B-sejt proliferátumot. A növekedési mintázat, a citológia és a fenotípus alapján az EBV⁺ nagy sejtek a 12 esetben 3 csoportba voltak sorolhatóak (3.4.4. táblázat). *i.* Az első csoportban (3 eset) az éretlen, mononukleáris, centro- és immunoblaszt karakterű, CD20⁺, CD30⁺, CD45⁺, LMP1⁺ fenotípusú és poliklonális IgH génátrendeződést (IgH-R) mutató sejtek elszórtan keveredtek el a PTCL tumorsejtekkel (3.4.3.b-d. ábra). *ii.* A 2. csoportot 1 eset képviselte. Ebben a mononukleáris, éretlen, a PTCL tumortól nagyrészt demarkálódó, CD20⁺, CD30⁺, CD45⁺, LMP1⁺. EBNA2⁺ fenotípusú, monoklonális IgH-R-t nem mutató sejtek homogén lemezei DLBCL-t utánoztak (3.4.3.e-h. ábra). *iii.* A 3. csoportba 8 eset tartozott. Itt elszórt, HRS morfológiájú, CD15^{+/-}, CD20^{-/+}, CD30⁺, CD45⁻, LMP1⁺, EBNA2⁻ fenotípusú, teljes szövet extraktumból 50 %-ban monoklonális sejtek jelenléte volt jellemző. Az IgH asszociált transzkripciósfaktor (OCT2, BOB.1/OBF.1, PU.1) expresszió alapján ezen sejtek megfeleltek cHL HRS sejtejének (3.4.3.i-o. ábra).



3.4.3. ábra. A HRS típusú sejtek (nyilak) a kis / közepes méretű, széles, világos citoplazmával bíró, atipia jeleket mutató homogén T-sejtes proliferátumban (400x, N° 10). **b-d** A nagy, centroblast és immunoblast típusú sejtek nehezen különíthetők el az agresszív citológiát mutató háttér T-sejtes lymphoma sejtektől, de a CD20 márkert (c) egyértelműen mutatja, hogy ezen elszórt elemek B-sejtek, a CD3+, közepes méretű, atipusos PTCL tumorsejtek lemezeiben (d), (400x, N° 2). **e-h** A centroblast és immunoblast morfológiájú (g), OCT-2 magpozitivitást adó (h), a mérsékelt atípiát mutató (f), CD3+ T-sejtes lymphomától élesen elhatárolódó, DLBCL típusú, CD20+ B-sejt proliferátum (20x – 200x – 400x – 200x, N° 4); **i-o** A közepesen nagy, egyértelmű atipia jeleket mutató, CD3+ T-sejtes lymphomában elszórtan elhelyezkedő cHL típusú HRS sejtek (nyilak). A nagy HRS típusú sejtek CD3-, CD15+, CD30+, CD45- (nyíl), PU.1- (nyilak), LMP-1+ fenotípust mutatnak (k and l: 200x, többi: 400x, N° 9) (12).

3.4.4. Táblázat T-sejtes lymphomában észlelhető, három csoportba sorolható nagy B-sejtes proliferátum (LBC) feno- és genotípus jellegzetességei (12).

	Beteg N°	PTCL ⁵ típus	LBC morfológia	LBC immunfenotípus							Molekuláris lelet		EBV státusz		
				CD15	CD20	CD30	CD45	Bob-1	Oct-2	PU.1	TCR-γ	IGH	EBER	LMP-1	EBNA-2
Csoport 1	1.	PTCL-NOS ⁶	aktivált B-sejt	-	+	+	+	n.a. ¹	n.a.	n.a.	M ³	P ⁴	+	+	--/+
	2.	PTCL-NOS	aktivált B-sejt	-	+	+	+	+	+	+	M	P	+	+	-
	3.	PTCL-NOS	aktivált B-sejt	n.s.	+	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	M	n.a.	+	+	n.a.
Csoport 2	4.	PTCL-NOS	aktivált B-sejt	-	+	+	+	-/+	+	n.a.	M	P	+	+	+
Csoport 3	5.	PTCL-NOS	HRS	-	-	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	M	P	+	+	-
	6.	PTCL-NOS	HRS	-	-	+	-	-	+	n.a.	M	M	+	+	-
	7.	PTCL-NOS	HRS	+	-	+	-	-	-	+	u.a. ²	M	+	+	-
	8.	PTCL-NOS	HRS	+	+	+	-	-	+	+	M	M	+	+	-
	9.	PTCL-NOS	HRS	+	+/-	+	-	-	-	-	M	P	+	+	-
	10.	PTCL-NOS	HRS	+	-	+	-	-	-	-	u.a.	M	+	+	-
	11.	AIL	HRS	-	+	+	+	-	+/-	-	u.a.	P	+	+	-
	12.	PTCL-NOS	HRS	-	+	+	-	+	+	-	M	P	+	+	-

¹ nincs adat

² sikertelen amplifikáció

³ monoklonális

⁴ poliklonális

5 Perifériás T-sejtes lymphoma

6 nem osztályozható (not otherwise specified)

A 300 PTCL-en kívüli 65 PTCL-ben, melyekben CD30 és EBER ko-expressziót mutató nagy sejtek nem fordultak elő, vizsgáltuk az EBER+, CD30-, LMP1-, EBNA2- típusú, morfológiailag kis, nyugvó lymphocytá karakterű sejtek jelenlétét és az adatokat 20 reaktív nyirokcsomó ugyanilyen adataival hasonlítottuk össze. A 65 PTCL-ből 15-ben (23 %), a 20 kontrol nyirokszövetben 11-ben találtunk ilyen sejtpopulációt. Azonban az előbbieken magasan szignifikánsan nagyobb denzitást (75.9 (1-300) / 100 HPF vs 1.5 (1-2) / 100 HPF mutattak ezen EBV+, nyugvó B-sejtek.

3.4.c. Diszkusszió

A feltűnő citológiai sajátosságokkal bíró – bár ritka – Hodgkin és Reed-Sternberg (HRS) sejtek a klasszikus Hodgkin lymphoma (cHL) morfológiájának emblematikus elemei. A HRS sejtek karakterisztikusak, de nem pathognomikusak cHL-ra, mivel HRS vagy HRS szerű sejtek előfordulhatnak reaktív állapotban, mint pl. mononucleosis infectiosa valamint többféle daganatban. Ha a szórványos HRS sejtek háttérben található celluláris infiltrátum atípiája nem nyilvánvaló, de arra mégis gyanús, komoly nehézségek adódnak a diagnózis felállításában. Ebből a szempontból a granulomatosus, de egyébként típusos és poliklonális háttérrel bíró TCR-BCL valamint a gyakran csak moderált vagy alig észrevehető atipia jeleket mutató PTCL maradnak a cHL differenciál diagnosztikájának első vonalában (1, 13).

Jelen tanulmányban egyrészt 3 nyirokcsomó elváltozást írtunk le, melyekben elmosott alapszerkezet mellett T-sejt dús, proliferáló HEV struktúrákat, vegyes gyulladásos sejtelemeket felvonultató, de nyilvánvaló granulomatosus – epithelioid sejtes jelleget, hyalinos – atrophias tüszőket, expandált folliculáris dendritikus sejthálózatot nem mutató háttérben szórványos HRS ill. HRS-szerű sejtek fordultak elő. A morfológia emiatt tehát nagyfokban emlékeztetett cHL-ra. Bár a citológiai atipia az 1. számú esetben kevésbé volt jellemző (melyet az eredeti – téves – cHL diagnosis is megerősít), alapos vizsgálattal az felismerhető volt, míg a másik két esetben ez sokkal nyilvánvalóbb morfológiai jellegként állt fent. Ezen ‘háttér’ populáció neoplasticus jellegét mindhárom esetben alátámasztotta továbbá a homogén helper ill. citotoxikus fenotípus, a fokozott – magas proliferációs ráta – amely cHL-ban illetve TCR-BCL-ban a HRS ill. a HRS-szerű sejtekre korlátozódik –, valamint a teljes szöveti DNS extraktumból igazolt monoklonális TCR γ génátrendeződés. Így a ‘háttér’ infiltrátum alapján a cHL és a TCR-BCL kizárható volt és perifériás T-sejtes lymphoma (PTCL) diagnózis került felállításra.

A PTCL morfológiai átfedést mutathat cHL-val, sőt egyes – CD15⁺ és CD30⁺ HRS sejteket tartalmazó PTCL-nek vagy CD15⁺ és CD30⁺ PTCL-nek nevezett – variánsaiban ez az immunfenotípusra is kiterjed (**1, 14**). Ezek a PTCL-ban leírt HRS-szerű sejtek azonban EBV-re negatívak, de legalább egy T-sejt márkerre pozitívak voltak vagy aberráns T-fenotípust mutattak. Az eseteinkben bemutatott HRS sejtek konstansan EBV pozitívak és mind a hat T-sejt markerre negatívak voltak, továbbá vagy aktivált B-sejt (CD15⁻, CD20⁺, CD30⁺, CD45⁺; 2. sz. eset) vagy cHL-HRS sejt (CD15^{-/+}, CD20^{-/+}, CD30⁺, CD45⁻; 1. és 3. számú esetek) fenotípust mutattak. Az izolált EBER⁺ HRS-szerű sejtek magjaiból nyert DNS-en sikeresen elvégzett IgH gén amplifikáció bizonyította, hogy a PTCL típusú 3 elváltozásban előforduló HRS-szerű sejtek valójában B-sejt eredetű, EBV-vel fertőzött sejtelemek. Ezen leletek együttesen kizárják azt, hogy eseteink a ritka, CD15⁺ / CD30⁺ PTCL variánsnak vagy a még ritkább – ha egyáltalán létező – T-sejt eredetű cHL-nak feleljenek meg (**2, 3**).

Az EBER⁺, kis arányban EBER⁻ HRS-sejt szerű – a cHL jellegzetes celluláris hátterét nélkülöző – sejtelemek megjelenése indolens B-sejtes nHML-ákban ritka, de jól dokumentált jelenség (**15, 16**). Ennek klinikai jelentősége ellentmondásos, mivel patomorfológiailag nyilvánvaló cHL-ba történő transzformációt valamint változatlan morfológiát – egymás mellett 5 éves követés során fennálló B-sejtes nHML és EBER⁺ HRS-szerű sejtek – egyaránt leírtak. Figyelemre méltó, hogy csak azon CD15^{-/+}, CD30⁺, CD20^{-/+}, EBER⁺ szórványos sejtpopulációból fejlődött ki klinikopathológiailag típusos cHL, melyek CD45-tel negatívak voltak (ez cHL-ban a HRS sejtek egyik legkövetkezetesebb fenotípus jellegzetessége). EBV negatív B-sejtes nHML progresszióját EBER⁺ HRS-szerű sejtekből álló, lymphocytá depléciós cHL-t utánzó DLBCL-ba ugyancsak leírták (**17**). A HRS-szerű sejtek monoklonális jellegét valamint a pre-/ ko-exisztáló indolens B-sejtes lymphomával fennálló klonális identitását 3 B-sejtes chronicus lymphocytás leukaemiából (CLL) kettőben demonstrálták (**18**). Ezt az eredményt egy másik tanulmány csak egy CLL és a benne kialakult EBER⁻ HRS sejtek relációjában tudta megerősíteni, míg másik két vizsgált CLL-ben az EBER⁺ HRS sejtek mutált és nem identikus IgH-V génekkel rendelkeztek szemben a CLL-es nem mutált klónokkal (**19**).

Ismereteink szerint csak egy olyan publikáció látott napvilágot, amely ‘egy-sejt’ vizsgálatok alapján 3, szórványos HRS-szerű, B-sejt feno- és genotípust mutató, EBV⁺ sejteket tartalmazó PTCL-ről számolt be (**4**). A vizsgálatok poliklonális – oligoklonális IgH génátrendeződést mutattak ezen HRS-szerű sejtekben. Egyik esetben sem észleltek típusos cHL irányú klinikopathológiai progressziót. A szerzők konklúziója szerint a PTCL okozta

immunszuppresszió az EBV⁺ nyugvó B-sejt kompartment poliklonális expanszióját és a valódi HRS sejt típusú morfológia és fenotípus (de nem genotípus) kialakulását eredményezheti. Egy esetben – azonban – egy későbbi biopsia kimutatta a CD20⁺, CD30⁺, EBER⁺, CD15⁻, LMP-1⁻ nagy, blast típusú sejtek CD20⁺, CD30⁺, EBER⁺, CD15⁺, LMP-1⁺, poliklonális HRS-szerű sejt irányú progresszióját. Az általunk leírt esetekben lényegében ugyanezt a morfológiát és immunfenotípust észleltük – azzal a különbséggel, hogy két esetünkben a HRS-szerű sejtek CD45 és EBNA-2 negativitását is megfigyeltük -, ezért a korábbi konklúziót részlegesen megerősíthettük. Azonban, azon két esetben, ahol az egyébként cHL fenotípusú, EBER⁺ izolált HRS-szerű sejtekben monoklonális IgH génátrendeződés is kimutatható volt, azt bizonyítjuk – az irodalomban első alkalommal, – hogy PTCL-ban a B-sejtes cHL valódi HRS sejtjeitől fenotípusában megkülönböztethetetlen HRS típusú sejtek alakulhatnak ki. A szomatikusan hipermutált IgH-V gén, az ‘ongoing’ mutáció hiánya, a centrum germinativum centroblastokkal lényegében megegyező R/S érték az FR régióban (1.9 vs 2.0) egyaránt a valódi HRS sejt genotípust támogatják (20). A nem funkcionális IgH-V gén hiánya ennek nem mond ellent, mivel az csak 25%-ban fordul elő cHL-ban (21). Továbbá, a két esetünkben észlelt monoklonális HRS-szerű sejtekben a könnyűlánc mRNS hiánya megfelel a cHL-ban leírt jelenségnek, nevezetesen az egyébként funkcionális Ig gén transzkripció gátlásának valamint az ennek okaként észlelt B-sejt specifikus Ig gén konzervált oktamer régió asszociált transzkripció factor és ko-aktivátor, OCT2 illetve OBF.1/BOB.1 expressziója csökkenésének illetve hiányának (21, 22, 23, 24). Két esetünkben csak az utóbbi teljes hiányát tudtuk kimutatni, melynek fontossága –azonban – meghaladja az OCT2-ét és mely deklaráltan feltétlenül szükséges az IgH gén promotor régiójának aktiválásához (25). Ezen sejtek BCL-6, de ugyancsak CD138 negativitása nem mond ellent cHL fenotípusnak, mivel a cHL HRS sejtek BCL-6 negatívak és az ugyancsak a cHL-hoz tartozó noduláris lymphocytá gazdag cHL (nLRcHL) daganatsejtjeiben csak részleges (43%-os) pozitivitás volt kimutatható CD138 markerrel (26, 27). Szórványos HRS-szerű, CD15⁻, CD20⁺, CD30⁺, CD45⁻, EBER⁺, LMP1⁺, EBNA2⁻ cHL fenotípusú atipikus nagy sejteket már leírtak angioimmunoblastos T-sejtes lymphomában, de abban a tanulmányban ‘egy-sejt’ molekuláris analízis valamint az immunglobulinok továbbá ezek transzkripció faktorainak vizsgálata nem történt meg (28). Az EBV⁺ nagysejtes populáció a két PTCL esetünkben II-es típusú latencia expressziós profilt mutatott, mely megfelelhetne egy EBV⁺ agresszív B-sejtes lymphoma, mint pl. AIDS-asszociált vagy poszt-transzplant lymphoproliferatív betegség, korai fázisának is, de az Ig expresszió és legalább az egyik Ig gén asszociált transzkripció factor hiánya patognomikus B-sejt eredetű cHL HRS sejtjeire (29). A két esetben leírt HRS-szerű sejtjeink

az egészséges egyének nyirokcsomóiban alacsony arányban ($1-50/10^6$ lymphocytá) jelenlevő, EBER⁺, CD30⁻, LMP1⁻ memória B-sejtekből származhatnak – melyek arányának növekedése PTCL-ben dokumentált (30, 31) –, a PTCL által előidézett immunszuppresszió miatt kialakuló latencia gén expressziós profil változása nyomán (32, 33, 34, 35). Valóban, saját vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy PTCL-ban a kis, nyugvó EBV+ B-sejtek kb 50x magasabb arányban fordulnak elő, mint nem immunszuppresszáltak reaktív nyirokcsomóiban, mely megerősíti mások adatait (5, 12, 30; 36). A jelenség rokon vonásokat mutat az időskori immunszuppresszióban kialakuló EBV+ lymphoproliferációk egyes formáival (37). Klonális kapcsolat CD30⁺, EBER⁺ HRS sejtek valamint a kis EBER⁺, CD30⁻ B-sejtek között cHL-ban már leírásra került (38). Továbbá, cHL-ban a domináns HRS klón mellett egy minor, CD30⁺, EBV⁺, monoklonális, a fő tumor klónnal nem identikus HRS populáció is felismerésre került, mely az EBV⁺ sejtek folyamatos expansziójára utalhat a cHL mikrokörnyezetében is (27).

Bár a mindhárom esetben bekövetkező gyors halál miatt követési adatok nem állnak rendelkezésre, azt feltételezzük, hogy a háromból 2 esetünkben egy második daganat, B-sejt eredetű cHL kialakulásának korai fázisát irtuk le. Mivel a cHL-ra jellemző aspecifikus, reaktív celluláris háttér a HRS sejtek által termelt nagyszámú citokin hatására idővel alakul ki, megközelítés kérdése, hogy ezt a prekursor léziót hogyan nevezzük, akár az *in situ* cHL elnevezés is megfontolható. Ezen jelenség már a jelenleg érvényes WHO lymphoma klasszifikációban is rögzítésre került (39). Bármilyen is a helyes elnevezés, az itt leírt PTCL-ben kialakuló cHL tumorsejt fenotípusa megelőző állapota lehet EBV⁺ cHL és PTCL ritka kompozit lymphoma eseteinek (40, 41). Hangsúlyozandó azonban, hogy a bemutatott nyirokcsomók pathomorfológiájának biológiai értelmezése extenzív ‘egy-sejt’ molekuláris analízis nélkül nem lehetséges, mivel PTCL-ben a HRS-szerű és EBER⁺, CD30⁺, LMP1⁺, EBNA2⁻, CD45⁻ fenotípusú sejtek egyaránt megfelelhetnek oligoklonális (4) illetve monoklonális transzformált B-sejteknek is.

Kiterjesztett, retrospektív vizsgálataink során 300 PTCL-ben 12, EBV+ B-lymphoproliferátumot tartalmazó esetet észleltünk. A citológiai sajátosságok valamint a növekedési mintázat alapján alkotott 3 csoport közül az alsó kettőben olyan nagy B-sejtes (LBC) proliferáció volt azonosítható, amely a fentiekben hivatkozott publikációkban már leírásra került és megfelelt aktivált B-sejt morfológiájának és fenotípusnak. A 3. csoportban azonban HRS sejt morfológiájú és CD15+/-, CD20+/-, CD30+, CD45-, TF- expressziós mintázatot valamint 90 %-ban IgH-R+/- B-genotípust mutató sejtpropagáció volt jelen (42; 43). Ez a fenotípus – CD45, TF és EBNA2 negativitás és CD30, LMP1 pozitivitás a

legfontosabb karakterek – ebben a szöveti kontextusban még nem került leírásra (2010-ig) ismereteink szerint.

