

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Reziduális tumorsejtek vizsgálata gyermekkori t(12;21)
pozitív akut lymphoblastos leukaemiában**

Dr. László Renáta

Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok
Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Program: Molekuláris pathomorfológia
Program és témavezető: Prof. Dr. Pajor László



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pathológiai Intézet

Pécs, 2015.

Rövidítések jegyzéke

ALL	acut lymphoblastos leukaemia
B-ALL	B-sejtvonal eredetű ALL
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
cDNS	komplementer DNS
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNS	dezoxi-ribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
ETV6	ETS variant gén (rég neve TEL)
FCM	flow citometria
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluoreszcein izotiocianát
G6PDH	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
iFISH	interfázis FISH (FISH on interphase nucleus)
IG	immunglobulin
IGH	immunglobulin nehézlánc (immunoglobulin heavy chain)
IGK	immunglobulin κ könnyűlánc (immunoglobulin kappa light chain)
Kde	kappa deletáló elem
LOH	heterozigótaság elvesztése (loss of heterozygosity)
MNC	mononuclearis sejt (mononuclear cell)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
pALL	gyerekkori acut lymphoblastos leukaemia (pediatric ALL)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
RQ-PCR	valós idejű kvantitatív PCR (real-time quantitative PCR)
RQ-RT-PCR	real-time kvantitatív reverz transzkripció PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR)
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció (reverse transcription PCR)
RUNX1	runt-related transcription factor 1 gén (rég nevéen AML1)
SFM	pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (scanning fluorescence microscopy)
TCR	T-sejt receptor (T-cell receptor)
TCRD	T-sejt receptor delta

1. Bevezetés

Az acut lymphoblastos leukaemia (ALL) a leggyakoribb malignus betegség gyermekkorban. A gyermekkori ALL (pALL) kezelése kapcsán az utóbbi évtizedekben elért eredmények önmagukért beszélnek, az 5 éves túlélés az 1960-as években tapasztalt alig 10%-ról mára 85-90%-ra emelkedett. Napjainkban a terápiás cél már nem csak a túlélés további javítása, hanem a kevésbé agresszív terápiával is sikeresen kezelhető betegcsoportok, a rizikóhoz-igazított kezelés meghatározása.

Az immunológiai és a molekuláris technikák fejlődése lehetővé tette, hogy a morfológiai módszerek érzékenységét meghaladó szinteken is kimutatható legyen a reziduális betegség. A minimális reziduális betegség (MRD) a leukaemiás sejtek legalacsonyabb szintje, mely egy adott diagnosztikai eljárással kimutatható. A módszernek lehetőleg el kell érnie a 10^{-4} – 10^{-5} érzékenységi fokot, vagyis egy kóros sejt kimutatására is legyen képes tízezer, illetve százezer sejt között. Az MRD vizsgálata nem csak azért fontos, mert a terápiás protokollok egyre nagyobb számában meghatározó tényező, hanem azért is, mert a betegség kimenetelének megjóslásában is fontos szerepe van függetlenül más prognosztikai faktoroktól. Az AIEOP-BMF ALL 2000 tanulmány a klónspecifikus géntrendeződések valós idejű polimeráz láncreakció (RQ-PCR) analízisét, a BIOMED-1 tanulmány emellett a flow citometriás immunfenotipizálást és specifikus kromoszóma transzlokáció jelenléte esetén a fúziós régió által kódolt kiméra mRNS expressziójának valós idejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (RQ-RT-PCR) analízisét ajánlja az MRD monitorizálására.

A sejt alapú módszerek közül a flow citometriás (FCM) immunfenotipizálás gyors, egyszerű és érzékeny módszer az MRD meghatározásához. A módszer a leukaemiás sejtek kóros fenotípus expressziójának kimutatásán alapszik, ami kétségtelenül sok esetben jelen van, de messze nem az összes pALL-es betegnél. Fontos, hogy a leukaemiás sejtek megkülönböztetéséhez használt immunfenotípus ne essen egybe a normál lymphoid sejtekével, figyelembe véve, hogy bizonyos immunfenotípusok, amelyek látszólag nincsenek jelen egy egészséges donorból származó csontvelő minta sejtjein, a kemoterápiás kezelés után aktívan proliferáló csontvelőben már láthatóvá válhatnak. Az FCM megbízhatóságát befolyásoló másik fontos tényező a vizsgálat elvégzéséhez rendelkezésre álló sejtek száma. Ha 10000 sejt közül szeretnénk megtalálni 1 leukaemiás sejtet, akkor legalább 100000 mononuclearis sejtet kell megvizsgálni, mivel minimum 10 leukaemiás találat kell az FCM eredmények értékeléséhez. A használt markereknek stabilan kell expresszálniuk a

leukaemiás sejteken, ugyanakkor a vizsgálatot végzőnek tisztában kell lennie azzal is, hogy a kemoterápia hatására markerek nyerése, illetve vesztese is előfordulhat. A betegség lefolyása során előfordulhat az immunfenotípus megváltozása, ezért betegenként lehetőleg három vagy annál több különböző leukaemia-specifikus markert kell monitorozni a fals negatív eredmények elkerülése érdekében.