Összeségében morfológiai, fenotípus megfigyeléseink - az IgH FRI – CDRIII régióra vonatkozó molekuláris vizsgálatainkkal együtt arra utalnak, hogy PTCL-ban a cHL HRS sejtjeitől morfológiailag, feno- és genotípusában megkülönböztethetetlen sejtek fejlődhetnek ki. Ez a jelenség az immunszuppresszió indukálta B-sejtes klonális evolúció *in vivo* pathológiai modeljét reprezentálja.

3.5. Citogenetikai aberrációk automatizált vizsgálata interfázis magokban

Az interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizáció (iFISH) hatékonyan képes különböző DNS szakaszok nem oszló sejtekben történő vizualizálására. Az iFISH szignálok manuális kiértékelése munka- és időigényes, tévedési lehetőséggel terhelt szubjektív interpretáció. A szignál mintázatok automatizált kiértékelése lehetőséget nyújt ezen problémák feloldására. Az első automatizált iFISH analízisre tett kísérlet óta, az elmúlt 25 évben sokféle applikációt vezettek be az onkológia, a prenatális valamint a fertilitási vizsgálatok területén. Az alábbiakban összefoglalásra kerül az automatizált iFISH analízis módszertana, röviden a története, a klinikai applikációi valamint az előnyei és az ezzel kapcsolatos kihívások. A munka azon paraméter panel javaslatra is hivatkozik, mely az új alkalmazások bevezetéséhez és standardizációjához valamint korábbi technológiák reprodukálásához szükséges.

3.5.1. Manuális iFISH kiértékelés.

Rutin diagnosztikában az iFISH mintákat általában 2D mikroszkópban, manuálisan értékelik ki. Az ECA (European Cytogeneticists Association) valamint az ACMG (American College of Medical Genetics) Clinical Laboratory Improvement Amendments konszenzus álláspontja szerint az ilyen mintákat két független vizsgálónak kell értékelni, szignifikáns eredmény különbség esetén harmadik személyt kell alkalmazni **(1, 2)**. A minimálisan kiértékelendő sejtszámra tett ECA ajánlás az applikáció függvényében változik, prenatális aneuploiditás vizsgálatnál ez 30 sejt, mozaicizmus vizsgálatnál viszont 100 sejt. Az európai diagnosztikus standardok szerint hematológiai / onkológiai applikációknál ez a szám ugyancsak 100 **(1, 3)**. Az ACMG ajánlás öröklött vagy szerzett aberráció esetén 50 mag, de mozaicizmus illetve bármilyen abnormalis klón esetén a vizsgálandó sejtszámot a binomiális eloszlás alapján kell meghatározni **(4, 5)**. Minimális residuális tumor (MRD), keringő tumorsejt vagy mikrokimerizmus analízisnél a vizsgálandó sejtszámok lényegesen tovább emelendők, mely a vizsgálatok időigényét is jelentősen növeli **(6-8)**. Leszögezendő, hogy a FISH próbák minden esetben fals pozitivitást (FP) is adnak, mely a pozitív esemény detektálhatósági szintjét ('cut-off' érték) befolyásolja, ezért minden applikációnál meghatározandó. Miután a FP nem mutat normál eloszlást, a binomiális distribúció alkalmazandó **(2, 3, 9, 10, 11)**. Amplifikáció / kromoszóma nyerés esetén ez az érték általában alacsonyabb, mint deléció / kromoszóma vesztésnél. Komoly problémát jelent a kiegyensúlyozott transzlokáció esetén a kétszinű jelek random kolokalizációja fúziós, elváló ('break-apart'), de dupla fúziós és extraszignálos próbák esetén is **(12)**. Általános szabály

azonban, hogy minél komplexebb a szignál mintázat, annál alacsonyabb a FP, de annál magasabb a fals negativitás (FN).

A nagyobb vizsgálandó minta méret (sejtszám) mellett a manuális kiértékeléssel kapcsolatos további nehézségek a következők: (*i.*) A minta pozitivitást a magas illetve alacsony pozitivitás régiókban a vizsgáló szubjektíve felül- vagy alúlértékeli (**13**), (*ii.*) a vizsgálók közötti (interobszerver) illetve laboratóriumok közötti variabilitás miatt az eredmények összehasonlítása nehéz (**14**) (*iii.*) a fúziós szignál konszenzus definíciójának hiánya önmagában jelentős variabilitást okozhat (**15, 16**).

3.5.2. Automatizált (gépi) iFISH kiértékelés.

3.5.2.1. Az automatizáció hardver és szoftver igénye

Legnagyobbbrészt az irodalom alapján fluoreszcens mikroszkópot vagy szkennert használnak, a drágább, speciális technológiát képviselő konfokális lézer szkanning mikroszkópia vagy lézer szkennig citometria felhasználása ritka (**17-19**). Minimum követelmény a következő: megbízható fényforrás, megfelelő filter szettek, szignál detektor, motorizált tárgyasztal és egy korreláltan citometriai paramétereket detektáló valamint szignál mintázatot kiértékelni képes szoftverrel felszerelt számítógép.

Drága lézer fényforrás nem, viszont homogén megvilágítás szükséges az iFISH jelek detektálásához. Ha higanygőz vagy xenon lámpa fénye üvegszál optikán keresztül kerül a tárgyra, az kellően erős, hosszú élettartamú fényforrást és homogén megvilágítást jelent, bár az újabb fejlesztésű LED lámpák is kiválóak (**20, 21, 22, 23**). A megfelelő objektív alkalmazása feladat specifikus kompromisszumot jelent a nagyítás, a feloldás (NA), a mélységélesség (DOF) és a sebesség között. A mag (DAPI) objektum valamint iFISH jelek detektálására elég 20x objektív is, de szignál mintázat analizisere, szignálok térbeli elhelyezkedésének méréséhez 60x, 63x, 100x objektív válik szükségessé (**17, 24-39**). Hasznos alternatíva, ha a DAPI objektum szelekciójához 5 – 20x objektívet, míg az iFISH szignál detektálásához 40 – 100x objektívet használunk (**40-48**). Az excitációs filter spektrumának szélességét az optimális szignál – zaj arány határozza meg. A színes kamerák egyszerre több fluorokróm fényt tudják detektálni, a filterváltás hiánya időt takarít meg. Több, mint 2 vagy 3 fluorokróm + háttér magjelzés detektálási igénye esetén azonban a fekete-fehér kamera vagy fotómultiplier cső, egyszeres 'band-pass' filter és motorizált filter revorver nagyon ajánlatos, 'zero-pixel shift' filter szet vagy szofisztikált szotver alkalmazása mellett (**49-50**). Korábbi paraméterek alapján történő objektum relokalizációhoz komputer asszisztált, mikrométeres pontossággal mozgatott motorizált tárgyasztal szükséges. A központi szoftver

irányítja a tárgyasztal mozgását, a filterváltást és az expozíciós időt valamint eltárolja a processzált galéria képeket. Az egy-sejt szintű korrelált adatgyűjtés miatt ezen galéria képek később tetszőleges csoportosításban, akár többlépcsősen is bármilyen detektált paraméterre illetve ezek kombinációira vizsgálhatóak.

3.5.2.2. *A szoftver detektálási képességének 'kifejlesztése' ('training')*

A rutinszerűen végrehajtott applikációk az automatizált rendszer teljesítményének interaktív optimalásával kezdődnek. Ennek lényege, hogy a legoptimálisabbnak gondolt kép detektálási és feldolgozási paraméterek alapján nyert DAPI objektumokat valamint iFISH szignálokat a vizsgáló manuálisan ellenőrzi és azok helyességét, valódiságát megállapítja. A gépi detektálás és képfeldolgozás paramétereinek változtatásával és a folyamat iterációjával érhetjük el a legjobb gépi beállítást, azaz az automatizált rendszer célfeladatra szabott legoptimálisabb működését. A referencia, tehát, a komputer 'tanítása - training' folyamán a humán erőforrás vizuális percepciója.

3.5.2.3. *Az automatizált vizsgálatok sorrendje.*

A fő lépések a következők: (i.) mag (DAPI objektum) szelektálás, (ii.) szignál detektálás, (iii.) szignál mintázat kiértékelés. Először manuálisan meghatározzuk a vizsgálandó területet (region of interest, ROI). Ennek autofókusz térképe úgy készül, hogy a ROI-ra helyezett virtuális (digitális) háló minden egyes metszéspontjában a Z koordinátákat és a fókuszszikot megállapítja, majd az utóbbit a látótér (field of view – FOV) centrális pontjára extrapolálja a rendszer. A legjobb képfelvétel és analízis érdekében az egyes FOV mezőkön finom fókuszálás is történik (26). A háttér és szignál csatornában felvett képeket célszerű különböző kép processzási algoritmusokkal javítani.

(i.) A háttér magfestés (DAPI) és különböző morfológiai paraméterek alapján történő elsődleges szegmentálás során a sejttörmelék, a nem specifikus DAPI festett objektumok kizárásra kerülnek. A sejtaggregátumok feldolgozása vita tárgya; vannak akik egyéni sejtmagokat igyekeznek bennük azonosítani szoftveresen (19, 30, 31, 33, 51), mások az aggregátumokat egészében kizárják (25, 26, 37, 52-54, 55). A mag szegmentálás szövettani körülmények, formol-paraffinos metszet esetén sokkal problémásabb. Sejtalapú illetve terület alapú szegmentálás illetve iFISH detektálás, 'tile-sampling' vagy 'grid-sampling' eljárások lehetőségei (56, 57, 58). Ezen a területen azonban mindenképpen további fejlesztések szükségesek.

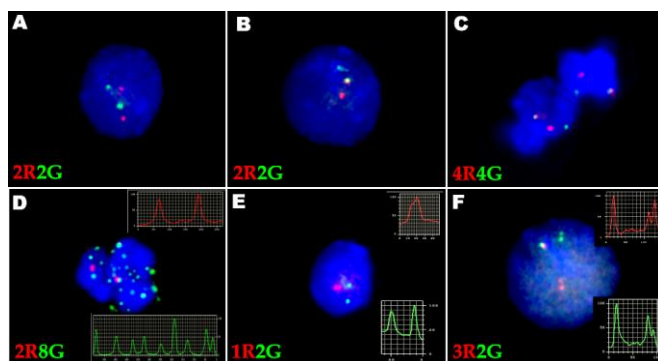
(ii.) A szignál detektálás a legnagyobb kihívás a folyamatban. A szignálok a kontrasztjuk, intenzitásuk, relatív és abszolút területük, az azonos színű szignáltól való távolságuk alapján ismerhetők fel. Jelentős problémát jelenthetnek ebben a folyamatban a

kisméretű, intenzíven fluoreszkáló, magfelszínre kerülő artefaktok, a magas háttérzaj, a hasadt illetve célnaszerű szignálok és az azonos színű szignálok random ko-lokalizációja (**13, 59, 60**) (3.5.1. ábra). Az amplifikált gének iFISH jelölésekor keletkező nem pontszerű szignál halmazok ('clusterek') detektálása és kvantálása külön problémakört jelent, melyre többféle megoldást is kidolgoztak (**35, 56, 58, 61, 62, 63**). A tévesen detektált szignál mintázathoz tartozó sejtmagok valamint a szignál nélküliek kizárandók. Az egyes csatornában a hibaarány független, a teljes hibaarányt az előbbiek szorzata adja (**26**). Emiatt meglepően alacsony analitikai pontosság ('accuracy') állhat fenn pl. egy többpróbás (3+) vizsgálatnál, de az általában komplex diagnosztikus szignál mintázat kritérium rendszer miatt ez a klinikai / diagnosztikus hatékonyságot alig befolyásolja (**64**). 2D analízis során a szignálok jelentős része kerülhet ki a fókusz síkból (**17**). Emiatt ma már a különböző fókusz síkokban történő kép akvizíció, majd a szignál mintázat 3D rekonstrukciója elengedhetetlen előfeltétele a pontos szignál detektálásnak (**26, 28, 31, 36, 40, 65, 66**). Ehhez elegendő a megfelelő szoftver mellett a hagyományos epiilluminációs fluoreszcens mikroszkóp. A konfokális lézer szkennelés és a 2-fotonos fluoreszcens mikroszkópia néhány vitathatatlan előnyük mellett meglévő hátrányai valamint komplexitásuk és áruk miatt nem kerültek be a rutin applikációkba (**67, 68, 69**).

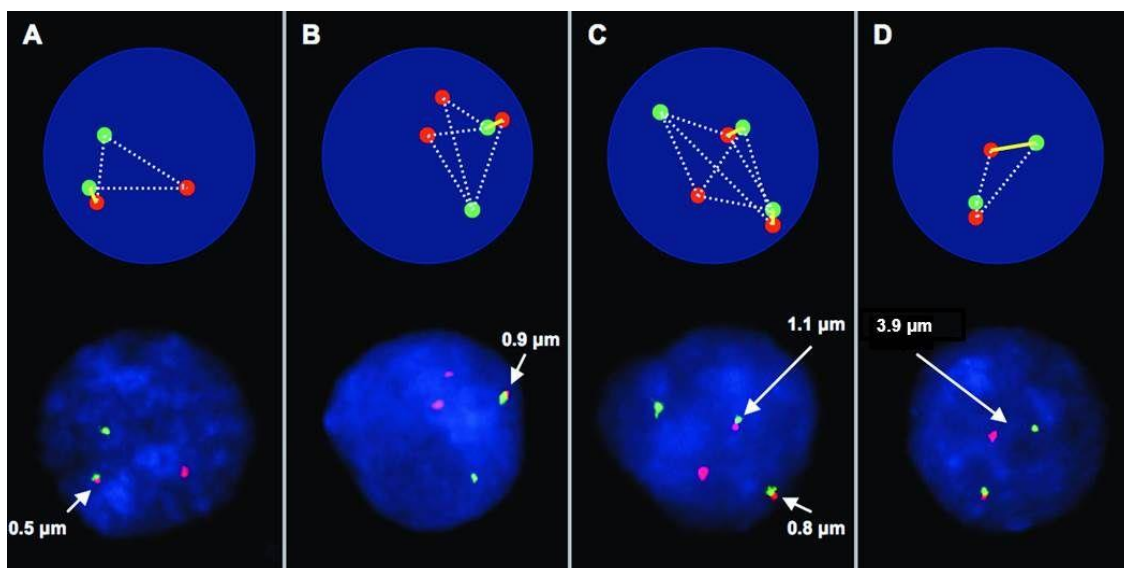
(iii.) A szignál mintázat kiértékelése a kiegyensúlyozott transzlokációk iFISH analízisének elengedhetetlen. Az eltérő színű szignálok közötti valós távolság mérése szükséges, mely 3D rekonstrukció nélkül nem lehetséges. A felhasznált próba típusa (pl., egyszerű fúziós, dupla fúziós vagy elváló) határozza meg, hogy mely távolság vagy távolságok fontosak, azaz diagnosztikusak a transzlokációra (3.5.2. ábra).

3.5.3. Az iFISH automatizáció története és applikációi.

A múlt század 90-es éveinek elején kezdődik az automatizáció története *Cremer és mtsai* (1992) és *Nederlof és mtsai* (1992) publikációival (**52, 71**), mely viszonylag lassan fejlődött (**72, 73-76**). Bár ez a folyamat a későbbiekben felgyorsult (**77-89**), melyben a páneurópai Concerted Action: Automation Molecular Cytogenetic Analysis (CA-AMCA, 1992 – 1997) szerepe vitathatatlan, a XXI. század elején egyre nagyobb hangsúly került a klinikai diagnosztikai applikációkra. Ezek felsorolására jelen munka nem vállalkozik, csak a fejlődés szempontjából néhányat emelünk ki, referenciaként utalunk publikált review tanulmányunkra (**70**). Ezek között hangsúlyozottan szerepel a HER2 génamplifikáció, nemcsak emlő vonatkozásában (**90-97**), a korai tumorgenezissel asszociált 1q és 3q valamint 1p és 3p allelikus aránytalanságok ('imbalances') (**53, 98**).

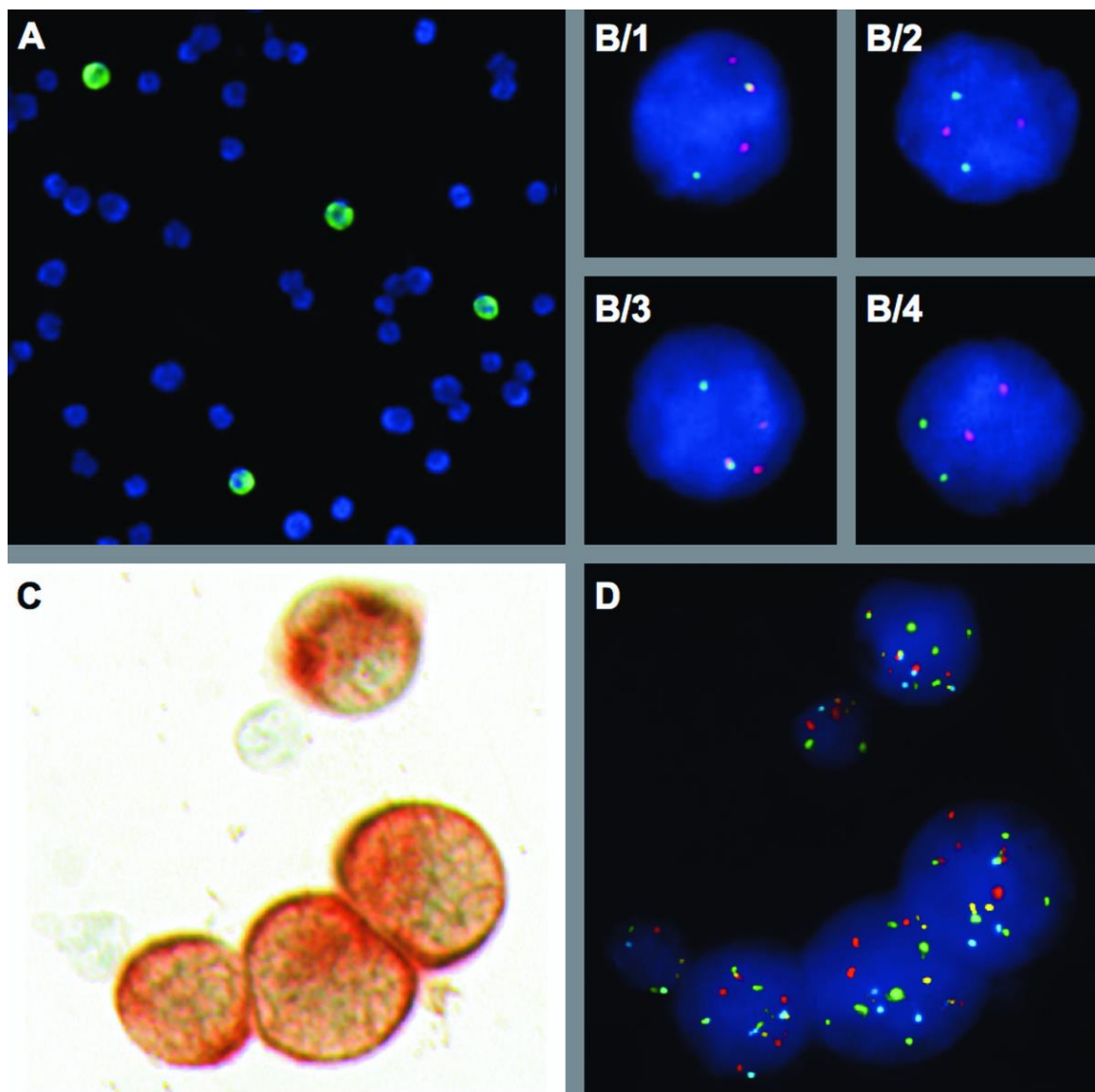


3.5.1. ábra Normál és – a szignál felismerés hibája miatti – abnormalis szignál mintázatok $t(9;22)(q34;q11)$ specifikus egyszeri fúziós próvával történt iFISH jelölés során. Az automatizált rendszer által meghatározott szignál mintázat a képek bal alsó sarkában látható (R-piros, G-zöld). A téves szignál felismerést / szignál szám meghatározást mutató képeken a szignálok fluoreszcens intenzitás eloszlása is látható. A Translokációra negatív mag. B Transzlokációra pozitív mag. C Tévesen szegmentált kis, csoportot ('cluster') képző, magok. D Fokozott autofluoreszcencia, a zöld jeleket nem lehet az artefaktoktól elkülöníteni. E Random ko-lokalizáció; két piros szignál ko-lokalizált. F Szignál hasadás; a nem-transzlokálódott piros és zöld szignál egyaránt hasadt. Mig a zöld szignálokat a szoftver helyesen számolja, addig a nem transzlokálódott piros szignált a rendszer két különálló szignálként értelmezi (26).