Egy másik ígéretes, bár nem széles körben elterjedt sejt alapú módszer az MRD monitorizálására a pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM – Scanning Fluorescent Microscopy). A módszer lényege röviden, hogy specifikus fenotípus alapján szelektált sejteken – *in situ* jelölést, valamint relokalizációt követően – genotípus vizsgálat végezhető, tehát egy jól körülhatárolt fenotípushoz tartozó genotípust lehet analizálni. Előre meghatározott keresési kritériumok alapján nagy számú sejt automatikus szkennelése történik meg. Először az egyedülálló és az összetapadt sejteket kell elkülöníteni a sejtmagok morfológiai paramétereinek alapján, majd az autofluoreszcens objektumok kizárása történik meg. Ezt követi az immunfenotipizálás, így a konszekutív fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) analízist csak az egyedülálló, nem autofluoreszcens, az adott markerre nézve pozitív sejteken értékeljük. Az immunfluoreszcens és a FISH jelmintázat automatikus szkennelése révén 10^4 nagyságrendű sejt vizsgálható rövid időn belül. Mivel az SFM mind a fenotípus, mind a genotípus vizsgálatára alkalmas *in situ* sejt alapú technika, ezért a flow citometria helyett ezt a módszert használtuk az MRD detektálására.

Az antigén receptor génátrendeződések PCR vizsgálata megbízható, pontos és a gyermekkori ALL esetek döntő többségében használható módszer az MRD monitorizálására. Az átrendeződött immunglobulin (IG) és T-sejt receptor (TCR) gének sejtenként egy kópiában vannak jelen, így valós idejű PCR technika alkalmazásával az MRD igen pontos meghatározása válik lehetővé. A B-sejtes ALL (B-ALL) esetek több mint 90%-ban hordoznak IG nehézlánc (IGH), kb. 80%-ban TCR- δ (TCRD), kb. 50%-ban TCR- γ , illetve IG könnyűlánc – kappa deletáló elem (IGK-Kde), 46%-ban TCR- α és 29%-ban TCR- β génátrendeződéseket. Ugyanakkor az IG és TCR gének másodlagos átrendeződésen is áteshetnek, ami oligoklonalitáshoz vezet, azaz különböző klonális IG/TCR gént hordozó szubklónok alakulnak ki. Előfordulhat, hogy egyes minor klónok rejtve maradnak a diagnózis idején és csak a betegség lefolyása során válnak dominánssá és detektálhatóvá. Ezért a nemzetközi ajánlások két vagy több különböző átrendeződés vizsgálatát javasolják. Bár a leukaemiás betegek többségénél valóban lehetőség van több marker azonosítására, az esetek kb. 30%-ában ezek nem mindegyike detektálható kellő szenzitivitással. Személyenként két

vagy több marker klónspecifikus régiójának meghatározása viszonylag költséges és időigényes folyamat.

A leukaemiás sejtek specifikus transzlokáció jelenléte esetén is elkülöníthetők a normál sejtektől, mivel a fúziós gének aberráns mRNS expresszióját eredményezik. A módszer előnye a szenzitivitás mellett, hogy a molekuláris eltérés és a leukaemiás klón között szoros kapcsolat van, mely független a terápia vagy klónszelekció hatására bekövetkező sejtszintű változásoktól. Ugyanakkor kromoszóma transzlokációk a gyerekkori ALL esetek csak kb. 30-40%-ában vannak jelen. Fontos tudni azt is, hogy a fúziós gén termékek csak leukaemia és nem betegspecifikusak, ami egy esetleges kereszt-kontamináció és az ebből származó fals pozitív eredmények felismerését igen megnehezíti. Szintén a módszer hátrányai közé tartozik, hogy a leukaemiás sejtek száma nem adható meg pontosan, mivel a leukaemiás sejtekben lévő transzkriptumok száma betegről betegre változik azonos ALL altípus esetén is.

Vizsgálataink során a sejt alapú SFM, a DNS és RNS alapú PCR módszerrel mért MRD eredményeket hasonlítottuk össze. A vizsgálatokat a gyerekkori ALL-ben leggyakrabban előforduló t(12;21)(p13;q22) (*ETV6/RUNX1*) kromoszóma transzlokációt hordozó betegcsoporton végeztük el. Míg korábban arról számoltak be, hogy az *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó esetek kedvező kimenetelűek, más tanulmányok a relapszusok előfordulási aránya miatt ezt kétségbe vonták. Felmerült a kérdés, hogy a sejt, DNS és RNS alapú, vagyis a három különböző targettal rendelkező módszerrel kimutatható-e valamilyen heterogenitás ebben a betegségcsoportban, amely megmagyarázza az eltérő irodalmi eredményeket.

2. Célkitűzések

1. A t(12;21) pozitív pALL esetek azonosítása a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetébe érkező csontvelő minták közül RT-PCR-rel.
2. A t(12;21) pozitív eseteknél klonális génátrendeződések azonosítása, klónspecifikus primerek tervezése.
3. A minimális reziduális betegség vizsgálata a fenti pALL esetek követéses mintáin
 - a. RNS alapú RQ-RT-PCR módszerrel,
 - b. DNS alapú RQ-PCR módszerrel,
 - c. sejt alapú SFM módszerrel.
4. Az egyes lépések gyakorlati nehézségeinek ismertetése konkrét példákkal szemléltetve.

5. A valós idejű PCR reakcióval mért RNS és DNS alapú MRD eredmények összehasonlítása, az esetleges eltérések lehetséges okainak feltárása.
6. A valós idejű PCR reakcióval mért RNS és DNS alapú MRD eredmények összehasonlítása a sejt alapú, kombinált fenó- és genotípus vizsgálaton alapuló pásztázó fluoreszcens mikroszkópia során mért eredményekkel, az esetleges eltérések lehetséges okainak feltárása.
7. Több szubklónnal rendelkező beteg esetének bemutatása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetében diagnosztizált, acut lymphoblastos leukaemiában szenvedő gyermekek csontvelő mintáin végeztük el. A beküldő intézetek a Pécsi Gyermekklinika, a Szegedi Gyermekklinika, a szombathelyi Markusovszky Egyetemi Oktatókórház és a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház Gyermekegészségügyi Központ Gyermekhaematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztálya voltak. A betegség diagnózisának felállítása a 2008-as WHO klasszifikáció során rögzített diagnosztikus elvek alapján történt. Prekurzor B-ALL fennállása esetén először a t(12;21) pozitív betegcsoportot azonosítottuk, majd az ő mintáikon végeztük el a további vizsgálatokat. A kezelési protokolloknak megfelelően a diagnosztikus csontvelő aspirátumon kívül a következő követéses időpontokban érkeztek minták: a 15. napon (d15), az indukciós blokk végén a 33. napon (d33), a Protokoll M/konzolidációs blokk elején a 12. héten (w12), a késői reintenzifikáció előtt az 5. hónapban (m5) és a teljes kezelés (fél év intenzív + másfél év fenntartó terápia) végén. Relapszus esetén a folyamat kezdődött előlről. Minden gyermeket az ALL IC-BFM 2002 protokoll szerint kezeltek. A vizsgálatok elvégzéséhez szükséges írásos beleegyezést a gyermekek szülei megadták.

3.2. DNS és RNS extrakció

A mononuclearis (MNC) csontvelői sejteket sűrűség gradiens centrifugálással választottuk el egymástól. 5×10^5 sejtet citospin preparátumok készítéséhez használtunk. A DNS-t friss vagy fagyasztott 1×10^7 MNC-ből izoláltuk QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit segítségével a gyártó utasításai szerint. A teljes RNS-t friss 2×10^7 mononuclearis sejtől nyertük ki TRIzol[®] reagens felhasználásával a gyártó útmutatása szerint.

3.3. t(12;21) RT-PCR

A reverz transzkripció és a nested PCR elvégzéséhez az irodalomban leírt primereket és protokollt használtuk. Pozitív kontrollként a t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó REH sejtvonalat, negatív kontrollként a K562 sejtvonalat használtuk. A termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézissel azonosítottuk.