3.5.2. ábra Különböző, kiegyensúlyozott transzlokációt detektáló, kétszínű FISH próbák által mutatott, pozitívásra utaló szignál mintázatok. A különböző színű iFISH jelek közötti összes távolság feltüntetésre került, a kritikusakat folytonos sárga vonal jelzi. A Egyszeres fúziós (SF) próba esetén a zöld és piros próbák a juxtapozicionált szekvenciákhoz hibridizálnak. B A fúziós extraszignálos (ES) próba szet hasonló a SF-hoz, de ebben az esetben az egyik próba a transzlokációban résztvevő egyik kromoszóma töréspontján átível, így pozitívítás esetén a fúziós jel mellett az adott színben még egy addicionális kisebb jelet is látunk. C Kettős fúziós (DF) próba szet esetén a transzlokációban résztvevő mindkét kromoszóma töréspont régióját lefedi a zöld ill. piros próba, így a pozitívítást két fúziós jel valamint – a nem érintett kromoszómákat reprezentálандó – 1-1 zöld és piros szignál jelzi. D Elváló (BA) próba szet esetén a zöld és piros próbák az egyik, transzlokációban résztvevő kromoszóma töréspont régiója körüli centromerikus ill. a telomerikus szakaszt fedik le. Normál esetben látunk 2 fúziót, míg az egyiket alkotó zöld és piros jelek térbeli eltávolodása kromoszóma törésre utal.

A felső sorban a kék körök a sejtmagokat, a zöld és piros, kisebb körszimbólumok az iFISH szignálokat jelölik. Az alsó sorban 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) magfestett és BCR/ABL1-SF, ETV6/RUNX1 ES, BCR/ABL1 DF és IGH BA FISH próbákkal jelölt human csontvelő sejtek magjait látjuk. A kulcsfontosságú távolságok mért értékei olvashatóak (63x objektív) (70).



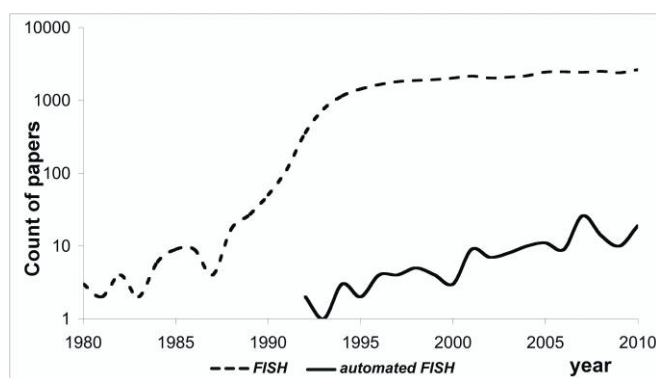
3.5.3. ábra Kombinált immunfenotípus és interfázis FISH (KIIF) analízis. **A** CD10+ csontvelő sejtek gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia indukciós terápia fázisában (20x). **B** A CD10-FITC jelölés eltávolítása után az ETV6 (zöld) és a RUNX1 (piros) géneket ES FISH próba szettel vizualizáltuk a relokalizált CD10+ sejtekben, mely lehetővé tette a CD10+ / ETV6-RUNX1+ leukaemia sejtek (B/1 és B/3) valamint a CD10+ / ETV6-RUNX1- normal haematogoniumok (B/2 és B/4) elkülönítését (63x) (70, 27). **C** Kromogén CK-7 immunjelölés alapján előszelektált urotheliális sejtek hólyagrákos beteg ürített vizeletéből nyert citológiai preparátumában. **D** ugyanezen sejtek iFISH genotipizálása CEP3 (piros), CEP7 (zöld), CEP17 (aqua) és LSI 9p21 (gold) próbákat tartalmazó multiplex iFISH próba szettel (UroVysion) (63x) (99, 100, 64).

Vizelet citológiai mintákban ilyen vizsgálatok tárták fel a krsz. 3, 7, 17 aneuszómia valamint a 9p21 (p16) delécio hólyagrák stádium és grádus prediktív erejét (**64, 99, 100, 101**). A 3p21.1 és a 10q22.3 abnormalitások tüdő karcinómában, a RET onkogén papilláris pajzsmirigy karcinómában, a krsz 3 és X numerikus aberrációinak vizsgálata méhszájrákban emelhetők még ki a nem hematológiai applikációkból (**39, 85, 102**). Az automatizált vizsgálatoknak nagy szerep juthat a ritka sejt detektálásban vagy ahol nagyszámú sejt vizsgálata szükséges, így a prenatalis (**32, 41, 46, 79, 103**) valamint a fertilitás (**37, 104**) vizsgálatok esetén továbbá az anyából nem-invazív módon kinyert mintákban a foetalis sejtek analizisének (**25, 40**). Az utóbbiban a kombinált fenotípus (foetalis hemoglobinn) és genotípus egy-sejt szintű vizsgálata új távlatokat nyitott (**47, 105**). A hematológiai alkalmazásokban vezet a BCR/ABL transzlokáció vizsgálata (**26, 31, 45, 66, 106**). Emellett a különböző 14q32 (IgH) régió átrendeződések szöveti körülmények közötti vizsgálatával valamint a hiperdiploid gyermekkori pALL klonális divergenciájával foglalkozó közlemények is napvilágot láttak (**28, 38, 57**).

Összességében megállapítható, hogy a morfológia (**75, 107, 108**) vagy az immunfenotípus (**27, 65, 80, 99, 109**) alapján előszelektált sejteken történő iFISH ('targeted-iFISH') alkalmazása és ennek automatizációja lesz a választandó módszer minden ritka esemény (sejt) vizsgálati applikációnál, mint pl. minimális reziduális betegség (MRD), keringő tumorsejt keresés, őssejt transzplantáció utáni kimérizmus analízis, vagy ahol a DAPI kép alapján a heterogén sejtpopulációban a target sejt nem meghatározható (**78, 99, 108, 109**) (3.5.3. ábra). A 'targeted' iFISH analitikai pontossága lehetővé teszi legalább 10^{-4} gyakorisági esemény vizsgálatát (**27**).

3.5.4. Perspektívák.

1. Az automatizált iFISH dektálás és szignál mintázat kiértékelés nem terjedt el olyan mértékben, mint az egy ilyen új és hatékony technológia esetén előzetesen várható volt (3.5.4. ábra). Ennek az lehet az oka, hogy – szemben pl. a flow citometriával – az objektum valamint szignál detektálás komplikált, applikáció, laboratórium és szoftver függő. Feltehetően ezért jelenleg még – szemben a flow citometriával /MFlowCyt/ - nincs konszenzus standardizációs irányelv ezen a területen, melynek létrehozása kívánatos (**70**)



3.5.4.ábra Az 1980 és 2010 között a FISH-ről és az automatizált FISH-ről publikált közlemények száma. Az adatok a PubMed (www.nlm.nih.gov) adatbázisból származnak ‘fluorescence in situ hybridization’, ‘interphase’, ‘automated/automatic’ kulcs-szó kereséssel **(70)**.

2. A jövőbeni, legnyilvánvalóbb automatizált iFISH indikációk a következők:

- (a) genetikai aberráció vizsgálata hisztológiai, a topográfia által vezérelt körülmények között.
- (b) ‘Targeted’ iFISH, a morfológia – immunfenotípus – iFISH kombinált vizsgálata egysejt szinten.
- (c) A genetikailag aberráns sejtpopuláció arányának direkt, sejtszintű meghatározása.
- (d) A klonális heterogenitás, a szubklonális architektúra feltárása.

4. FŐBB KÖVETKEZTETÉSEK – ÚJ EREDMÉNYEK

4.1.

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 eddig 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.

4.2.

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} érzékenységű 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 betegekből *in utero* keletkező leukaemia prekursor sejteket a csontvelőben, melyek csak az új eljárásaként kidolgozott KIIF eljárással voltak 'láthatóak'. A prekursor sejtek jelenléte kezelt betegekből összefüggést mutathat a recidiva hajlammal ezért ezek vizsgálata prediktív a betegség lefolyását illetően.

4.3.1.

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-től. 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 az ad különös jelentőséget, mert - a klinikai lefolyás alapján bizonyítottan - *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 IKZF1 gén lokuszok valamint a 14q32 régióban az IgH és TCR lokuszok veszteségei.

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 leírt egyedi veszteségek 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 összejt eredetű, CML típusú progressziót nem mutat, a csontvelői morfológiai 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 elsőben is, van egy Ph kromoszóma pozitív klón. Ez arra utal, hogy myeloproliferatív neoplasiára hajlamosító millióiban 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 klont és a klinikopathologia képet.

4.3.2.

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 összejt, 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.

4.3.3.

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.

4.4.

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-kból szortírozott HRS-szerű sejtek IgV_H FR I – CDR III régiójának, κ/λ mRNS expressziójának valamint az IgH konzervált oktamer promoter illetve enhancer régió specifikus transzkripció faktor és ko-faktor vizsgálata alapján azt találtuk, hogy legalábbis egyes esetekben ezen sejtek az összes ismert feno- és genotípus jegy alapján megkülönböztethetetlenek cHL HRS tumorsejtjeitől.

b. Ez a jelenség az immunszuppresszió indukálta, cHL irányú B-sejtes klonális evolúció in vivo patológiai 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.

4.5.

- 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 és applikációival és perspektíváival. Ennek kapcsán konszenzus standardizációs irányelveket körvonalaztunk.

5. IRODALOMJEGYZÉK**5.1. fejezet**

1. Jakab Zs, Balogh E, Kiss Cs, Pajor L, Oláh É: Biclonal Chromosomal Aberrations in a Child with Myelodysplastic Syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999, 108, 13-18.
2. Singer RH, Lawrence JB, Villave C.: Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Biotechniques.* 1986, 4, 230-246.
3. Bauman JGJ, Bentvelzen P.: Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization. *Cytometry.* 1988, 9, 517-524.
4. Bauman JGJ, Pinkel D, Trask, BJ, van Der Ploeg M: Flow cytometric measurement of specific DNA and RNA sequences. In *Flow cytogenetics.* Szerk.: Joe W. Gray. Academic Press Limited, San Diego, CA. 1989, 275-301.
5. Bayer JA, Bauman JGJ: Flow cytometric detection of β -Globin mRNA in murine haemopoietic tissues using fluorescent in situ hybridization. *Cytometry.* 1990, 11, 132-143.
6. Pajor L., Bauman JGJ.: Flow cytometric measurement of rRNA levels detected by fluorescent in situ hybridization in differentiating K-562 cells. *Histochemistry,* 1991, 96, 73-81.
7. Pajor L, Honeyman TW: 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.
8. Falus A, Váradi A, Raskó I: Az orvosi genetikai diagnosztika új eszköze, a DNS-chip *Orvosi Hetilap.* 1998, 139, 957-960.
9. Femino AM, Fay FS, Fogarty K, Singer RH: Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science,* 1998, 280, 585-590.
10. Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1969, 64, 600-604.
11. John HA, Birnstiel ML, Jones KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature.* 1969, 223, 582-587.
12. Cremer T, Landegent J, Bruckner A. Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with L1.84. *Hum. Genet,* 1986, 74, 346-352.
13. Bauman JGJ, Wiegant J, Borst P, van Duijn P.: A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Exp. Cell Res.,* 1980, 128, 485-490.
14. Langer PR, Waldrop AA., Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981, 78, 6633-6637.
15. Hopman AH, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, van der Ploeg M, Duijn P: Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry.* 1986, 85, 1-4.
16. Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK: Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry,* 1989, 10, 20-27.
17. Nederlof PM, van der Flier S, Wiegant J, Raap AK, Tanke HJ, Ploem JS, van der Ploeg M: Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry.* 1990, 11, 126-131.
18. Nederlof PM, van der Flier S, Vrolijk J, Tanke HJ, Raap AK: Fluorescent ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry.* 1992, 13, 839-845.
19. Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J: New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridization: COBRA: Combined Binary Ratio labelling. *Eur J Hum Genet.* 1999, 7, 2-11.
20. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, 83, 2934-2938.
21. Emmerich P, Jauch A, Hofmann M.-C. és mtsai: Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells. *Lab. Invest.* 1989, 61, 235-242.
22. Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK: Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet. Cell. Genet.,* 1990, 54, 108-111.

23. Cooper GM: The organization of cellular genomes. In *The cell. A molecular approach*. ASM Press, Washington. 1996, 142-143.
24. Trask B, Pinkel D, van den Engh G: The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. *Genomics*, 1989, 5, 710-717.
25. Cooke HJ, Hindley J: Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 1979, 6, 3177-3197.
26. Willard HF, Wayne JS: Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *TIG*, 1987, 3, 192-198.
27. Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalitsis P: A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 1179-1182.
28. Pajor, L.: Az interfázis citogenetika alkalmazási lehetőségei az onkopatológiai diagnosztikában. *Orvosi Hetilap*. 1998, 139, 2939-2946
29. Beck JLM, Hopman AHN, Vooijs GP, Ramaekers FC: Chromosome detection by in situ hybridization in cancer cell populations which were flow cytometrically sorted after immunolabeling. *Cytometry*, 1992, 13, 346-355.
30. 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.
31. Verma LS, Luke S.: Variations in alphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique. *Genomics*. 1992, 14, 113-116.
32. Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O: DNA content in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1989, 113, 619-626.
33. Ross DW: Clinical usefulness of DNA ploidy and cell cycle studies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1993, 117, 1077.
34. Sinton, EB, Carver RK, Morgan DL, Philpott PJ, Truell JE, Riemann D, Ashton ME: Prospective study of concurrent ploidy analysis and routine cytopathology in body cavity fluids. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1990, 114, 188-194.
35. Look AT, Robertson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, Dahl GV, et al.: Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1985, 65, 1079-1086.
36. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM: Prognostic implications of chromosomal finding in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Brit. Med. J.*, 1978, 2, 1529-1530.
37. Tarkkanen M, Nordling S, Böhling T, Kivioja A, Karaharju E, Szymanska J, Elomaa I, Knuutila S: Comparison of cytogenetics, interphase cytogenetics, and DNA flow cytometry in bone tumors. *Cytometry*, 1996, 26, 185-191.
38. Méhes Károly és Kosztolányi György: A mozaicizmus mai értelmezéséről. *Orvosi Hetilap*, 1990, 131, 1815-1819.
39. Ramael M, van Steelandt H, Styven G, Degroote, J: Application of the primed in situ labeled (PRINS) method for detection of numerical chromosomal aberrations in paraffin embedded formalin fixed tissue of molar and non-molar pregnancies. *Biochemica*, 1997, 2, 18-20.
40. Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola JJ.: Improved technique for analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 1994, 16, 93-99.
41. Kapranos N, Kontogeorgos G., Frangia K, Kokka E: Effect of fixation on interphase cytogenetic analysis by direct fluorescence in situ hybridization on cell imprints. *Biotech. Histochem.*, 1997, 72, 148-151.
42. Dhingra K, Sneige N, Pandita TK, Johnston DA, Lee JS, Emami K, Hortobagyi GN, Hittelman WN: Quantitative analysis of chromosome in situ hybridization signal in paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry*, 1994, 16, 100-112.
43. 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.
44. Thompson CT, LeBoit PE, Nederlof PM, Gray JW: Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. *Am. J. Pathol.*, 1994, 144, 237-242.
45. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1983, 31, 1333-1335.

46. Alers JC, van Dekken H: Interphase cytogenetic analysis of solid tumors by non-isotopic DNA in situ hybridization. *Prog. Histochem. Cytoc.*, 1996, 31, 85-89.
47. Vaandrager JW, Schuurung E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM: Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 1996, 88, 1177-1182.
48. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher MR, Ganser A, Lichter P, Döhner H: Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukaemia by in situ hybridization. *Blood*, 1994, 83, 1922-1928.
49. Coignet LJA, Schuurung E, Kibbelaar RE, Raap TK, Kleiverda KK, Bertheas MF, Wiegant J, Beverstock G, Kluin PM: Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 1996, 87, 1512-1519.
50. Melo V: The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, 1996, 10, 751-756.
51. Speicher MR, Carter NP: The new cytogenetics: Blurring the Boundaries with Molecular Biology. *Nat Rev Genet.* 2005, 6, 782-792.
52. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R: Interphase Cytogenetics of Hematological Neoplasms under the Perspective of the Novel WHO Classification. *Anticancer Res.* 2003, 23, 1139-48.
53. Monaco AP, Larin Z: YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *TIBTECH*, 1994, 12, 280-286.
54. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, 85, 5698-5702.
55. Delfau MH, Kerckaert JP, Collyn d'Hooghe M, Fenaux P, Lai JL, Jouet JP, Grandchamp B.: Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia*, 1990, 4, 1-5.
56. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D: Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science*, 1990, 250, 559-562.
57. Arnoldus EP, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK: Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1990, 54, 108-111.
58. Amiel A, Yarkoni S, Slavin S, Or R, Lorberboum-Galski H, Fejgin M, Nagler A: Detection of minimal residual disease state in chronic myelogenous leukaemia patients using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogen.*, 1994, 76, 59-64.
59. Brookes S, Lammie GA, Schuurung E, Dickson C, Peters G.: Linkage map of a region of human chromosome 11q13 amplified in breast and squamous cell tumors. *Genes Chrom. Cancer*, 1992, 4, 290-301.
60. Coignet LJ, Schuurung E, Kibbelaar RE, Raap TK, Kleiverda KK, Bertheas MF, Wiegant J, Beverstock G, Kluin PM: Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 1996, 87, 1512-1519.
61. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Digonnet I, Rouault JP, Tigaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP: Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*, 1994, 83, 1871-1875.
62. Lim LC, Segal GH, Wittwer CT: Detection of bcl-1 gene rearrangement and B-cell clonality in mantle cell lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995, 104, 689-695.
63. Monteil M, Callanan M, Dascalescu C, Sotto JJ, Leroux D: Molecular diagnosis of t(11;14) in mantle cell lymphoma using two-colour interphase fluorescence in situ hybridization. *Brit. J. Haematol.*, 1996, 93, 656-660.
64. Sápi Z, Antal I, Pápai Zs, Szendrői M, Mayer Á, Jakab K, Pajor L, Bodó M: Diagnosis of soft tissue tumors by fine-needle aspiration with combined cytopathology and ancillary techniques. *Diagnostic Cytopathology* 2002, 26, 232-242
65. Knuutila S.: Morphology antibody chromosome technique for determining phenotype and genotype of the same cell. In *Current protocols in human genetics*. Boyle AL., John Wiley & Sons, Madison, Conn. 1996, Unit 4.7.
66. Knuutila S.: Lineage specificity in haematopathological neoplasms. *Brit. J. Haematol.*, 1997, 96, 2-11.
67. Weber-Matthiesen K, Müller-Hermelink A, Deerberg J, Scherthan H, Schlegelberger B, Grote W. Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem.* 1993, 41, 1641-1644.

68. Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R: Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol.* 2002, 161, 413-420.
69. Méhes G, Luegmayr A, Kornmüller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF: Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology. *Am J Pathol.* 2003, 163, 393-399
70. Bulten J, Poddighe PJ, Robben JC, Gemmink JH, de Wilde PC, Hanselaar AG.: Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 1998, 152, 495-503.
71. Irinopoulou T, Vassy J, Beil M, Nicolopoulou P, Encaoua D, Rigaut JP.: Three-dimensional DNA image cytometry by confocal scanning laser microscopy in thick tissue blocks of prostatic lesions. *Cytometry*, 1997, 27, 99-105.
72. Sneige N, Sahin A, Dinh M, El-Naggar A.: Interphase cytogenetics in mammographically detected breast lesions. *Hum. Pathol.* 1996, 27, 330-335.
73. Anastasi J, Feng J, Dickstein JI, Le Beau MM, Rubin CM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW: Lineage involvement by BCR/ABL in Ph+ lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast phase vs Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1996, 10, 795-802.
74. Raskind WH, Steinmann L, Najfeld V: Clonal development of myeloproliferative disorders: clues to hematopoietic differentiation and multistep pathogenesis of cancer. *Leukemia*, 1998, 12, 108-116.
75. Najfeld V: Clonal origin of leukemia - revisited. A tribute to Philip J. Fialkow, MD. *Leukemia*, 1998, 12, 106-107.
76. Gopcsa L, Barta A, Banyai A, Kanya M, Pajor L, Foldi J, Paloczi K: Acute myeloid leukaemia of donor cell origin developing 5 years after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplantation.* 2002, 29, 449-452
77. Alpár D, Nagy G, Hohoff C, Kajtár B, Bartyik K, Hermes J, Jáksó P, Andrikovics H, Kereskai L, Pajor L: Sex chromosome changes after sex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation can mislead the chimerism analysis. *Pediatr. Blood Cancer* 2010, 55, 1239-1242.
78. Alpár D, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L: 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
79. Cook, JR: Paraffin Section Interphase Fluorescence In Situ Hybridization in the Diagnosis and Classification of Non-Hodgkin Lymphomas *Diagn Mol Pathol.* 2004, 13, 197-206.
80. Hicks DG, Longoria G, Pettay J, Grogan T, Tarr Sh, Tubbs R: In situ hybridisation in the pathology laboratory: General principles, automation and emerging research applications for tissue-based studies of gene expression. *J Mol Histol.* 2004, 35, 595-601.
81. Nowell PX: The clonal evolution of tumor cell population. *Science.* 1976, 194 23-28
82. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, et al.: Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science.* 2008, 319, 336-339.
83. Greaves M.: Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman Lecture. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009, 3-12.
84. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Titley I, Swansbury J, et al.: Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*, 2011, 469, 56-361.
85. Greaves M, Maley C: Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2011, 481, 306-313
86. Levsky JM, Singer RH: Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Science*, 2003, 116, 2833-2838
87. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, et al.: The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.* 1997, 183, 131-133.

5.2.1. fejezet

1. Brunning RD, Borowitz MJ, Matutes E, Head D, Randrin G, Swerdlow S. H., Bennett J M: Precursor B lymphoblastic leukaemia / lymphoblastic lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press. 2001, 11-114.
2. Borowitz MJ, Chan JKC: B lymphoblastic leukaemia/lymphoma not otherwise specified. B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC. 2008, 168-175.
3. Alexandrov IA, Yurov YB, Mitkevits S, Gindilis, VM: Chromosomal organization of human aliphoid DNA. Dokl Akad Nauk USSR. 1986, 228, 242-245.
4. Vorsanova SG, Alexandrov IA, Yurov YB: A list of chromosome-specific centromeric DNA probes tested as a molecular marker for identification of the human chromosomes in molecular and clinical cytogenetic studies. Cytogenet Cell Genet. 1989, 5,1111-1114.
5. Devilee P, Kievits T, Wayne JS, Pearson PL, Willard HF: Chromosome-specific alpha satellite DNA: isolation and mapping of a polymorphic aliphoid repeat from human chromosome 10. Genomics. 1988,3,1-7.
6. Wayne JS, Willard HF: Molecular analysis of a deletion polymorphism in alpha satellite of human chromosome 17: evidence for homologous unequal crossing-over and subsequent fixation. Nucl Acids Res. 1986, 14, 6915-6927.
7. Devilee P, Cremer T, Slagboom P, Bakker E, Scholl HP, Hager HD, Stevenson AF, Cornelisse CJ, Pearson PL:Two subset of human aliphoid repetitive DNA show distinct preferential localization in the pericentric regions of chromosomes 13, 18, and 21. Cytogenet Cell Genet. 1986, 41, 193-201.
8. Cook HJ, Schmidtke J, Gosden JR: Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. Chromosoma. 1982, 87, 491-502.
9. 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.
10. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN, and the Association for Molecular Pathology Clinical Practice Committee and the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee Guidance for Fluorescence in Situ Hybridization Testing in Hematologic Disorders J Molr Diagn. 2007,9,134–143.
11. Donat A, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L: Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2007, 173, 23-30.
12. 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.
13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biology Evol. 2011, 28, 2731-2739.
14. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A.: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol: 1999, 16, 37-48.

5.2.2 fejezet

1. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB.: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 1995, 9, 1783-1786.
2. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, Schaison G, Sigaux F: TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996, 88, 302-308.
3. Hermans A, Gow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeijer A, Wiedemann LM, Grosveld G: Bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988, 2, 628-633.
4. 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.
5. Langerak AW, Szczepański T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ: Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997, 11, 2192-2199.
6. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, et al.: Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999, 13, 110-118.
7. Szczepański T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ.: Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002, 99, 2315-2323.
8. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997, 25, 3389-3402.
9. Lefranc MP, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, Carillon E, Duvergey H, Houles A, Paysan-Lafosse T, et al.: IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res*. 2015, 43(Database issue):D413-22. doi: 10.1093/nar/gku1056
10. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE.: Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000, 14, 1426-1435.
11. Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, van Gastel-Mol EJ, Oud ME, van Dongen JJ: Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood*. 2001, 98, 2456-2465. 2001
12. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hählen K, van Wering ER, van Dongen JJ: Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002, 16, 928-936.
13. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, et al.: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999, 13, 1901-1928.
14. Madzo J, Zuna J, Muziková K, Kalinová M, Krejčí O, Hrusák O, Otová B, Starý J, Trka J.: Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer*. 2003, 97, 105-113.
15. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneifné M, Alpár D, Pajor L.: Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei. *Cytometry A*. 2006, 69, 506-514
16. Alpár D, Kajtár B, Kneifné M, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L: Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007, 173, 23-30.

5.2.3.fejezet

1. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential Thrombocythaemia: An Interim Report From the Polycythaemia Vera Study Group. *Semin. Hematol.* 1986, 23, 177-182.
2. Lion T, Prischl F, Haas OA, Pont J, Schwarzmeier J: Non-radioactive detection of the rearranged BCR/ABL sequences amplified by polymerase chain reaction. *Leukemia.* 1991, 5, 156-159.
3. Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M, Iwaya M, Nakazawa S, Okamura J, Kamada N, Tanaka K, Kobayashi N, Mizutani S: Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer.* 1991, 68, 2426.
4. Hermans A, Gow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeijer A, Wiedemann LM, Grosveld G.: bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome-positiv acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1988, 2, 628.
5. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW: Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation.. *Am. J. Genet.* 1992, 51, 1229-1239
6. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and the visulization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986, 18, 5-14.
7. Pajor L, Honeyman T. 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.
8. Vardiman JW, Brunning RD, Harris NL: Chronic myeloproliferative diseases. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* IARCPress Lyon. 2001, 17-42
9. 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.
10. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987, 162, 156.
11. Delfau MH, Kerckaert JP, d'Hooghe MC, Fenaux P, Lai JL, Jouet JP, Grandchamp B: Detection of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction. *Leukemia.* 1990, 4, 1-5.
12. Lion T, Prischl F, Haas OA, Pont J, Schwarzmeier J: Non-radioaktive detection of the rearranged BCR/ABL sequences amplified by polymerase chain reaction. *Leukemia,* 1991, 5, 156-159.
13. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, 85, 5698-5702.
14. Nakamura K, Miyashita T, Ozaki M, Iwaya M, Nakazawa S, Okamura J, Kamada N, Tanaka K, Kobayashi N, Mizutani S: Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer.* 1991, 68, 2426-2430.
15. Hermans A, Gow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeijer A, Wiedemann LM, Grosveld G: Bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome-positiv acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1988, 2, 628.
16. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, et al.: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003, 17, 2257-2317
17. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon Alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med.* 1994, 330, 820-825.
18. Kantarjian HM, O'Brien S, Anderlini P, Talpaz M. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigational options. *Blood.* 1996, 87, 3069-3081.
19. 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.
20. Kajtár B, Méhes G, Jáksó P, Kereskai L, Iványi JL, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, et al.: A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorozása *Orvosi Hetilap.* 2006, 147, 963-970.
21. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneifné M, 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.

22. Gaiger A, Henn T, Hörth E, Geissler K, Mitterbauer G, Maier-Dobersberger T, Greinix H, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, et al.. Increase of BCR-ABL chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*. 1995, 86, 2371-2378.
23. Vass JA, Kereskai L, Pajor L: Krónikus myeloid leukaemia komplex molekuláris monitorizálása. *Orvosi Hetilap*. 2000, 141, 2279-2285.
24. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brian S, Beran M, Pierce S, Talpaz M: The Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to Interferon- α therapy. *Ann Intern Med*. 1995, 122, 254-261.
25. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, et al.: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl. J. Med*. 2002, 346, 645-652.

5.2.4. fejezet

1. Zettl A, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, Ott M, Müller-Hermelink HK, Ott G. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified Am. J. Clin. Pathol. 2002, 117, 368-379.
2. Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Tiemann M, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H.: Frequent latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T cells and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T-cell lymphomas Blood. 1993, 82, 217-223

5.3.1. fejezet

1. Lamper F: Cellulärer DNS-Gehalt und Chromosomenzahl bei der akuten Leukämie im Kindesalter und ihre Bedeutung für Chemotherapie und Prognose. *Klin. Wochenschr.* 1967, 45, 763-768.
2. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM: Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Brit. Med. J.*, 1978, 2, 1529-1530.
3. Swansbury GJ, Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM, Sallan SE, Garson OM, Sakurai M: Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia of childhood: an independent prognostic factor. *Lancet.* 1981, 2, 249-250.
4. Kaneko Y, Hayashi Y, Sakurai M: Chromosomal findings and their correlation to prognosis in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1981, 4, 227-235.
5. Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D, Chilcote RR, Check I, Sakurai M: Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1982, 42, 2918-2929.
6. Look AT, Melvin SL, Williams DL, Brodeur GM, Dahl GV, Kalwinsky DK, Murphy SB, Mauer AM: Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia. *Blood.* 1982, 60, 959-967.
7. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera G, Dahl GV: Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1982, 60, 864-871.
8. Heerema NA, Palmer CG, Baehner RL: Karyotypic and clinical findings in a consecutive series of children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.*, 1985, 17, 165-179.
9. Kowalczyk JR, Grossi M, Sandberg AA: Cytogenetic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985, 15, 47-64.
10. Smets LA, Slater RM, Behrendt H, Van't Veer MB, Homan-Blok J: Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *Br J Haematol.* 1985, 61, 113-123.
11. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, Gaynon PS, Hirsch B, Magenis RE, McGavran L, et al.: Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007, 46, 684-693.
12. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (2013)
13. Paulsson K, Johansson B: [High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia](#). *Genes Chromosomes Cancer.* 2009, 48, 637-660.
14. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, Dahl GV: Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1985, 65, 1079-1086.
15. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK: Heterogeneity of hyperdiploid (51 - 67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1996, 10, 213-224.
16. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, Borowitz MJ, Gaynon PS, Carroll AJ, Heerema NA: High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia.* 2005, 19, 734-740.
17. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, Broadfield ZJ, Harris RL, Taylor KE, Gibson BE, et al.: Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2003, 102, 2756-2762.
18. Dastugue N, Suciu S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, Bakkus M, Pagès MP, Yakouben K, Nelken B, et al.: Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood.* 2013, 121, 2415-2423.
19. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, Autio K, Barbany G, Borgström G, Cavelier L, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, et al.: High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocol *Haematologica.* 2013, 98, 1424-1432.
20. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, Heldrup J, Behrendtz M, Young BD, Johansson B: Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107, 21719-21724.
21. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM: Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1992, 80, 203-208.

22. Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S, Hettinger K, Schmitt K, Stöckler-Ipsiroglu S, Haas OA: Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood*. 2002, 100, 347-349
23. Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, Szczepanski T, Williams MD, Griffiths MJ, van Dongen JJ, Greaves MF.: Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia*. 2003, 17, 2202-2206
24. Paulsson K, Panagopoulos I, Knuutila S, Jee KJ, Garwicz S, Fioretos T, Mitelman F, Johansson B.: Formation of trisomies and their parental origin in hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2003, 102, 3010-3015.
25. Paulsson K, Mörsé H, Fioretos T, Behrendtz M, Strömbeck B, Johansson B: [Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia](#). *Genes Chromosomes Cancer*. 2005, 44, 113-122.
26. Alpár D, Pajor G, Varga P, Kajtár B, Pótó L, Mátics R, Vojcek A, Ottoffy 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.
27. Chen B, Wang YY, Shen Y, Zhang WN, He HY, Zhu YM, Chen HM, Gu CH, Fan X, Chen JM. et al.: Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries. *Leukemia* 2012, 26, 1608-1616.
28. Paulsson K: Genomic heterogeneity in acute leukemia.: *Cytogenet Genome Res*. 2013, 139, 174-180.
29. Blandin AT, Mühlematter D, Bougeon S, Gogniat C, Porter S, Beyer V, Parlier V, Beckmann JS, van Melle G, Jotterand M: Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. [Cancer Genet Cytogenet](#). 2008, 186,69-77.
30. Talamo A, Chalandon Y, Marazzi A, Jotterand M: Clonal heterogeneity and chromosomal instability at disease presentation in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010, 203, 209-214.
31. Höglund M, Frigyesi A, Säll T, Gisselsson D, Mitelman F.: Statistical behavior of complex cancer karyotypes *Genes Chromosomes Cancer*. 2005, 42, 327-341.
32. Gawad C, Pepin F, Carlton VE, Klinger M, Logan AC, Miklos DB, Faham M, Dahl G, Lacayo N.: Massive evolution of the Immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia *Blood*. 2012, 120, 4407-4417
33. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997, 386, 623-627.
34. Davidsson J, Paulsson K, Lindgren D, Lilljebjörn H, Chaplin T, Forestier E, Andersen MK, Nordgren A, Rosenquist R, Fioretos T. et al.: Relapsed childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia: presence of preleukemic ancestral clones and the secondary nature of microdeletions and RTK-RAS mutations. *Leukemia*. 2010, 24, 924-931.
35. Betts DR, Riesch M, Grotzer MA, Niggli FK: The investigation of karyotypic instability in the high-hyperdiploidy subgroup of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2001, 42, 187-193.
36. Alpár D, de Jong D, Savola S, Yigittop H, Kajtár B, Kereskai L, Pajor L, Szuhai K: MLPA is a powerful tool for detecting lymphoblastic transformation in chronic myeloid leukemia and revealing the clonal origin of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia *Cancer Genet*. 2012, 205, 465-469
37. Gordon DJ, Resio B, Pellman D: Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*. 2012, 13, 189-203
38. Moorman AV, Clark R, Farrell DM, Hawkins JM, Martineau M, Secker-Walker LM.: Probes for Hidden Hyperdiploidy in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 1996, 16, 40-45.

5.3.2. fejezet

1. Cortes JE, Kantarjian HM: Acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1995, 76, 2393-2417.
2. Pui CH: Childhood leukemias. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 1618-1630.
3. Reiter A: Chemotherapy in 998 unselected childhood ALL patients. *Blood*. 1994, 84, 3122-3133.
4. Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Lampert F, Niethammer D, Reiter A, Schellong G.: Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies. *Hamatol. Bluttransfus.* 1990, 33, 439-450.
5. Schrappe M, Reiter A, Sauter S, Ludwig WD, Wörmann B, Harbott J, Bender-Götze C, Dörffel W, Dopfer R, Frey E, et al.: Concept and interim result of the ALL-BFM 90 therapy study in treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescent: the significance of initial therapy response in blood and bone marrow. *Klin. Padiatr.* 1994, 206, 208-221.
6. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, et al.: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 1998, 352, 1731-1738.
7. Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML, Behm FG, Pui CH, Abromowitch M, Mirro J, Ochs JS, Look AT, Williams DL: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet*. 1991, 337, 61-66.
8. Schorin MA, Blattner S, Gelber RD, Tarbell NJ, Donnelly M, Dalton V, Cohen HJ, Sallan SE: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocol 85-01. *J. Clin. Oncol.* 1994, 12, 740-747.
9. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, et al.: Uniform approach to risk classification and treatment assignment of children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1996, 14, 18-24.
10. Apjok E, Schuler D, Borsi J, Koós R: Leukémiás megbetegedések előfordulása és jellemző statisztikai sajátosságai a 0-18 éves korosztályban Magyarországon, az 1988 és 1992 közötti 5 éves periódusban. *Népegészségügy.* 1994, 75, 143-146.
11. Borowitz MJ, Chan JKC: B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. In: WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Eds.: Swerdlow SH et al., Lyon. 2008, 171.
12. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, Schaison G, Sigaux F: TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996, 88, 302-308.
13. Satake N, Kobayashi H, Tsunematsu Y, Kawasaki H, Horikoshi Y, Koizumi S, Kaneko Y: Minimal residual disease with TEL-AML1 fusion transcript in childhood acute lymphoblastic leukaemia with t(12;21). *Brit. J. Haematol.* 1997, 97, 607-611.
14. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, et al.: Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy trials. *Blood*. 1997, 90, 571-577.
15. Kobayashi H, Satake N, Maseki N, Sakashita A, Kaneko Y: The der(21)t(12;21) chromosome is always formed in a 12;21 translocation associated with ALL. *Brit. J. Haematol.* 1996, 94, 105-111.
16. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffé M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA: High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage ALL. *Blood*. 1995, 86, 4263-4269.
17. Viehmann S, Borkhardt A, Ritterbach J, Schrappe M, J. Harbott J, Lampert F: A retrospective and prospective RT-PCR study to evaluate the clinical relevance of the TEL/AML1 gene rearrangement in children with ALL. *Onkologie*. 1997, 20, suppl 1, 10.
18. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F.: Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood*. 1997, 90, 4933-4937.
19. Lanza C, Volpe G, Basso G, Gottardi E, Barisone E, Spinelli M, Ricotti E, Cilli V, Perfetto F, Madon E, et al.: Outcome and lineage involvement in t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Brit. J. Haematol.* 1997, 97, 460-462.
20. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, Gilliland DG: Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998, 92, 4792-4797.
21. Rubnitz JE, Behm FG, Wichlan D, Ryan C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Hancock ML, Relling MV, Evans WE, et al.: Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. *Leukemia*. 1999, 13, 19-21.

22. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, et al.: TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia, *Blood*. 1998, 9, 1716-1722.
23. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR.: TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995, 9, 1985-1989.
24. Zuna J, Hrusák O, Kalinová M, Muziková K, Starý J, Trka J.: TEL-AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Leukemia*. 1999, 13, 22-24.
25. Ciudad J, San Miguel JF, Lopez-Berges MC, Vidriales B, Valverde B, Ocqueteau M, Mateos G, Caballero MD, Hernandez J, Moro MJ, et al.: Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1998, 16, 3774-3781.
26. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, et al.: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002, 100, 52-58.
27. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, et al.: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000, 96, 2691-2696.
28. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998, 352, 1731-1738.
29. Pui CH, Campana D: New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000, 14, 783-785.
30. Szczepański T: Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007, 21, 622-626.
31. Metzler M, Mann G, Monschein U, Lodzinski M, Gall C, Flohr T, Viehmann S, Langer T, Schrappe M, Gadner H. et al.: Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. *Haematologica*. 2006, 91, 683-686.
32. Bruggemann M, Droese J, Bolz I, Luth P, Pott C, von Neuhoff N, Scheuring U, Kneba M: Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000, 14, 1419-1425.
33. Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000, 14, 1426-1435.
34. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001, 15, 1485-1487.
35. van der Velden VH, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJ: Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002, 16, 928-936.
36. van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hahlen K, Kamps WA, van Wering ER, van Dongen JJ: Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia*. 2002, 16, 1432-1436.
37. de Haas V, Breunis WB, Dee R, Verhagen OJ, Kroes W, van Wering ER, van Dongen JJ, van den Berg H, van der Schoot CE: The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2002, 116, 87-93.
38. 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. *Pathol Oncol Res*. 2003, 9, 174-179.
39. Ryan DH, Chapple CW, Kossover SA, Sandberg AA, Cohen HJ. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. *Blood*. 1987, 70, 814-821.
40. Jennings CD, Foon KA: Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997, 90, 2863-2892.

41. Pajor L, Szuhai K, Méhes G, Kosztolanyi G, Jáksó P, Lendvai G, Szanyi I, Kajtár P: Combined metaphase, interphase cytogenetic, and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry*. 1998, 34, 87-94.
42. Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK: Hyper-diploid (47e50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 1992, 79, 3245-3252.
43. Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S: Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001, 131, 125-134.
44. Cuneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Scapoli G, Castoldi G, et al.: Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia*. 1998, 12, 1718-1723.
45. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD: Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood*. 1992, 79, 1796-1801.
46. Beck JL, Hopman AH, Vooijs GP, Ramaekers FC: Chromosome detection by in situ hybridization in cancer cell populations which were flow cytometrically sorted after immunolabeling. *Cytometry*. 1992, 13, 346-355.
47. Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, Rasmussen M: Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004, 12, 259-265.
48. Hill FS, Marchetti F, Liechty M, Bishop J, Hozier J, Wyrobek AJ: A new FISH assay to simultaneously detect structural and numerical chromosomal abnormalities in mouse sperm. *Mol Reprod Dev*. 2003, 66, 172-180.
49. Graf MD, Gill P, Krew M, Schwartz S: Prenatal detection of structural abnormalities of chromosome 18: associations with interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) and maternal serum screening. *Prenat Diagn*. 2002, 22, 645-648.
50. Kowalczyk JR, Gaworczyk A, Winnicka D, Lejman M, Babicz M: Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: a test study for establishing false positive rate. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003, 142, 51-55.
51. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W: Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem*. 1992, 40, 171-175.
52. Méhes G, Luegmayr A, Ambros IM, Ladenstein R, Ambros PF: Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in the bone marrow. *Clin Cancer Res*. 2001, 7, 1969-1975.
53. Martin-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R: Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol*. 2002, 161, 413-420.
54. Lacza A, Jáksó P, Kereskai L, Szuhai K, Méhes G, Pajor L: A t(12;21) incidenciája és megoszlása a gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia prognosztikai csoportjaiban. *Orvosi Hetilap*, 2000, 141, 1495-1500.
55. 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.
56. Alpár D, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai L, Pajor L: Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and fluorescence in situ hybridization for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007, 173, 23-30.
57. 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.
58. Raimondi SC: Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993, 81, 2237-2251.
59. Cavé H, Cacheux V, Raynaud S, Brunie G, Bakkus M, Cochaux P, Preudhomme C, Lai JL, Vilmer E, Grandchamp B: ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1997, 11, 1459-1464.
60. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG: Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995, 92, 4917-4921.

61. Romana SP, Mauchauffé M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA: The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*. 1995, 85, 3662-3670.
62. Meyers S, Downing JR, Hiebert SW: Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA binding proteins: the runt homology domain is required for DNA-binding and protein-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 1993, 13, 6336-6345.
63. Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD: PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 5558-5568.
64. Shoemaker SG, Hromas R, Kaushansky K: Transcriptional regulation of interleukin 3 gene expression in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, 87, 9650-9654.
65. Pui CH, Relling MV, Downing JR: Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004, 350, 1535-1548.
66. Zelent A, Greaves M, Enver T.: Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*. 2004, 23, 4275-4283.
67. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M.: Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 8242-8247.
68. McHale CM1, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, Loh ML, Smith MT.: Prenatal origin of TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia in children born in California. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003, 37, 36-43.
69. Konrad M, Metzler M, Panzer S, Ostreicher I, Peham M, Repp R, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grumayer ER.: Late relapses evolve from slow-responding subclones in t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: evidence for the persistence of a preleukemic clone. *Blood*. 2003, 101, 3635-3640.
70. Metzler M, Mann G, Monschein U, Lodzinski M, Gall C, Flohr T, Viehmann S, Langer T, Schrappe M, Gadner H, et al.: Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. *Haematologica*. 2006, 91, 683-686.
71. Greaves M, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM: Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003, 102, 2321-2133.
72. Greaves M: In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev*. 2005, 81, 123-129.
73. Burjanivova T, Madzo J, Muzikova K, Meyer C, Schneider B, Votava F, Marschalek R, Stary J, Trka J, Zuna J: Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL. *BMC Cancer*. 2006, 6, 100.
74. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, Green J, Colman S, Piacibello W, Buckle V, et al.: Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*. 2008, 319, 336-339.
75. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Titley I, Swansbury J: Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011, 469, 356-361.
76. Greaves M, Maley CC: Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012, 481., 306-313.
77. Andreasson P, Johansson B, Strömbeck B, Donnér M, Mitelman F, Höglund M.: Childhood acute lymphoblastic leukaemia with ider(21)(q10)t(12;21(p12;q22): a new resurrent abnormality showing ETV6/CBFA2 fusion. *Brit. J. Haematol*. 1997, 98, 216-218.
78. Breitkreuz T, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff H, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B.: Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and in situ DNA hybridization study. *Cancer Research*. 1993, 53, 4035-4040
79. Steilen H, Ketter R, Romanakis K, Zwergel T, Unteregger G, Bonkhoff H, Seitz G, Ziegler M, Zang KD, Wullich B.: DNA aneuploidy in prostatic adenocarcinoma: a frequent event as shown by fluorescence in situ DNA hybridization. *Hum Pathol*. 1994, 25., 1306-1313
80. Trka J, Zuna J, Hrusák O, Kalinová M, Muziková K, Lauschman H, Stary J.: Impact of TEL/AML1-positive patients on age distribution of childhood acute lymphoblastic leukemia in Czech Republic. *Leukemia*. 1998, 12., 996-1007.
81. 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.
82. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, Haddad E, Auclerc MF, Valensi F, Cayre YE, et al.: The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor ALLs express TEL-AML1 fusion transcripts. *Brit. J. Haematol*. 1997, 99, 101-106.

83. Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J, Richards S, Hall E, Harrison G: Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. *British Journal of Haematology*. 1997, 96, 601-610.
84. Nakao M, Yokota S, Horiike S, Taniwaki M, Kashima K, Sonoda Y, Koizumi S, Takaue Y, Matsushita T, Fujimoto T, et al.: Detection and quantification of TEL/AML1 fusion transcripts by polymerase chain reaction in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996, 10, 1463-1470.
85. Seeger K1, Viehmann S, Buchwald D, Harbott J, Schrappe M, Sary J, Henze G, Trka J: Treatment response and residual-disease monitoring in initial and relapsed TEL-AML1 positive childhood ALL. *Leukemia*. 2001, 15, 208-282.
86. Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui CH, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky D, Dahl GB: Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1985, 65, 1079-1086.
87. Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM: Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia at diagnosis. *Brit. Med. J*, 1978, 2, 1529-1530.
88. Secker-Walker LM, Swansbury GJ, Hardisty RM, Sallan SE, Garson OM, Sakurai M, Lawler SD: Cytogenetics of acute lymphoblastic leukaemia in children as a factor in the prediction of long-term survival. *Brit. J. Haematol*. 1982, 52, 389-399.
89. Swansbury GJ, Secker-Walker LM, Lawler SD, Hardisty RM, Sallan SE, Garson OM, Sakurai M: Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukaemia of childhood: an independent prognostic factor. *Lancet*, 1981, 2, 249-250.
90. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera G, Dahl GV: Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1982, 60, 864-871.
91. Paulsson K, Johansson B: High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009, 48, 637-660.
92. Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LA, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM, Williams DL: Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1989, 73, 1963-1967.
93. Raimondi SC, Pui CH, Hancock ML, Behm FG, Filatov L, Rivera GK.: Heterogeneity of hyperdiploid (51 - 67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1996, 10, 213-224.
94. Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK.: Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 1992, 79, 3245-3252.
95. Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, Hutchinson RJ, Lange BJ, Nachman JB, Reaman GH, Sather HN, Steinherz PG, Trigg ME, et al.: Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1997, 80, 1717-1726.
96. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, et al.: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013 *Blood*. 2013, 122, 872-884
97. Jabbour E, Kantarjian H: Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014, 89, 548-556.
98. Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, Rossi L, Borgstrom GH, Tallman JK, Andersson L, de la Chapelle A: A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood*. 1984, 64, 1116-1122.
99. Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, de Groot-Swings G, Kluin-Nelemans JC, Beverstock GC, Fibbe WE, Kluin PM: Combined immunophenotyping and DNA in situ hybridization to study lineage involvement in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1992, 79, 1823-1828.
100. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W: Rapid immunophenotypic characterization of chromosomally aberrant cells by the new FICTION method. *Cytogenet Cell Genet*. 1993, 63, 123-125.
101. Weber-Matthiesen K, Muller-Hermelink A, Deerberg J, Scherthan H, Schlegelberger B, Grote W: Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem*. 1993, 41, 1641-1644.
102. Zhang Y, Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Rohde K, Winkemann M, Haferlach T, Gassmann W, Ludwig WD, Grote W, Loffler H, et al.: Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. *Br J Haematol*. 1996, 92, 673-680.
103. Callet-Bauchu E, Renard N, Gazzo S, Poncet C, Morel D, Pages J, Salles G, Coeur P, Felman P: Distribution of the cytogenetic abnormality $\text{t}(11;17)(\text{p13};\text{q10})$ in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a FICTION study in three cases. *Br J Haematol*. 1997, 99, 531-536.

104. Rack KA, Salomon-Nguyen F, Radford-Weiss I, Gil MO, Schmitt C, Belanger C, Nusbaum S, Vekemans M, Valensi F, Macintyre EA: FISH detection of chromosome 14q32/IgH translocations: evaluation in follicular lymphoma. *Br J Haematol.* 1998, 103, 495-504.
105. Martínez-Ramírez A, Cigudosa JC, Maestre L, Rodríguez-Perales S, Haralambieva E, Benítez J, Roncador G: Simultaneous detection of the immunophenotypic markers and genetic aberrations on routinely processed paraffin sections of lymphoma samples by means of the FICTION technique. *Leukemia.* 2004, 18, 348-353.
106. Méhes G, Luegmayr A, Kornmüller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF. Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immuno-fluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology. *Am J Pathol.* 2003, 163, 393-399.
107. Bielorai B, Golan H, Trakhtenbrot L, Reichart M, Toren A, Daniely M, Zilberstein Y, Amariglio N, Rechavi G, Kaplinsky C. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization in follow-up of minimal residual disease in a child with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002, 138, 64-68.
108. Jamil A, Theil KS, Kahwash S, Ruymann FB, Klopfenstein KJ: TEL/AML-1 fusion gene: its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000, 122, 73-78.
109. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneifné M, Alpár D, Pajor L: Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei. *Cytometry A.* 2006, 69, 506-514.
110. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med.* 1998, 339, 591-598.
111. Greaves M: Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman Lecture. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009, 3-12.

5.3.3. fejezet

1. Secker-Walker LM, Craig JM. Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: a review. *Leukemia*. 1993, 7, 147-151.
2. Borowitz MJ, Chan JKC: B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. p171. In.: WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Eds.: Swerdlow SH et al., Lyon. 2008
3. Melo V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1996, 10, 751-756.
4. Wardiman JW et al Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive. In.: WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Eds.: Swerdlow SH et al., Lyon. 2008. 32-37
5. Catovsky D: Ph⁺-positive acute leukaemia and chronic granulocytic leukaemia: one or two diseases? *Br J Haematol*. 1979, 42, 493-498.
6. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med*. 1997, 63, 125.
7. Abe R, Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S: The significance of cytogenetic findings of erythroid colonies derived from a Ph⁺ ALL patient: fundamental differences between Ph⁺ ALL and blastic phase CML. *Cancer Genet Cytogenet*. 1985, 18, 49-54.
8. Tachibana N, Raimondi SC, Lauer SJ, Sartain P, Dow LW: Evidence for a multipotential stem cell disease in some childhood Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1987, 70, 1458-1461.
9. Kitano K, Sato Y, Suda T, Miura Y: Difference of cell lineage expression of haematopoietic progenitor cells in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1988, 70, 21-26.
10. Secker-Walker LM, Cooke HMG, Browett PJ, Shippey CA, Norton JD, Coustan-Smith E, Hoffbrand AV: Variable Philadelphia breakpoints and potential lineage restriction of bcr rearrangement in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988, 72, 784-791.
11. Kalousek DK, Dubé ID, Eaves CJ, Eaves AC: Cytogenetic studies of haemopoietic colonies from patients with an initial diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1988, 70, 5-11.
12. Dow LW, Tachibana N, Raimondi SC, Lauer SJ, Witte ON, Clark SS. Comparative biochemical and cytogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome and other 22q11 variants. *Blood*. 1989, 73, 1291-1297.
13. Craig JM, Hawkins JM, Yamada T, Ganeshaguru K, Mehta AB, Secker-Walker LM: First intron and M-bcr breakpoints are restricted to the lymphoid lineage in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1990, 4, 678-681.
14. Anastasi J, Feng J, Dickstein JL, Le Beau MM, Rubin CM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW: Lineage involvement by BCR/ABL in Ph⁺ lymphoblastic leukemias: chronic myelogenous leukemia presenting in lymphoid blast phase vs Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1996, 10, 795-802.
15. Schenk TM, Keyhani A, Bottcher S, Kliche KO, Goodacre A, Guo JQ, Arlinghaus RB, Kantarjian HM, Andreeff M. Multilineage involvement of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 666-674.
16. Nacheva EP, Brazma D, Virgili A, Howard-Reeves J, Chanalaris A, Gancheva K, Apostolova M, Valgañón M, Mazzullo H, Grace C: Deletions of immunoglobulin heavy chain and T-cell receptor gene regions are uniquely associated with lymphoid blast transformation of chronic myeloid leukemia. *BMC Genomics*. 2010, 11, 41-51
17. Murphy S, Iland H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential Thrombocythaemia: An Interim Report From the Polycythaemia Vera Study Group. *Semin. Hematol*. 1986, 23, 177-182.
18. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J: Experience of the Polycythaemia Vera Study Group With Essential Thrombocythaemia: A Final Report on Diagnostic Criteria, Survival, and Leukemic Transition by Treatment. *Semin.Hematol*. 1997, 34, 29-39.
19. Stoll DB, Peterson P, Exten R, et al. Clinical Presentation and Natural History of Patients with Essential Thrombocythemia and the Philadelphia Chromosome. *Am. J. Hematol*. 1988, 27, 77-83.
20. Morris CM, Fitzgerald PH, Hollings PE, Archer SA, Rosman I, Beard ME, Heaton DC, Newhook CJ: Essential thrombocythaemia and the Philadelphia chromosome. *Brit. J. Haematol*. 1988, 70, 13-19.
21. Martiat P, Ifrah N, Rassool F, Morgan G, Giles F, Gow J, Goldman JM: Molecular analysis of Philadelphia positive essential thrombocythemia. *Leukemia* 1989, 3, 563-565.
22. LeBrun DP, Pinkerton PH, Sheridan B, Chen-Lai J, Dubé ID, P. A. Poldre. Essential Thrombocythemia with the Philadelphia Chromosome and BCR-ABL Gene Rearrangement. An Entity Distinct from Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome Negative Essential Thrombocythemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991, 54, 21-25.