3.4. t(12;21) RQ-RT-PCR

A t(12;21) pozitív betegektől származó RNS 1 µg-jával RT-PCR-t végeztünk 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) felhasználásával. Ezt követően a cDNS-t LightCycler® rapid thermal cycler rendszerben amplifikáltuk. Az *ETV6/RUNX1* fúziós terméket fluoreszcens hibridizációs próbák segítségével detektáltuk. A PCR-t a LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes kit segítségével hajtottuk végre a gyártó utasításainak megfelelően. A kezdeti denaturálás után 50 cikusból álló denaturálás, annealing és extenzió következett, amit olvadási görbe analízis és hűtés követett. Az RNS szintjét ugyanabban a cDNS mintában jelen lévő humán glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH) RNS szintjével normalizáltuk LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set segítségével.

3.5. IGH, IGK-Kde és TCRD PCR

A monoklonális IG nehézlánc (IGH), IG könnyűlánc – kapa deletáló elem (IGK-Kde) és T-sejt receptor-δ (TCRD) génátrendeződéseket családspecifikus primerek felhasználásával PCR és heteroduplex analízis segítségével azonosítottuk. Negatív kontrollként 5 egészséges donor perifériás vér mintájából izolált MNC keveréke szolgált, pozitív kontrollnak a REH sejtvonalat használtuk. A kezdeti denaturálást 40 ciklus denaturálás, annealing és extenzió, majd a végső elongáció és heteroduplex analízis követte. A PCR termékeket a méretük alapján poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét és 0,5 µg/ml etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

Klonális génátrendeződés esetén a DNS terméket kivágtuk és GenElute™ Gel Extraction Kit használatával visszanyertük a gélből. Ezt követően fluoreszcens szekvenálást végeztünk BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit segítségével ABI automata szekvenálón a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvenálást az esetleges gépi leolvasási hibák elkerülése miatt mindkét irányból elvégeztük.

Az immunglobulin és az immunglobulin szupergéncsaládba tartozó TCR gének az ún. V(D)J-rekombináció eredményeként jönnek létre germline variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsolódási (J – joining) génszegmensekből. A több enzim részvételével zajló

V(D)J rekombináció közben a terminális dezoxinukleotidil transzferáz enzim a germline templáttól függetlenül nukleotidokat (N) kapcsol az összekapcsolódó D-J, illetve a V-DJ szakaszok közötti DNS lánchoz, emellett germline kódolt speciális palindróma (P) nukleotidok addíciója is megtörténhet. Leukaemiák esetén a monoklonalitás miatt felszaporodó, azonos átrendeződést hordozó génszakasz egyedi junkcionális régiójára tervezhetünk klónspecifikus primert. A kapott szekvenciákban a germline V, D és J génszegmenseket a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és az IMGT (www.imgt.org) online szekvencia azonosító programok segítségével határoztuk meg. A germline génszakaszok azonosítása után klónspecifikus primert terveztünk a junkcionális régióra. A primer tervezésben segítségünkre volt az Oligo 6 Primer Analysis Software.

3.6. IGH, IGK-Kde és TCRD RQ-PCR

A valós idejű PCR reakciókat LightCyclerTM rapid thermal cycler rendszer segítségével végeztük el az irodalomban megadott germline reverz primerekkel és próbákkal, valamint az általunk tervezett forward, a junkcionális régióra specifikus primerekkel. A termékeket kettős jelölésű fluoreszcens TaqMan próbák segítségével detektáltuk. A próbák 5'-végén FAM-ot használtunk reporter festékként, a 3'-végükön pedig TAMRA-t, mint quencher. Normál MNC-ből származó DNS-t ill. steril vizet használtunk negatív kontrollként. A kezdeti denaturálást 50 ciklus denaturálás, annealing és extenzió, végül a hűtés követte. A reakció érzékenységét úgy állapítottuk meg, hogy a diagnosztikus DNS-ből hígítási sorot készítettünk az MNC-ből származó negatív kontrollba, az érzékenységet a legnagyobb, de még pozitív reakciót adó hígítás adta meg. Az albumin gént használtuk a minták közötti mennyiségi és minőségi különbségek korrigálásához. Standard görbéket a Human Genom Albumin vízben történő tízszeres hígítási sorából nyertünk.

3.7. Immuncitokémiai preparátumok

Az SFM vizsgálatok elvégzéséhez 5×10^5 mononuclearis sejtből citológiai preparátumokat készítettünk. Primér antitestként jelöletlen egér anti-CD10 antitestet használtunk, a reakciót biotinilált anti-egér antitest és avidin-FITC segítségével hívtuk elő. A lemezeket 0,005 $\mu\text{g/ml}$ Vectashield-DAPI oldattal fedtük le.

3.8. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM)

Az automatizált szkenneléshez és analízishez a 8 tárgylemezes motorizált tárgyasztallal, magas felbontású fekete-fehér CCD kamerával felszerelt Zeiss Axioplan

2ie Mot mikroszkóp állomást használtunk, melyet a Metafer 4.0 szoftver működtetett (képrögzítés, feldolgozás, citometriai mérések). A mikroszkóp 100W-os HBO lámpával, DAPI, FITC, SpectrumGreen és SpectrumOrange filterekkel, valamint Zeiss Fluar 10x/0,5, Plan-Neofluar 40x/0,75 objektívekkel volt felszerelve. A sejtmagok azonosítására és a CD10 detektálására 10x-es objektívet és a MetaCyte szoftver modult használtuk.

Autofókuszálást követően a rendszer DAPI csatornában érintkező, átfedésmentes képeket vett fel a preparátum teljes területéről. Az objektumok X és Y koordinátáit a rendszer a későbbi relokalizáció céljából rögzítette. Ezután a sejtek átlagos pixelintenzitását mértük fix integrációs idő (0,58 s) mellett a CD10-FITC szignál csatornában, DAPI objektumonként. A pixelintenzitást kontroll csatornában (SpectrumOrange) is mértük az autofluoreszcens objektumok felismerése és kizárása céljából. A rendszer a DAPI, FITC és SpectrumOrange csatornában felvett képeket galériában RGB (red-green-blue) formátumban is megjelenítette az egyes csatornában mért pixelintenzitások eloszlási hisztogramjaival együtt. Ennek alapján tudtuk a CD10+ sejteket elkülöníteni a CD10-, illetve az autofluoreszcens objektumoktól. A későbbiekben elvégzett *ETV6/RUNX1* iFISH jeleket csak az egyedülálló, nem autofluoreszcens, CD10+ objektumokon vizsgáltuk.

3.9. Interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizáció (iFISH)

Az immuncitokémiai jelölés után ugyanazon a preparátumon interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációt (iFISH) hajtottunk végre. A mintát Vysis LSI *ETV6/RUNX1* átrendeződésre specifikus fúziós, kétszínű, extraszignálos próbával jelöltük a gyártó útmutatása alapján.

A CD10+ sejtmagok relokalizációját a Metafer 4.0 szoftver segítségével végeztük el a tárolt X és Y koordináták és a galériaképek alapján. A relokalizált magokat az Isis (In situ imaging system) modul mind SpectrumGreen, mind SpectrumOrange csatornában rögzítette. Ezt követően elemeztük a CD10+ sejtek FISH mintázatát. Negatív sejtmagokban 2 zöld és 2 piros jelet láttunk, míg a transzlokációt hordozó magokban egy fúziós (sárga) és egy extraszignál (piros) is megjelent a folyamatban részt nem vevő allélt jelző 1-1 zöld és piros jel mellett.

Preparátumonként átlagban 27050 sejtet analizáltunk. A kombinált módszer szenzitivitása 98,67%, specificitása 99,97% volt. Ahhoz hogy egy sejtet pozitívnak fogadjunk el kettős kritériumnak kellett teljesülnie: mind a CD10, mind a t(12;21) pozitivitásnak meg kellett haladnia az átlag fals pozitívítás + 2SD küszöbértéket, mely immunfenotipizálás esetén $0,21\% + 2 \times 0,15\% = 0,51\%$, FISH genotipizálás esetén $15,80\% + 2 \times 0,75\% = 17,30\%$ volt.

4. Eredmények

4.1. Minták

Az elvégzett RT-PCR vizsgálat alapján 14 *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó prekurzor-B-ALL-es gyermeket azonosítottunk, az ő követéses mintáikon végeztük el a sejt, DNS és RNS alapú vizsgálatokat. A betegek életkora a diagnózis idején 2 és 17 év között változott, az átlag 6,07 év, a nemek aránya 1:1 volt. Az átlagos követési idő 30,5 hónap (20-38 hónap) volt. Egy betegnél alakult ki relapszus 24 hónap követés után, egy másikon pedig a betegség kezdete után 27 hónappal meningealis relapszus jelentkezett.