23. Richards EM, Bloxham DM, Nacheva E, Marcus RE and Green AR. BCR rearrangement in apparent essential thrombocythemia. *Brit. J. Haematol.* 1993, 85, 625-626.
24. Blickstein D, Aviram A, Luboshitz J, Prokocimer M, Stark P, Bairey O, Sulkes J, Shaklai M: BCR-ABL BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocytopenia patients: clinical presentation. *Blood.* 1997, 90, 2768-2771.
25. Aviram A, Blickstein D, Stark P, Luboshitz J, Bairey O, Prokocimer M, Shaklai M: Significance of BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocythemia patients. *Leuk Lymphoma.* 1999; 33; 77-82.
26. Hsu HC, Tan LY, Au LC, Lee YM, Lieu CH, Tsai WH, You JY, Liu MD, Ho CK: Detection of bcr-abl gene expression at a low level in blood cells of some patients with essential thrombocythemia. *J Lab Clin Med.* 2004, 143, 125-129.
27. Heller P, Kornblihtt LI, Cuello MT, Larripa I, Najfeld V, Molinas FC.: BCR-ABL transcripts may be detected in essential thrombocythemia but lack clinical significance. *Blood.* 2001, 98, 1990.
28. Marasca R, Luppi M, Zucchini P, Longo G, Torelli G, Emilia G: Might essential thrombocythemia carry Ph anomaly? *Blood.* 1998, 91, 3084-3089.
29. Emilia G, Marasca R, Zucchini P, Temperani P, Luppi M, Torelli G, Lanza F, De Angelis C, Gandini D, Castoldi GL, et al.: BCR-ABL rearrangement is not detectable in essential thrombocythemia. *Blood,* 2001, 97, 2187-2189
30. Hackwell S, Ross F, Cullis JO.: Patients with essential thrombocythemia do not express BCR-ABL transcripts. *Blood,* 1999, 93, 2420-2421.
31. Lin FR, Wang Y, Chen J: Report of 8 cases of bcr-abl gene positive thrombocytosis and review of the literature. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2004, 25, 528-31.
32. Rajnai H, Bödő Cs, Reiniger L, Timár B, Csernus B, Szepesi A, Csomor J, Matolcsy A: Új lehetőség a krónikus myeloproliferatív betegségek diagnosztikájában - a JAK2 mutáció kimutatása. *Orvosi Hetilap,* 2006, 147, 2175-2179.
33. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Tefferi A, Gisslinger H: Essential thrombocythaemia. In.: WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. Eds.: Swerdlow SH et al., Lyon. 2008. 48-50
34. Qin YW, Yang YN, Li S, Wang C: Coexistence of JAK2V617F Mutation and BCR-ABL Translocation in a Pregnant Woman with Essential Thrombocythemia. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2014, 30 (Suppl 1), 331-334.
35. 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.
36. 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.
37. Propp S, Lizzi FA: Philadelphia chromosome in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1970, 36, 353.
38. Pajor L, Matolcsy A, Vass JA, Méhes G, Marton E, Szabó F, Iványi JL: Phenotypic and genotypic analyses of blastic cell population suggest that pure B-lymphoblastic leukemia may arise from myelodysplastic syndrome. *Leukaemia Research.* 1998, 22, 13-17.
39. Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU, Koller CA, Walters R, Trujillo JM, Talpaz M: Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1987, 67, 55-59.
40. Chan LC, Karhi KK, Rayter SI, Heisterkamp N, Eridani S, Powles R, Lawler SD, Groffen J, Foulkes JG, Greaves MF: A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 1987, 325, 635-637.
41. De Klein A, Hagemeijer A, Bartram CR, Houwen R, Hoefsloot L, Carbonell F, Chen L, Barnett M, Greaves M, Kleihauer E, et al.: Bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1986, 68, 1369-1375
42. Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU, Koller CA, Walters R, Trujillo JM, Talpas M: Molecular analysis of chromosome breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 1987, 67, 55-59.
43. Berger R, Chen SJ, Chen Z: Philadelphia-positive acute leukemia. Cytogenetic and molecular aspects. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990, 44, 143-152.
44. Lin MT, Tien HF, Wang YC, Lin DT, Lin KH: Bcr rearrangements in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. A study of five Chinese patients in Taiwan. *Cancer Genet Cytogenet* 1990, 47, 29-39.

45. Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV: Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* 1991, 5, 196-199.
46. Chanalaris A, Brazma D, Rai L, Chanalaris A, Howard J, Valgañón M, Grace C, Foroni L, Nacheva EP: Genome Profile of Ph Positive ALL in Adult Patients. 13th Congress of the European Hematology Association. *Haematologica*. 2008. 93 (S1), 194, abs. 0478.
47. Grisouard J, Ojeda-Urbe M, Looser R, Hao-Shen H, Lundberg P, Duek A, Jeandidier E, Karow A, Skoda RC.: Complex subclonal structure that responds differentially to therapy in a patient with essential thrombocythemia and chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2013, 122, 3694-3696.
48. Nacheva EP, Grace CD, Brazma D, Gancheva K, Howard-Reeves J, Rai L, Gale RE, Linch DC, Hills RK, Russell N, et al.: Does BCR/ABL1 positive acute myeloid leukaemia exist? *British Journal of Haematology*, 2013, 161, 541-550
49. Nimer SD: Essential thrombocythemia: another "heterogeneous disease" better understood? *Blood*. 1999, 93, 415-416.
50. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC: A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood*. 1999, 93, 417-424.
51. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, Choritz H, Döhler U, Kaloutsi V, Werner M: Chronic Myeloproliferative Disorders in Bone Marrow Biopsies. *Path. Res. Pract.* 1990. 186. 3-27.
52. Cervantes F, Colomer D, Vives-Corrons JL, Rozman C, Montserrat E: Chronic myeloid leukemia of thrombocythemic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features? *Leukemia*. 1996, 10, 1241-1243.
53. Blickstein D, Aviram A, Luboshitz J, Prokocimer M, Stark P, Bairey O, Sulkes J, Shaklai M: Response. *Blood*. 1998, 91, 3084-3085.
54. Melo JV: The diversity of BCR-ABL Fusion Proteins and Their Relationship to Leukemia Phenotype. *Blood*. 1996, 88, 2375-2384.
55. Pajor L, Honeyman T: 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.
56. Méhes G, Kálmán E, Pajor L: Fluorescent visualization of nucleolar organizer region associated proteins in situ by the use of a thiol reagent. *J Histochem Cytochem*. 1993, 41, 1413-1417.
57. Michiels JJ, Pich A, De Raeve H, Gadisseur A: Essential Differences in Clinical and Bone Marrow Features in BCR/ABL-Positive Thrombocythemia Compared to Thrombocythemia in the BCR/ABL-Negative Myeloproliferative Neoplasms Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Acta Haematol*. 2014, 133, 52-55.
58. 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
59. Burkhardt R, Jaeger K, Kettner G, Helmer G: Chronic myeloproliferative disorders: prognostic importance of new working classification. *J. Clin. Pathol*. 1990, 43, 357-364.
60. Hummel JM, Kletecka MC, Sanks JK, Chiselite MD, Roulston D, Smith LB, Czuchlewski DR, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS: Concomitant BCR-ABL1 Translocation and JAK2V617F Mutation in Three patients with Myeloproliferative Neoplasms *Diagn Mol Pathol*. 2012, 21, 176-183.
61. Nowell PC, Hungerford, DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960, 132, 1497.
62. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T: Chronic myelocytic leukemia: Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med*. 1977, 63, 125.
63. Canaani E, Steiner-Saltz D, Aghai E, Gale RP, Berrebi A, Januszewicz E: Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*. 1984, 17, 593-595.
64. Collins SJ, Kubonishi I, Miyoshi I, Groudine MT: Altered transcription of the c-abl oncogene in K-562 and other chronic myelogenous leukemia cells. *Science*. 1984, 225, 72-74.
65. Keating A: Investigation of bcr-abl transcription by Ph-positive chronic myeloid leukemia progenitors. *Stem Cells*. 1993, 11, 31-33. (suppl 3).
66. Bedi A, Zehnbauser BA, Collector MI, Barber JP, Zicha MS, Sharkis SJ, Jones RJ: BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1993, 81, 2898-2902.
67. Keating A, Wang X-H, Laraya P: Variable transcription of BCR-ABL by Ph⁺ cells arising from hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994, 83, 1744-1749.
68. Verfaillie CM, Bhatia R, Miller W, Mortari F, Roy V, Burger S, McCullough J, Stieglbauer K, Dewald G, Heimfeld S, et al.: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantaion can be

- selected from the marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*. 1996, 87, 4770-4779.
69. Zhang JG, Lin F, Chase A, Goldman JM, Cross NCP: Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996, 87, 2588-2593.
 70. Brizard F, Chomel JC, Veinstein A, Rivet J, Giraud C, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A: Does BCR-ABL genomic rearrangement persist in CML patients in complete remission after interferon α therapy? *Leukemia*. 1998, 12, 1076-1080.
 71. Nitta M, Tsuboi K, Yamashita S, Kato M, Hayami Y, Harada S, Komatsu H, Iida S, Banno S, Wakita A, et al.: Multiple myeloma preceding the development of chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol*. 1999, 69, 170-173.
 72. Esteve J, Cervantes F, Rives S, Rozman M, Zarco MA, Montserrat E: Simultaneous occurrence of B-cell chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia with further evolution to lymphoid blast crisis. *Haematologica*. 1997, 82, 596-599.
 73. Maher VE, Gill L, Townes PL, Wallace JE, Savas L, Woda BA, Ansell JE: Simultaneous Chronic Lymphocytic Leukemia and Chronic Myelogenous Leukemia. Evidence of a Separate Stem Cell Origin. *Cancer*. 1993, 71, 1993-1997.
 74. Akashi K, Harada M, Shibuya T, Fukagawa K, Kimura N, Sagawa K, Yoshikai Y, Teshima T, Kikuchi M and Niho Y. Simultaneous Occurrence of Myelomonocytic Leukemia and Multiple Myeloma: Involvement of Common Leukemic Progenitors and Their Developmental Abnormality of „Lineage Infidelity”. *J Cell Physiol* 1991; 148: 446-56.
 75. Klenn PJ, Hyun BH, Lee YH, Zheng W-Y. Multiple Myeloma and Chronic Myelogenous Leukemia. A case report with a literature review. *Yonsei Med J*. 1993, 34, 293-300.
 76. Gargallo P, Cacchione R, Chena C, Dupont J, Garay G, Riveros D, Larripa I, Slavutsky I.: Chronic lymphocytic leukemia developing in a patient with chronic myeloid leukemia: evidence of distinct lineage-associated genomic events. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005, 161, 74-77
 77. Bitter MA: Hairy-cell leukemia. Knowles DM ed. In: *Neoplastic Hematopathology*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 1992. 1209-1234.
 78. Jacobs RH, Vokes EE, Golomb HM: Second Malignancies in Hairy Cell Leukemia. *Cancer*. 1985, 56, 1462-1467.
 79. Kampmeier P, Spielberger R, Dickstein J, Mick R, Golomb H, Vardiman JW: Increased incidence of second neoplasms in patients treated with interferon alpha 2b for hairy cell leukemia: a clinicopathologic assessment. *Blood*. 1994, 83, 2931-2938.
 80. Hisada M1, Chen BE, Jaffe ES, Travis LB: Second cancer incidence and cause-specific mortality among 3104 patients with hairy cell leukemia: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99, 215-222
 81. Reeves JE, Robbins BA, Pankey LR, Elias AL, Anderson WF: The simultaneous occurrence of variant hairy cell leukemia and chronic-phase chronic myelogenous leukemia. A case report. *Cancer*. 1995, 75, 2089-2092.
 82. Wandroo FA, Bareford D, El-Jehani F. Chronic myeloid leukaemia occurring in a patient with hairy cell leukaemia. *J Clin Pathol*. 2000, 53, 940-941.
 83. Orciuolo E, Fazzi R, Galimberti S, Testi C, Azzara' A, Carulli G, Petrini M.: Chronic myeloid leukaemia and hairy cell leukaemia co-existing in a single patient: Difficulties at diagnosis and rational of the therapeutic strategy *Leukemia Research* 2006, 30, 349-335.
 84. Burkhardt R, Jaeger K, Kettner G, Helmer G: Chronic myeloproliferative disorders: prognostic importance of new working classification. *J Clin Pathol*. 1990, 43, 357-364.
 85. Zhou XG, Sandvej K, Gregersen N, Hamilton-Dutoit SJ: Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1999, 52, 104-110.
 86. Iijima T, Inadome Y, Noguchi M: Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal centers of human reactive lymph nodes: possibility of overdiagnosis of B cell clonal proliferation. *Diagn. Mol. Pathol*. 2000; 9(3): 132-136.
 87. Taylor JME, Spagnolo DV, Kay PH: B-cell target DNA quantity is a critical factor in the interpretation of B-cell clonality by PCR. *Pathology*. 1997, 29, 309-312
 88. Raskind, WH, Steinmann L, Najfeld V: Clonal development of myeloproliferative disorders: clues to hematopoietic differentiation and multistep pathogenesis of cancer. *Leukemia*. 1998, 12, 108-16
 89. 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.
 90. 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.
91. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, van Rhee F, Shepherd PCA, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NCP: Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients who achieve complete cytogenetic remission with interferon- α . *Br J Haematol.* 1995, 91, 126-131.
 92. Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, Briancon G, Tounilhac O, Kwiatkowski F, Philippe P, Choufi B, Deméocq F, Travade Ph, et al.: Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukaemia during interferon- α therapy. *Br J Haematol.* 1998, 101, 552-557.
 93. Lion T, Gaiger A, Henn T, Hörth E, Haas OA, Geissler K, Gadner H: Use of quantitative polymerase chain reaction to monitor residual disease in chronic myelogenous leukemia during treatment with interferon. *Leukemia.* 1995, 9, 1353-1360.
 94. Páldi-Haris P, Földi J.: Commentary to T Lion: „Appropriate controls for RT-PCR”. *Leukemia* 1997, 11, 879-880.
 95. Trask B, Pinkel D, van den Engh G: The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. *Genomics.* 1989. 5. 710-717.
 96. Paquette RL, Nicoll J, Chalukya M, Gondek L, Jasek M, Sawyers CL, Shah NP, Maciejewski J.: Clonal hemopoiesis in Philadelphia chromosome-negative bone marrow cells of chronic myeloid leukemia patients receiving dasatinib. *Leukemia Res.* 2010, 34, 708-713.
 97. Kajtár B, Méhes G, Jáksó P, Kereskai L, Iványi JL, Losonczy H, Egyed M, Tóth P, Tóth A, Gasztonyi Z, et al.: A krónikus myeloid leukaemia citogenetikai és molekuláris monitorozása *Orvosi Hetilap.* 2006, 147, 963-970.
 98. Raskind WH, Ferraris AM, Najfeld V, Jacobson RJ, Moohr JW, Fialkow PJ: Further evidence for the existence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia.* 1993. 7, 1163-116.
 99. Misawa M, Maeda H, Hara H, Yamamoto Yoshihiro, Furuyama JI: Absence of bcr/abl gene in single hemopoietic progenitors in some patients with chronic myelogenous leukemia. *Stem Cells.* 1993, 11, 536-542.
 100. van Kooten Niekerk PB, Petersen CC, Nyvold CG, Ommen HB, Roug AS, Nederby L, Hokland P, Kjeldsen E: Cell sorting enables interphase fluorescence in situ hybridization detection of low BCR-ABL1 producing stem cells in chronic myeloid leukaemia patients beyond deep molecular remission. *British J Haematol*, 2014, 164, 53-60.
 101. Jabbour E, Kantarjian H: Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol.* 2014, 89, 548-556.
 102. Maguer-Satta V, Petzer AL, Eaves AC, Eaves CJ: BCR-ABL expression in different subpopulations of functionally characterized Ph⁺ CD34⁺ cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1996, 88, 1796-1804.
 103. Stój A, Rudzki Z, Piniewska D, Sacha T, Czekalska S, Okoń K, Stachura J: Clonal lymphocytic populations in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders: is the T-cell clonality of 'undetermined' significance (TCUS) linked to a worse clinical outcome? *Leuk Lymphoma.* 2006, 47, 2351-2358.
 104. Navona R, Valpreda M, Pich A: Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. *Acta Haematol.* 1985, 74, 19-22.
 105. Schmid C, Isaacson PG. Bone marrow trephine biopsy in lymphoproliferative disease. *J Clin Pathol.* 1992, 45, 745-750.
 106. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, Chroitz H, Döhler U, Kaloutsi V, Werner M: Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Path. Res. Pract.* 1990; 186: 3-27.
 107. Bagg A, Brazier RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY: Immunoglobulin Heavy Chain Gene Analysis in Lymphomas. A Multi-Center Study Demonstrating the Heterogeneity of Performance of Polymerase Chain Reaction Assays. *J Mol Diagn.* 2002, 4, 81-9
 108. Elenitoba-Johnson KSJ, Bohling SD, Mitchell RS, Brown MS, Robetorye RS: PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn.* 2000, 2, 92-6
 109. Torlakovic E, Cherwitz DL, Jessuriun J, Scholes J, McGlennen R: B-cell gene rearrangement in benign and malignant lymphoid proliferations of mucosa-associated lymphoid tissue and lymph nodes. *Hum Pathol.* 1997, 28, 166-173
 110. Méhes G, Kovács G, Kajtár B, Lacza A, Várnai A, Losonczy H, Pajor L: Karyotype complexity and VH gene status in B-cell chronic lymphocytic leukemia *Haematologica.* 2006, 91, 283-284.

111. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri Swerdlow SH: Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH et al (Eds.), WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon. 2008. 158-166.
112. Takahashi N, Miura I, Saitoh K, Miura AB: Lineage involvement of stem cells bearing the philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 1998, 12, 4758-4763
113. Fekete S: A krónikus myeloproliferatív szindrómákról. *Magyar Belorvosi Archívum*. 1996, 5, 251-256.
114. Jakó J: A myeloproliferatív betegségek epidemiológiája. *Magyar Belorvosi Archívum*. 1996, 5, 271-273.
115. Panel Discussion, Orlando: CML: current standards and emerging issues. Panel discussion at the American Society of Hematology Annual Meeting, Orlando, 1996.
116. Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960, 132, 1497.
117. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M: Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983, 306, 277-283.
118. Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, Collins SJ, Witte ON: Cell lines and clinical isolates derived from Ph¹-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985, 82, 1810-1814.
119. Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O, Berrebi A, Zaizov R, Kubonishi I, Miyoshi I, Canaani E: bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Blood*. 1987, 69, 971-973.
120. McClure JS, Litz CE: Chronic myelogenous leukemia: molecular diagnostic considerations. *Human Pathol*. 1994, 25, 594-597.
121. Vass JA., Kereskai L, Pajor L: Krónikus myeloid leukaemia komplex molekuláris monitorizálása Orvosi Hetilap 2000, 141, 2279-2285.
122. Canaani E, Gale RP, Steiner-Saltz D, Berrebi A, Aghai E, Januszewicz E.: Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 1984, 17, 593-595.
123. Collins SJ, Kubonishi I, Miyoshi I, Groudine MT.: Altered transcription of the c-abl oncogene in K-562 and other chronic myelogenous leukemia cells. *Science*. 1984, 225, 72-74.
124. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC: Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients who achieve complete cytogenetic remission with interferon- α . *Brit. J. Haematol*. 1995, 91, 126-131.
125. Lion T, Gaiger A, Henn T, Hörth E, Haas OA, Geissler K, Gadner H: Use of quantitative polymerase chain reaction to monitor residual disease in chronic myelogenous leukemia during treatment with interferon. *Leukemia*. 1995, 9, 1353-1360.
126. Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, Briancón G, Tournilhac O, Kwiatkowski F, Philippe P, Choufi B, Deméocq F, Travade P, et al.: Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukaemia during interferon- α therapy. *Brit. J. Haematol.*, 1998, 101, 552-557.
127. Reiter A, Marley SB, Hochhaus A, Sohal J, Raanani P, Hehlmann R, Gordon MY, Goldman JM, Cross NC.: BCR-ABL-positive progenitors in chronic myeloid leukaemia patients in complete cytogenetic remission after treatment with interferon-alpha. *Brit. J. Haematol.*, 1998, 102, 1271-1278.
128. Bedi A, Zehnbauser BA, Collector MI, Barber JP, Zicha MS, Sharkis SJ, Jones RJ: BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 1993, 81, 2898-2902.
129. Brizard F, Chomel JC, Veinstein A, Rivet J, Giraud C, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A.: Does BCR-ABL genomic rearrangement persist in CML patients in complete remission after interferon α therapy? *Leukemia*. 1998, 12, 1076-1080.
130. Keating A, Wang XH, Laraya P: Variable transcription of BCR-ABL by Ph⁺ cells arising from hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994, 83, 1744-1749.
131. 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*. 118:14-19 2000
132. Verfaillie CM, Bhatia R, Miller W, Mortari F, Roy V, Burger S, McCullough J, Stieglbauer K, Dewald G, Heimfeld S: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from the marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*. 1996, 87, 4770-4779.
133. Zhang JG, Lin F, Chase A, Goldman JM, Cross NC: Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996, 87, 2588-2593.

134. 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
135. Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM, Estrov Z: Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood*. 1999, 93, 2755-2759
136. Hochhaus A, Weisser A, La Rosée P, Emig M, Müller MC, Saussele S, Reiter A, Kuhn C, Berger U, Hehlmann R, et al.: Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2000, 14, 998-1005
137. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneifné M, 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.
138. Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M: Chronic myelogenous leukemia: A concise update. *Blood*. 1993, 82, 691-703
139. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher MR, Ganser A, Lichter P, Döhner H: Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukaemia by in situ hybridization. *Blood*. 1994, 83, 1922-1928
140. Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Pajor L, Oláh É: Biclinal chromosomal aberrations in a child with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogen*. 1999, 108, 13-18
141. 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
142. Cuneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Scapoli G, Castoldi G, et al.: Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia*. 1998, 12, 1718-1723
143. Tchirkov A, Giollant M, Tavernier F, Briancon G, Tounilhac O, Kwiatkowski F, Philippe P, Choufi B, Deméocq F, Travade P, et al.: Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukaemia during interferon- α therapy. *Brit J Haematol*. 1998, 101, 552-557
144. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, Thibodeau SN, Jalal SM: The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbc/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogen*. 1993, 71, 7-14
145. Garcia-Isidoro M, Tabernero MD, Garcia JL, Najera ML, Hernandez JM, Wiegant J, Raap A, San Miguel J, Orfao A: Detection of the Mbc/abl translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization: Comparison with conventional cytogenetics and implication for minimal residual disease detection. *Hum Pathol*. 1997, 28, 154-159
146. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Mason P J, van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, et al.: Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on Interferon- α therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*. 1996, 87, 1549-1555
147. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M, Terasaki H, Naoe T, Ohnishi K, Ohno R: Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia*. 1999, 13, 542-552
148. Mühlmann J, Thaler J, Hilbe W, Bechter O, Erdel M, Utermann G, Duba HC: Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during Interferon treatment : A new strategy for remission assessment. *Gene Chromosome Cancer*. 1998, 21, 90-100
149. Issaad C, Ahmed M, Novault S, Bonnet ML, Bennardo T, Varet B, Vainchenker W, Turhan AG: Biological effects induced by variable levels of BCR-ABL protein in the pluripotent hematopoietic cell line UT-7. *Leukemia*. 2000, 14, 662-670
150. Moore S, Haylock DN, Levesque JP, McDiarmid LA, Samels LM, To LB, Simmons PJ, Hughe TP: Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells. *Blood*. 1998, 92, 2461-2470
151. Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Lin F, Reicher A, Saussele S, Shepherd PCA, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, et al.: Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon- α -therapy of chronic myelogenous leukemia: levels of minimal residual disease predict risk of relapse. *Blood*. 1996, 88 (suppl. 1), 664a. (abstr. No 2644).

152. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, van Rhee F, Shepherd PCA, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NCP: Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients who achieve complete cytogenetic remission with interferon- α . *Brit J Haematol.* 1995, 91, 126-131
153. Lion T, Gaiger A, Henn T, Hörth E, Haas OA, Geissler K, Gadner H: Use of quantitative polymerase chain reaction to monitor residual disease in chronic myelogenous leukemia during treatment with interferon. *Leukemia.* 1995, 9, 1353-1360
154. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brian S, Beran M, Pierce S, Talpaz M: Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to Interferon- α therapy. *Ann Intern Med.* 1995, 122, 254-261
155. Bedi A, Zehnbauser BA, Collector MI, Barber JP, Zicha MS, Sharkis SJ, Jones RJ: BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1993, 81, 2898-2902.
156. Brizard F, Chomel JC, Veinstein A, Rivet J, Giraud C, Kitzis A, Guilhot F, Brizard A: Does BCR-ABL genomic rearrangement persist in CML patients in complete remission after interferon α therapy? *Leukemia.* 1998, 12, 1076-1080
157. Keating A, Xing-Hua Wang XH, Laraya P: Variable transcription of BCR-ABL by Ph⁺ cells arising from hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994, 83, 1744-1749
158. 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 Cytogen.* 2000, 118, 14-19
159. Verfaillie CM, Bhatia R, Miller W, Mortari F, Roy V, Burger S, McCullough J, Stieglbauer K, Dewald G, Heimfeld S, et al.: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from the marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood.* 1996, 87, 4770-4779
160. Zhang JG, Lin F, Chase A, Goldman JM, Cross NCP: Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1996, 87, 2588-2593.

5.3.4. fejezet

1. Barry TS, Jaffe ES, Sorbara L, Raffeld M, Pittaluga S. Peripheral T-Cell Lymphomas Expressing CD30 and CD15. *Am J Surg Pathol.* 2003, 27, 1513-1522
2. Müschen M, Rajewsky K, Bräuninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML, Küppers R: Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med.* 2000, 191, 387-394.
3. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H: Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cell of classic Hodgkin disease. *Blood.* 2000, 95, 3020-3024.
4. Quintanilla-Martinez L, Fend F, Moguel LR, Spilove L, Beaty MW, Kingma DW, Raffeld M, Jaffe ES: Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection. *Am J Surg Pathol.* 1999, 23, 1233-1240.
5. Ho JW, Ho FC, Chan AC, Liang RH, Srivastava G.: Frequent Detection of Epstein-Barr virus-infected B-cells in peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol.* 1998, 185, 79-85.
6. Niedobitek G, Baumann I, Brabletz T, Lisner R, Winkelmann C, Helm G, Kirchner T.: Hodgkin's disease and peripheral T-cell lymphoma: composite lymphoma with evidence of Epstein-Barr virus infection. *J Pathol.* 2000, 191, 394-399
7. Zettl A, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, Ott M, Müller-Hermelink HK, Ott G.: Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Clin Pathol.* 2002, 117, 368-379
8. Higgins JP, van de Rijn M, Jones CD, Zehnder JL, Warnke RA.: Peripheral T-cell lymphoma complicated by a proliferation of large B cells. *American Journal of Clinical Pathology* 2000, 114, 236-247.
9. Reichard KK, Schwartz EJ, Higgins JP, Narasimhan B, Warnke RA, Natkunam Y: CD10 expression in peripheral T-cell lymphoma complicating by proliferation of large B-cells. *Mod Pathol.* 2006, 19, 337-343.
10. Aneja A, LevakaVeera R, Patel V, Bains A: Aggressive Subcutaneous Panniculitis-Like CD30+ Peripheral T-Cell Lymphoma with Diffuse EBER Expression," *Case Reports in Hematology*, 2014, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/874725
11. 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.
12. 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.
13. Rüdiger T, Ott G, Ott MM, Müller-Deubert SM, Müller-Hermelink HK: Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paraganuloma by paraffin immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 1998, 22, 1184-1191.
14. Ohshima K1, Kikuchi M, Yoshida T, Masuda Y, Kimura N: Lymph nodes in incipient adult T-cell leukemia-lymphoma with Hodgkin's disease-like histologic features. *Cancer.* 1991, 67, 1622-1628.
15. Momose H, Jaffe ES, Shin SS, Chen YY, Weiss LM: Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with Reed-Sternberg-like cells and possible transformation to Hodgkin's disease. Mediation by Epstein-Barr virus. *Am J Surg Pathol.* 1992, 16, 859-867.
16. Shin SS, Ben-Ezra J, Burke JS, Sheibani K, Rappaport H: Reed-Sternberg-like cells in low-grade lymphomas are transformed neoplastic cells of B-cell lineage. *Am J Clin Pathol.* 1993, 99, 658-662
17. Khan G, Norton AJ, Slavin G: Epstein-Barr virus in Reed-Sternberg-like cells in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol.* 1993, 169, 9-14.
18. Ohno T, Smir BN, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Hinrichs SD, Chan WC: Origin of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells in chronic lymphocytic leukemia with "Hodgkin's transformation". *Blood.* 1998; 91: 1757-1761.
19. Kanzler H, Küppers R, Helmes S, Wacker HH, Chott A, Hansmann ML, Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood.* 2000, 95, 1023-1031.
20. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Küppers R: Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev.* 1998, 162, 261-280.
21. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, et al.: Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000, 95, 1443-1450.

22. Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth T, Demel G, Falini B: Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*. 2001, 97, 496-501
23. Re D, Müschen M, Ahmadi T, Wickenhauser C, Staratschek-Jox A, Holtick U, Diehl V, Wolf J.: Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*. 2001, 61, 2080-2084.
24. Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, Leithäuser F, Möller P, Stein H, Wirth T: Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood*. 2004, 104, 3326-3334
25. Laumen H, Nielsen PJ, Wirth: The BOB.1/OBF.1 coactivator is essential for octamer-dependent transcription in B cells. *Eur J Immunol*. 2000, 30, 458-469.
26. Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, Franceschi S, Capello D, Drexler HG, Falini B, Dalla-Favera R: Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood*. 1998, 92, 2220-2228.
27. Bräuninger A, Wacker HH, Rajewsky K, Küppers R, Hansmann ML: Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Research* 2003; 63: 1644-1651.
28. Zettl AI, Lee SS, Rüdiger T, Starostik P, Marino M, Kirchner T, Ott M, Müller-Hermelink HK, Ott G: Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Clin Pathol*. 2002, 117, 368-379.
29. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens-Leder K, Foss HD, Jundt F, Wirth T, Dörken B, Stein H: Differential E μ enhancer activity and expression of BOB.1 / OBF.1, Oct.2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol*. 2004, 202, 60-69.
30. Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Tiemann M, Dallenbach F, Parwaresch MR, Stein H: Frequent latent Epstein-Barr virus infection of neoplastic T cells and bystander B cells in human immunodeficiency virus-negative European peripheral pleomorphic T-cell lymphomas. *Blood*. 1993, 82, 217-223.
31. Ohshima K, Takeo H, Kikuchi M, Kozuru M, Uike N, Masuda Y, Yoneda S, Takeshita M, Shibata T, Akamatsu M: Heterogeneity of Epstein-Barr virus infection in angioimmunoblastic lymphadenopathy type T-cell lymphoma. *Histopath*. 1994, 25, 569-579.
32. Thorley-Lawson DA, Gross A: Persistence of the Epstein-Barr Virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med*. 2004, 350, 1328-1337.
33. Klein, E: Non-proliferative Interactions of Epstein-Barr Virus and Human B Lymphocytes *Folia Biologica (Praha)*. 2004, 50, 131-135.
34. Chen HS, Lu F, Lieberman PM: Epigenetic regulation of EBV and KSHV latency *Current Opinion in Virology*. 2013, 3, 251 – 259
35. Amon W, Farrell PJ: Reactivation of Epstein-Barr virus from latency *Reviews in Medical Virology*. 2005, 15, 149-156.
36. Suwiwat S, Pradutkanchana J, Ishida T, Mitarnun W.: Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in the plasma of patients with peripheral T-cell and NK-cell lymphomas and peripheral T-cell proliferative diseases. *Journal of Clinical Virology* 2007, 40, 277-283.
37. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, Wlodarska I, Schrager JA, Raffeld M, Hills RK, Jaffe ES.: Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma: *Blood*. 2011, 117, 4726-4735
38. Spieker T, Kurth J, Küppers R, Rajewsky K, Bräuninger A, Hansmann ML: Molecular single-cell analysis of the clonal relationship of small Epstein-Barr virus-infected cells and Epstein Barr virus-harboring Hodgkin and Reed / Sternberg cells in Hodgkin disease. *Blood*. 2000, 96, 3133-3138.
39. Dogan A, Gaulard P, Jaffe ES, Müller-Hermelink HK: Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. p309-311. In.: *WHO Classification of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues*. Eds.: Swerdlow SH et al., 2008, Lyon
40. Niedobitek G, Baumann I, Brabletz T, Lisner R, Winkelmann C, Helm G, Kirchner T: Hodgkin's disease and peripheral T-cell lymphoma: composite lymphoma with evidence of Epstein-Barr virus infection. *J Pathol* 2000; 191: 394-39910.
41. Wang E, Papavassiliou P, Wang AR, Louissaint A, Wang J, Hutchinson CB, Huang Q, Reddi D, Wei Q, Sebastian S, et al.: Composite lymphoid neoplasm of B-cell and T-cell origins: A pathologic study of 14 cases *Human Pathology*. 2014, 45, 768 – 784.
42. Atayar C, Poppema S, Blokzijl T, Harms G, Boot M, van den Berg A.: Expression of the T-cell Transcription Factors, GATA-3 and T-bet, in the Neoplastic Cells of Hodgkin Lymphomas. *Am J Pathol*. 2005, 166, 127-134.

43. McCune RC, Syrbu SI, Vasef MA.: Expression profiling of transcription factors Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1, and PU.1 in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: a comparative study using high throughput tissue microarrays. *Mod Pathol.* 2006, 19, 1010-1018.

5.3.5. fejezet

1. Hastings RJ, Cavani S, Bricarelli FD, Patsalis PC, Kristoffersson U; ECA PWG Co-ordinators: Cytogenetic guidelines and quality assurance: A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *Eur J Hum Genet.* 2007, 15, 525–527.
2. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, Rao KW, Rao PN: Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn.* 2007, 9, 134–143.
3. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez NC, Liebisch P, O'Connor S, Dalva K, Fabris S, Testi AM, Jarosova M, et al.: Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2012, 97, 1272–1277.
4. American College of Medical Genetics. Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm. [accessed 11 April 2012]
5. Dewald G, Stallard R, A Saadi A, Arnold S, Bader PI, Blough R, Chen K, Elejalde BR, Harris CJ, Higgins RR, et al.: A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y- chromosome probes. *Am J Med Genet.* 1998, 76, 318–326.
6. Kibbelaar RE, Kok F, Dreef EJ, Kleiverda JK, Cornelisse CJ, Raap AK, Kluin PM: Statistical methods in interphase cytogenetics: An experimental approach. *Cytometry.* 1993, 14, 716–724.
7. Carothers AD: Counting, measuring, and mapping in FISH-labelled cells: Sample size considerations and implications for automation. *Cytometry.* 1994, 16, 298–304.
8. Castleman KR, White BS. Dot count proportion estimation in FISH specimens. *Bioimaging* 1995, 3, 88–93.
9. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R: FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006, 8, 141–151.
10. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, Ketterling RP, Thorland EC, Shearer BM, Fink SR, Stockero KJ, Majorowicz JR, Dewald GW: Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006, 8, 16–23.
11. Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgar-Mörschel M, Weitz S, Bentz M, Lichter P: High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. *Blood.* 1993, 81, 2118–2124.
12. Chase A, Grand F, Zhang JG, Blackett N, Goldman J, Gordon M: Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997, 18, 246–253.
13. Vrolijk H, Sloos WCR, van de Rijke FM, Mesker WE, Netten H, Young IT, Raap AK, Tanke HJ: Automation of spot counting in interphase cytogenetics using brightfield microscopy. *Cytometry.* 1996, 24, 158–166.
14. Moore DH, Epstein L, Reeder J, Wheelless L, Waldman FM: Interlaboratory variability in fluorescence in situ hybridization analysis. The NCI Bladder Tumor Marker Network. *Cytometry.* 1996, 25, 125–132.
15. Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S: Fluorescence in situ hybridization: A highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001, 131, 125–134.
16. Kowalczyk JR, Gaworczyk A, Winnicka D, Lejman M, Babicz M: Fluorescence in situ hybridization BCR/ABL fusion signal rate in interphase nuclei of healthy volunteer donors: A test study for establishing false positive rate. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003, 142, 51–55.
17. Adiga PS, Chaudhuri BB: Segmentation and counting of FISH signals in confocal microscopy images. *Micron.* 2000, 3, 5–15.
18. Baumgartner A, Schmid TE, Maerz HK, Adler ID, Tarnok A, Nuesse M: Automated evaluation of frequencies of aneuploid sperm by laser-scanning cytometry (LSC). *Cytometry.* 2001, 44, 156–160.
19. Lin G, Adiga U, Olson K, Guzowski JF, Barnes CA, Roysam B: A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks. *Cytometry A.* 2003, 56A, 23–36.
20. Heynen S, Gough DA, Price JH: Optically stabilized mercury vapor short arc lamp as UV-light source for microscopy. In: *SPIE Proceedings.* Vol. 2982. Bellingham, WA: International Society for Optical Engineering; 1997. 430–434. p.
21. Kumar GL, Zucker RM: Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Imaging. Chapter in *Education Guide—Immunohistochemical (IHC) Staining Methods*, 5th ed. Carpinteria, CA: DAKO; 2008. 84 p.
22. Varga VS, Ficsor L, Kamarás V, Jónás V, Virág T, Tulassay Z, Molnár B: Automated multichannel fluorescent whole slide imaging and its application for cytometry. *Cytometry A.* 2009, 75A, 1020–1030.