Míg a terápia megkezdése előtti diagnosztikus mintákban igen nagy számban voltak jelen mononuclearis sejtek, addig a kezelés hatására ezek száma a követéses időpontokban már jelentősen lecsökkent. Sokszor a beküldött anyag térfogata is igen változó volt, melynek hátterében a csontvelővétel nehézségei állhattak. Olyan eset is előfordult, hogy az összsejtszám nem volt elegendő mindhárom vizsgálat elvégzéséhez, ilyenkor mérlegelnünk kellett, hogy melyik vizsgálatot részesítsük előnyben. A döntés során figyelembe vettük, hogy optimális esetben RNS izoláláshoz 2×10^7 , DNS izoláláshoz 1×10^7 , míg citospin preparátumok készítéséhez ezeknél jóval kevesebb, csak 5×10^5 sejtre van szükség. Ugyanakkor az SFM érzékenysége alacsonyabb, mint a másik két módszer szenzitivitása. Ezen szempontokat figyelembe véve minden ilyen esetben egyedi mérlegelés alapján döntöttünk.

Az MRD szintjét a kezeletlen mintában (ez az érték a diagnózis idején 1,0 volt) és a különböző követéses időpontokban mért specifikus target mennyiségének az aránya határozta meg, ezáltal lehetővé vált, hogy a különböző módszerekkel mért adatokat összehasonlíthassuk. A tumorhígulást (clearance) a specifikus target relatív mennyiségének negatív logaritmusaként fejeztük ki.

4.2. Az RQ-PCR és RQ-RT-PCR adatok összehasonlítása

A DNS alapú RQ-PCR módszerrel minden betegnél sikerült klonális génátrendeződést azonosítanunk. Hat esetben egy, hét esetben kettő, egy esetben három klonális markert találtunk. Ha ugyanannak a mintának a vizsgálata során két vagy több független DNS-markerrel különböző MRD szintet kaptunk, akkor a legmagasabb értéket vettük figyelembe.

Az *ETV6-RUNX1* mRNS relatív mennyisége a diagnózis idején nagyfokú variabilitást mutatott, az átlag érték 4,59 (0,51–12,77) volt. A két különböző módszerrel mért tumor clearance összehasonlításakor a legalább egy nagyságrendbeli eltérést vettük különbségnek.

Hatból két esetben láttuk ekkora különbséget d15 esetén. Mindkét esetben az RQ-RT-PCR eredmény a leukaemiás sejtek nagyobb redukcióját mutatta és egy beteg esetében a különbség a következő időpontban is fennállt. Különbség d33 esetén 12-ből 3 betegnél jelentkezett, minden esetben az expresszió alapú módszerrel mértünk alacsonyabb értéket. Két esetben a különbség w12 esetén is jelen volt. Szintén az RNS alapú módszerrel találtunk nagyobb tumor dilúciót 14-ből 3 esetben az m5 időpontban. Összességében 42-ből 10 esetben (24%) találtunk legalább egy nagyságrendbeli különbséget és minden esetben az RNS alapú módszerrel mértünk alacsonyabb MRD szintet.

4.3. RQ-PCR, RQ-RT-PCR és SFM adatok összehasonlítása

A terápia megkezdése előtt a CD10 és FISH pozitív sejtek átlagban 82,88%-át tették ki a mononuclearis csontvelői sejteknek. Az SFM módszer fals pozitivitása (3×10^{-4}) és az általunk meghúzott pozitivitási küszöb érték miatt (átlag+2SD = 9×10^{-4}) a sejt, DNS és RNS alapú módszereket 10^{-2} és 10^{-3} MRD értékeken hasonlítottuk össze. 10^{-2} határnál d33 esetén az összes beteg negatívnak bizonyult mindhárom módszerrel, míg 10^{-3} értéknél ez csak az RNS alapú módszerre volt igaz. Ugyanezen az MRD szinten, de DNS alapú vizsgálattal csak w12 időpontra érte el az összes beteg a negatív tartományt. Míg az RNS és DNS alapú módszerekkel 10^{-3} MRD szinten d33, illetve w12 időpontra az összes beteg negatív lett, ezzel szemben a betegek egy részénél a 10^{-3} feletti reziduális betegség SFM módszerrel nem csökkent zéróvá. Sőt, ezzel a módszerrel és ebben az MRD tartományban az MRD pozitív betegek aránya 13%-ról 36%-ra növekedett w12 és m5 között, míg a másik két módszerrel nem volt detektálható reziduum.

A betegek ezen csoportja m5 időpontban átlagosan kisebb tumor dilúciós faktorial rendelkezik (1,9 tartomány: 1,4 – 2,5) a w12-nél látott értékkel (2,1) összehasonlítva. Az SFM-mel kimutatható reziduummal rendelkező betegek közül m5 időpontban kettőnél 1,5 log, három esetben 2,6-3,1 log különbség adódott a DNS adatokkal összehasonlítva, míg 2,9-4,2 nagyságrenddel magasabb volt a reziduum RNS-sel összehasonlítva. Összegezve, a DNS-RNS, illetve az SFM-mel mért target értékek között 1,5-4,2 log különbség adódott a 14-ből 5 betegnél m5 időpontban.

Ha SFM módszerrel reziduális leukaemiás sejteket mutattunk volna ki, akkor azokat az RNS és DNS alapú módszerekkel is detektálnunk kellett volna, hiszen a PCR alapú technikák magasabb szenzitivitással rendelkeznek. Ugyanakkor egy a transzlokációt hordozó, de még germline antigén receptor génnel rendelkező, RNS-t nem expresszáló preleukaemiás sejt a PCR alapú módszerekkel nem detektálható, míg SFM-mel igen. A FISH jelmintázat

alapján interfázis citogenetikai bizonyítékunk van arra, hogy az 5 betegnél w12 és m5 időpontokban az SFM módszerrel észlelt, dupla CD10-iFISH pozitív sejtek valóban leukaemia prekursor sejtek és nem reziduális tumorsejtek. Ahhoz, hogy a t(12;21)+ pALL kialakuljon, az *in utero* létrejövő monoallélikus átrendeződéshez postnatalisan másodlagos aberráció létrejötte szükséges. Ez 75%-ban a normál *ETV6* deléciója, mely a heterozigotáság elvesztését (LOH – loss of heterozygosity) eredményezi vagy a fúziós gén duplikációja. A kérdéses 5 beteg kezeletlen mintáiban komplex citogenetikai eltérések voltak észlelhetők: 3 esetben átrendeződés és a normál *ETV6* deléciója, 1-ben dupla fúziós gén és 1-ben az előző két variációt felváltva hordozó szubklónok voltak azonosíthatóak. Ezzel szemben ezen betegek d33 utáni követési mintáiban a CD10+ sejtekben csak 1 fúzió és a megtartott *ETV6* ill. *RUNX1* allélok voltak jelen, mely nem leukaemiás, hanem leukaemia prekursor sejtre utal.

4.4. Több szubklónnal rendelkező beteg vizsgálata

A klónspecifikus DNS alapú RQ-PCR-ral azonosítottunk egy több szubklónnal rendelkező beteget is, akinél a leukaemiás szubklónok eltérő viselkedését is sikerült kimutatnunk. A multiplex IGH PCR reakció során a 14-ből 1 esetben 3 klonális géntrendeződést találtunk három különböző V_H géncsaládból. Az egyes szubklónok szekvenálása ezt megerősítette és a következő germline géneket találtuk: VH3-30, DH6-13, JH4 (IGH1); VH4-31, DH6-13, JH4 (IGH2); VH1-3 DH3-9, JH6 (IGH3). A háromból két szubklón jelenléte a leukaemiás sejtek CD10 és CD34 expressziójának flow citometriás fenotipizálása alapján is sejthető volt. A tumor clearance klónspecifikus DNS alapú RQ-PCR vizsgálatok a különböző szubklónok eltérő viselkedését is sikerült kimutatnunk. Habár egyik szubklón esetén sem volt detektálható MRD érték w12 és m5 esetén, d33 időpontban 1,4 log különbségig terjedő különböző tumorhígulást mértünk. Feltételezzük, hogy ez a szignifikáns különbség az egyik ill. a másik két szubklón között a későbbi követési időpontokban is fennállt, csak a céltarget olyan alacsony mennyiségben volt jelen, hogy az meghaladta az RQ-PCR módszer szenzitivitását.

5. Diszkusszió

A gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia kezelése nemzetközi protokollok ajánlásai szerint történik, melyhez a betegeket standard, közepes és magas rizikójú csoportokba sorolják. A túlélés további javítása mellett a terápia célja a különböző

prognosztikai faktorok figyelembevételével a rizikóhoz-igazított kezelés meghatározása, így például egy magas rizikójú betegnél egy későbbi relapszus esetleg megelőzhető agresszívebb terápia alkalmazásával. Az életkor, a kiindulási fehérvérsejtszám, a korai prednizolon válasz, a különböző számbeli és strukturális kromoszóma rendellenességek mellett a minimális reziduális betegség vizsgálatának is fontos szerepe van a prognózis meghatározásában. Az MRD vizsgálatok fő célja tehát, hogy azonosítsuk azokat a betegeket, akiknél relapszus következhet be, annak ellenére, hogy a jó vagy közepes prognosztikai csoportba tartoznak, illetve azokat, akik elvileg magas rizikóval rendelkeznek, de esetleg kevésbé agresszív terápiával is kezelhetők lennének.