23. Wessels JT, Pliquett U, Wouters FS: Light-emitting diodes in modern microscopy-from David to Goliath? *Cytometry A*. 2012, 81A, 188–197.
24. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA: High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104, 5300–5305.
25. Johnson KL, Stroh H, Khosrotehrani K, Bianchi DW: Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: A comparison of manual and automated microscopy. *Microsc Res Tech*. 2007, 70, 585–588.
26. Kajtár B, Méhes G, Lörch T, Deák L, Kneif M, Alpár D, Pajor L: Automated fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of t(9;22)(q34;q11) in interphase nuclei. *Cytometry A*. 2006, 69A, 506–514.
27. Alpár D, Kajtár B, Kneif M, Jáksó P, László R, Kereskai R, Pajor L: Automated detection of residual leukemic cells by consecutive immunolabeling for CD10 and FISH for ETV6/RUNX1 rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007, 173, 23–30.
28. Alpár D, Hermes J, Pótó L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, Kajtár B: Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry A*. 2008, 73A, 651–657.
29. Rodenacker K, Aubele M, Hutzler P, Adiga PS: Groping for quantitative digital 3-D image analysis: An approach to quantitative fluorescence in situ hybridization in thick tissue sections of prostate carcinoma. *Anal Cell Pathol*. 1997, 15, 19–29.
30. Ortiz de Solorzano C, Santos A, Vallcorba I, Garcia-Sagredo, del Pozo F: Automated FISH spot counting in interphase nuclei: Statistical validation and data correction. *Cytometry*. 1998, 31, 93–99.
31. Kozubek M, Kozubek S, Lukasova E, Mareckova E, Bartova E, Skalníková M, Jergova A: High-resolution cytometry of FISH dots in interphase cell nuclei. *Cytometry*. 1999, 36, 279–293.
32. Lerner B, Clocksin WF, Dhanjal S, Hultén MA, Bishop CM: Automatic signal classification in fluorescence in situ hybridization images. *Cytometry*. 2001, 43, 87–93.
33. Raimondo F, Gavrielides MA, Karayannopoulou G, Lyroudia K, Pitas I, Kostopoulos I: Automated evaluation of Her-2/neu status in breast tissue from fluorescent in situ hybridization images. *IEEE Trans Image Process*. 2005, 14, 1288–1299.
34. Gué M, Messaoudi C, Sun JS, Boudier T: Smart 3D-FISH: Automation of distance analysis in nuclei of interphase cells by image processing. *Cytometry A*. 2005, 67A, 18–26.
35. Narath R, Lörch T, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Ambros PF: Automatic telomere length measurements in interphase nuclei by IQ-FISH. *Cytometry A*. 2005, 68A, 113–120.
36. Konsti J, Lundin J, Jumppanen M, Lundin M, Viitanen A, Isola J: A public-domain image processing tool for automated quantification of fluorescence in situ hybridisation signals. *J Clin Pathol*. 2008, 61, 278–282.
37. Carrell DT, Emery BR: Use of automated imaging and analysis technology for the detection of aneuploidy in human sperm. *Fertil Steril*. 2008, 90, 434–437.
38. Blandin AT, Mühlematter D, Bougeon S, Gogniat C, Porter S, Beyer V, Parlier V, Beckmann JS, van Melle G, Jotterand M: Automated four-color interphase fluorescence in situ hybridization approach for the simultaneous detection of specific aneuploidies of diagnostic and prognostic significance in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008, 186, 69–77.
39. Katz RL, Zaidi TM, Fernandez RL, Zhang J, He W, Acosta C, Daniely M, Madi L, Vargas MA, Dong Q, et al: Automated detection of genetic abnormalities combined with cytology in sputum is a sensitive predictor of lung cancer. *Mod Pathol* 2008; 21: 950–960. Erratum: *Mod Pathol*. 2008, 21, 1065. Jiang, Xiaoying Gao Feng (corrected to Gao, Xiaoying); Jiang, Feng (added). *Mod Pathol*. 2009, 22, 734–736.
40. Kilpatrick MW, Tafas T, Evans MI, Jackson LG, Antsaklis A, Brambati B, Tsipouras P: Automated detection of rare fetal cells in maternal blood: Eliminating the false-positive XY signals in XX pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 190, 1571–1578; discussion 1578–1581.
41. Evans MI, Sharp M, Tepperberg J, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T: Automated microscopy of amniotic fluid cells: Detection of FISH signals using the FastFISH imaging system. *Fetal Diagn Ther*. 2006, 21, 523–527.
42. Stevens R, Almanaseer I, Gonzalez M, Caglar D, Knudson RA, Ketterling RP, Schrock DS, Seemayer TA, Bridge JA: Analysis of HER2 gene amplification using an automated fluorescence in situ hybridization signal enumeration system. *J Mol Diagn*. 2007, 9, 144–150.
43. Brown LA, Huntsman D: Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: Challenges and solutions. *J Mol Histol*. 2007, 38, 151–157. Review.
44. Tubbs RR, Swain E, Pettay JD, Hicks DG: An approach to the validation of novel molecular markers of breast cancer via TMA-based FISH scanning. *J Mol Histol*. 2007, 38, 141–150.

45. Knudson RA, Shearer BM, Ketterling RP: Automated Duet spot counting system and manual technologist scoring using dual-fusion fluorescence in situ hybridization (D-FISH) strategy: comparison and application to FISH minimal residual disease testing in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007, 175, 8–18.
46. Wauters J, Assche EV, Antsaklis A, Tepperberg J, Sharp SM, Kilpatrick MW, Tafas T, Tsipouras P: Fully automated FISH examination of amniotic fluid cells. *Prenat Diagn.* 2007, 27, 951–955.
47. Seppo A, Frisova V, Ichetovkin I, Kim Y, Evans MI, Antsaklis A, Nicolaides KH, Tafas T, Tsipouras P, Kilpatrick MW: Detection of circulating fetal cells utilizing automated microscopy: Potential for noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 815–821.
48. Seppo A, Jalali GR, Babkowski R, Symiakaki H, Rodolakis A, Tafas T, Tsipouras P, Kilpatrick MW: Gain of 3q26: A genetic marker in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2009, 114, 80–83.
49. Tanke HJ, Florijn RJ, Wiegant J, Raap AK, Vrolijk J: CCD microscopy and image analysis of cells and chromosomes stained by fluorescence in situ hybridization. *Histochem J.* 1995, 27, 4–14.
50. Tanke HJ, Florijn RJ, Vrolijk J, Raap AK: Molecular cytogenetics: Unraveling of the genetic composition of individual cells by fluorescence in situ hybridization and digital imaging microscopy. *World J Urol.* 1995, 13, 138–142. Review.
51. Chawla MK, Lin G, Olson K, Vazdarjanova A, Burke SN, McNaughton BL, Worley PF, Guzowski JF, Roysam B, Barnes CA: 3D-catFISH: A system for automated quantitative three-dimensional compartmental analysis of temporal gene transcription activity imaged by fluorescence in situ hybridization. *J Neurosci Methods.* 2004, 139, 13–24.
52. Nederlof PM, van der Flier S, Verwoerd NP, Vrolijk J, Raap AK, Tanke HJ: Quantification of fluorescence in situ hybridization signals by image cytometry. *Cytometry.* 1992, 13, 846–852.
53. Truong K, Guilly MN, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Vielh P, Bourgeois CA, Dutrillaux B: Quantitative FISH by image cytometry for the detection of chromosome 1 imbalances in breast cancer: A novel approach analyzing chromosome rearrangements within interphase nuclei. *Lab Invest.* 1998, 78, 1607–1613.
54. Klijanienko J, Couturier J, Galut M, El-Naggar AK, Maciorowski Z, Padoy E, Mosseri V, Vielh P: Detection and quantitation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplification in breast cancer fine-needle samples. *Cancer.* 1999, 87, 312–318.
55. Kozubek M, Kozubek S, Lukášová E, Bártošová E, Skalníková M, Matula P, Matula P, Jirsová P, Cafourková A, Koutná I: Combined confocal and wide-field high-resolution cytometry of fluorescent in situ hybridization-stained cells. *Cytometry.* 2001, 45, 1–12.
56. Lörch T, Piper J, Tomisek JD: “Tile sampling”: A new method for the automated quantitative analysis of samples with high cell density and its application to Her2 scanning. In *Proceedings of the Third Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics*, Stockholm, Sweden, 2002. 9–14.p.
57. Reichard KK, Hall BK, Corn A, Foucar MK, Hozier J: Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffin-embedded whole tissue sections in B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2006, 19, 1027–1033.
58. Grigoryan AM, Dougherty ER, Kononen J, Bubendorf L, Hostetter G, Kallioniemi O: Morphological spot counting from stacked images for automated analysis of gene copy numbers by fluorescence in situ hybridization. *J Biomed Opt.* 2002, 7, 109–122.
59. Truong K, Boenders J, Maciorowski Z, Vielh P, Dutrillaux B, Malfoy B, Bourgeois CA: Signal amplification of FISH for automated detection using image cytometry. *Anal Cell Pathol.* 1997, 13, 137–146.
60. Netten H, van Vliet LJ, Vrolijk H, Sloos WCR, Tanke HJ, Young IT: Fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. *BioImaging.* 1998, 4, 93–106.
61. Allalou A, Wählby C: BlobFinder, a tool for fluorescence microscopy image cytometry. *Comput Methods Programs Biomed.* 2009, 94, 58–65.
62. Lerner B, Koushnir L, Yeshaya J: Segmentation and classification of dot and non-dot-like fluorescence in situ hybridization signals for automated detection of cytogenetic abnormalities. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 2007, 11, 443–449.
63. Piper J, Lörch T, Poole I, Tomisek JD: Computing the Her2:CEP-17 ratio of tumor cells in breast cancer tissue sections by analysis of the FISH spot counts of a tiles sampling. In *Proceedings of the Third Euroconference on Quantitative Molecular Cytogenetics*, Stockholm, Sweden, 2002. 54–59.p.
64. Pajor G, Alpár D, Kajtár B, Melegh B, Somogyi L, Kneif M, Bollmann D, Süle N, Pajor L: Automated signal pattern evaluation of a bladder cancer specific multiprobe-FISH assay applying a user-trainable workstation. *Microsc Res Tech.* 2012, 75, 814–820.

65. Ntouroupi TG, Ashraf SQ, McGregor SB, Turney BW, Seppo A, Kim Y, Wang X, Kilpatrick MW, Tsipouras P, Tafas T, et al.: Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br J Cancer*. 2008, 99, 789–795.
66. Erlecke J, Hartmann I, Hoffmann M, Kroll T, Starke H, Heller A, Gloria A, Sayer HG, Johannes T, Claussen U, et al.: Automated detection of residual cells after sex-mismatched stem-cell transplantation—Evidence for presence of disease-marker negative residual cells. *Mol Cytogenet*. 2009, 2, 12.
67. Conchello JA, Lichtman JW: Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*. 2005, 2, 920–931.
68. Mertz J: Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nat Methods*. 2011, 8, 811–819.
69. Ram S, Rodríguez JJ, Bosco G: Segmentation and detection of fluorescent 3D spots. *Cytometry A*. 2012, 81A, 198–212.
70. 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
71. Cremer C, Remm B, Bischoff A, Vollweiler T: Automated detection of radiation-induced chromosome aberrations following fluorescence in situ hybridization. *J Radiat Res*. 1992, 33 (Suppl), 189–205.
72. Netten H, Young IT, van Vliet LJ, Tanke HJ, Vrolijk H, Sloos WC: FISH and chips: Automation of fluorescent dot counting in interphase cell nuclei. *Cytometry*. 1997, 28, 1–10.
73. van de Rijke FM, Vrolijk H, Sloos W, Tanke HJ, Raap AK: Sample preparation and in situ hybridization techniques for automated molecular cytogenetic analysis of white blood cells. *Cytometry*. 1996, 24, 151–157.
74. Krijtenburg PJ, Alers JC, Bosman FT, van Dekken H: Comparison of automated and manual analysis of interphase in situ hybridization signals in tissue sections and nuclear suspensions. *Cytometry*. 1996, 25, 99–103.
75. Mesker WE, Alers JC, Sloos WC, Vrolijk H, Raap AK, Dekken HV, Tanke HJ: Automated assessment of numerical chromosomal aberrations in paraffin embedded prostate tumor cells stained by in situ hybridization. *Cytometry*. 1996, 26, 298–304.
76. Adiga PS, Chaudhuri BB: Efficient cell segmentation tool for confocal microscopy tissue images and quantitative evaluation of FISH signals. *Microsc Res Tech*. 1999, 44, 49–68.
77. Plesch A, Loerch T: Metafer—A novel ultra high throughput scanning system for rare cell detection and automatic interphase FISH scoring. 12th Fetal Cell Workshop, Prague; 2001. 329–339.p.
78. Shimoni A, Nagler A, Kaplinsky C, Reichart M, Avigdor A, Hardan I, Yeshurun M, Daniely M, Zilberstein Y, Amariglio N, et al.: Chimerism testing and detection of minimal residual disease after allogeneic hematopoietic transplantation using the bioView (Duet) combined morphological and cytogenetical analysis. *Leukemia*. 2002, 16, 1413–1418; discussion1419–1422.
79. Truong K, Gibaud A, Dupont JM, Guilly MN, Soussaline F, Dutrillaux B, Malfoy B: Rapid prenatal diagnosis of Down syndrome using quantitative fluorescence in situ hybridization on interphase nuclei. *Prenat Diagn*. 2003, 23, 146–151.
80. Méhes G, Luegmayr A, Kornmüller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF: Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology. *Am J Pathol*. 2003, 163, 393–399.
81. Narath R, Lörch T, Rudas M, Ambros PF: Automatic quantification of gene amplification in clinical samples by IQ-FISH. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004, 57B, 15–22.
82. Tubbs RR, Pettay JD, Swain E, Roche PC, Powell W, Hicks DG, Grogan T: Automation of manual components and image quantification of direct dual label fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER2 gene amplification: A feasibility study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006, 14, 436–440.
83. Shah S: Image enhancement for increased dot-counting efficiency in FISH. *J Microsc*. 2007, 228, 211–226.
84. Gudla PR, Nandy K, Collins J, Meaburn KJ, Misteli T, Lockett SJ: A high-throughput system for segmenting nuclei using multiscale techniques. *Cytometry A*. 2008, 73A, 451–466.
85. Wang X, Zheng B, Zhang RR, Li S, Chen X, Mulvihill JJ, Lu X, Pang H, Liu H: Automated analysis of fluorescent in situ hybridization (FISH) labeled genetic biomarkers in assisting cervical cancer diagnosis. *Technol Cancer Res Treat*. 2010, 9, 231–242.
86. Iannuccelli E, Mompert F, Gellin J, Lahbib-Mansais Y, Yerle M, Boudier T: NEMO: A tool for analyzing gene and chromosome territory distributions from 3D-FISH experiments. *Bioinformatics*. 2010, 26, 696–697.
87. Klewes L, Höbsch C, Katzir N, Rourke D, Garini Y, Mai S: Novel automated three-dimensional genome scanning based on the nuclear architecture of telomeres. *Cytometry A*. 2011, 79A, 159–166.

88. Shirley JW, Ty S, Takebayashi S, Liu X, Gilbert DM: FISH Finder: A high-throughput tool for analyzing FISH images. *Bioinformatics*. 2011, 27, 933–938.
89. Reljin B, Paskas M, Reljin I, Konstanty K: Breast cancer evaluation by fluorescent dot detection using combined mathematical morphology and multifractal techniques. *Diagn Pathol* 2011, 6 (Suppl 1): S21.
90. Hicks DG, Tubbs RR: Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: A technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol*. 2005, 36, 250–261. Review.
91. Ellis CM, Dyson MJ, Stephenson TJ, Maltby EL: HER2 amplification status in breast cancer: A comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J Clin Pathol*. 2005, 58, 710–714.
92. Moerland E, van Hezik RL, van der Aa TC, van Beek MW, van den Brule AJ: Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) combined with automated spot counting. *Cell Oncol*. 2006, 28, 151–159.
93. Theodosiou Z, Kasampalidis IN, Karayannopoulou G, Kostopoulos I, Bobos M, Bevilacqua G, Aretini P, Starita A, Lyrondia K, Pitas I: Evaluation of FISH image analysis system on assessing HER2 amplification in breast carcinoma cases. *Breast*. 2008, 17, 80–84.
94. Turashvili G, Leung S, Turbin D, Montgomery K, Gilks B, West R, Carrier M, Huntsman D, Aparicio S: Inter-observer reproducibility of HER2 immunohistochemical assessment and concordance with fluorescent in situ hybridization (FISH): Pathologist assessment compared to quantitative image analysis. *BMC Cancer*. 2009, 9, 165.
95. Kilpatrick MW, Sheehan CE, Marganski WA, Tafas T, Ross MS, Ross JS: Determination of HER2 gene status by fully automated fluorescence microscopy. *Anal Quant Cytol Histol*. 2011, 33, 205–210.
96. Schunck C, Mohammad E: Automated analysis of FISH-stained HER2/neu samples with metafer. In: Al-Mulla F, editor. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 724. New York: Springer Science + Business Media; 2011. 91–103.p.
97. Rygiel AM, van Baal JW, Milano F, Wang KK, ten Kate FJ, Fockens P, Rosmolen WD, Bergman JJ, Peppelenbosch MP, Krishnadath KK: Efficient automated assessment of genetic abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization on brush cytology in a Barrett esophagus surveillance population. *Cancer*. 2007, 109, 1980–1988.
98. Truong K, Gibaud A, Zalzman G, Guilly MN, Antoine M, Commo F, Fouquet C, Cadranel J, Soussi T, Dutrillaux B, et al.: Quantitative fish determination of chromosome 3 arm imbalances in lung tumors by automated image cytometry. *Med Sci Monit*. 2004, 10, 426–432.
99. Pajor G, Süle N, Alpár D, Kajtár 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 immunophenotypic pre-selection of uroepithelial cells. *Cytometry A*. 2008, 73A, 259–265.
100. 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.
101. Marganski WA, El-Sirgany Costa V, Kilpatrick MW, Tafas T, Yim J, Matthews M: Digitized microscopy in the diagnosis of bladder cancer: Analysis of >3000 cases during a 7-month period. *Cancer Cytopathol*. 2011, 119, 279–89.
102. Hieber L, Huber R, Bauer V, Schäffner Q, Braselmann H, Thomas G, Bogdanova T, Zitzelsberger H: Chromosomal rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: Evaluation by spectral karyotyping and automated interphase FISH. *J Biomed Biotechnol* 2011. 2011, 693691. 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2011/693691>
103. Lev D, Daniely M, Zudik A, Preisler E, Hoffmann N, Kaplan T, Raz U, Yanoov-Sharav M, Vinkler H, Malinger G: Automatic scanning of interphase FISH for prenatal diagnosis in uncultured aminocytes. *Genet Test*. 2005, 9, 41–47.
104. Carrell DT: The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: Pitfalls and promises. *J Androl*. 2008, 29, 124–133. Review.
105. Oosterwijk JC, Kneplé CF, Mesker WE, Vrolijk H, Sloos WC, Pattenier H, Ravkin I, van Ommen GJ, Kanhai HH, Tanke HJ: Strategies for rare-event detection: An approach for automated fetal cell detection in maternal blood. *Am J Hum Genet*. 1998, 63, 1783–1792.
106. Lukášová E, Kozubek S, Kozubek M, Kjeronská J, Rýznar L, Horáková J, Krahulcová E, Horneck G: Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet*. 1997, 100, 525–535.
107. Bielgorai B, Golan H, Trakhtenbrot L, Reichart M, Toren A, Daniely M, Zilberstein Y, Amariglio N, Rechavi G, Kaplinsky C: Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization in

- follow-up of minimal residual disease in a child with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002, 138, 64–68.
108. Guber A, Greif J, Rona R, Fireman E, Madi L, Kaplan T, Yemini Z, Gottfried M, Katz RL, Daniely M: Computerized analysis of cytology and fluorescence in situ hybridization (FISH) in induced sputum for lung cancer detection. *Cancer Cytopathol.* 2010, 118, 269–277.
 109. Gaiser T, Berroa-Garcia L, Kemmerling R, Dutta A, Ried T, Heselmeyer-Haddad K: Automated analysis of protein expression and gene amplification within the same cells of paraffin-embedded tumour tissue. *Anal Cell Pathol.* 2010, 33, 105–112.

6. 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 részvevőknek, a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport centrumai és a felnőtt onkohematológiai ellátó hálózat centrumai valamint szubcentrumai vezetőinek, különösképpen szerzőtársaimnak, egyúttal a munkálatok mindenkori támogatásáért a POTE / PTE Pathológiai Intézet munkatársainak. Hálás szívvel gondolok családomra és külön köszönettel tartozom a nyugodt háttérrel biztosító feleségemnek.