Az MRD detektálására a klónspecifikus génátrendeződések DNS alapú RQ-PCR vizsgálatát, a különböző kromoszóma transzlokációk során létrejövő kiméra mRNS expressziójának RQ-RT-PCR vizsgálatát és a flow citometriás immunfenotipizálást használják. Amellett, hogy mindhárom módszernek ismertek az előnyei és a hátrányai, az egyes technikák eltérő szenzitivitással is rendelkeznek ($10^{-4} - 10^{-5}$, $10^{-4} - 10^{-6}$, illetve $10^{-3} - 10^{-4}$). A különböző módszerekkel kapott eredmények összehasonlítását az adatok eltérő biológiai jelentése tovább nehezíti.

A nagy számú normál sejt között megbúvó malignus sejtek detektálására alkalmas módszer a pásztázó fluoreszcens mikroszkópia is. Mivel az SFM mind a fenó-, mind a genotípus vizsgálatára alkalmas *in situ* sejt alapú technika, ezért a flow citometria helyett ezt a módszert használtuk az MRD detektálására, az eredményeket pedig összehasonlítottuk a DNS és RNS alapú adatokkal.

A vizsgálatainkat a pALL esetek kb. 25%-át kitevő t(12;21) transzlokációt hordozó alcsoportján végeztük el. A *ETV6/RUNX1* pozitív betegek RQ-PCR és RQ-RT-PCR-rel mért MRD adatainak összehasonlításával csak néhány tanulmány foglalkozik. A DNS és az RNS alapú MRD mérések között több mint egy, vagy akár két nagyságrendbeli különbségről több munkacsoport is beszámolt.

Munkánk során 14 *ETV6/RUNX1* pozitív beteg 63 csontvelő mintáját vizsgáltuk DNS, RNS és *in situ* sejt alapú SFM módszerrel. Az MRD szintjét a kezeletlen mintában és a különböző követéses időpontokban mért specifikus target mennyiségének az aránya határozta meg, így a tumorhígulást vizsgálva lehetővé vált a különböző módszerekkel mért adatok összehasonlítása.

A kapott eredmények kiértékelése kapcsán az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. A kiméra mRNS hígulása gyorsabb.

Azon esetekben, amikor a DNS és RNS adatok között legalább 1 log különbség mutatkozott, mindig az utóbbi bizonyult alacsonyabbnak. Ez a vizsgálatok jelentős részében, kb. negyedében volt jelen. Emellett a betegek szignifikánsan nagyobb része hamarabb elérte a 10^{-4} szint alatti MRD kategóriát RNS alapú módszerrel. Ezek az eredmények nem meglepőek, mivel az RNS szint változása nem mindig mutatja a tumortömeg változását, hanem a mintában lévő kiméra mRNS számára utal, vagyis sokkal inkább a sejtek aktivitását jellemzi. A kiméra expressziós rátát pedig számos helyi és szisztémás környezeti faktor befolyásolja, így például változhat a terápia hatására, de a teljes kiméra gén nyugvó állapota is ismert. Az adatok nem mondanak ellent azoknak a megfigyeléseknek sem, melyek szerint az RQ-RT-PCR-rel mért kiméra mRNS szint növekedés előre jelezhet egy relapszust vagy blastos krízist.

Összefoglalva tehát, RNS alapú módszerrel gyorsabb hígulást detektáltunk, mint DNS alapú módszerrel, így RQ-PCR-rel sokkal megbízhatóbban követhető a tumor mennyiség csökkenése, ugyanakkor az RQ-RT-PCR a tumorsejtek aktivitásáról szolgáltat értékes információkat.

2. A betegek egy részénél 10^{-3} feletti reziduális betegséget detektáltunk SFM módszerrel.

Vizsgálataink során a legmeglepőbb eredményünk az volt, hogy a betegek több mint egyharmadában 10^{-3} -nál magasabb tumor reziduumot találtunk a megfigyelési periódus végén, vagyis CD10 és *ETV6/RUNX1* pozitív sejteket tudtunk azonosítani SFM módszerrel. Ezek messze meghaladták mind a DNS, mind az RNS mérések érzékenységi küszöbét. Nem gondoljuk, hogy technikai hibáról lenne szó, mivel az SFM módszert pontosan beállítottuk, a mérések reprodukálhatók voltak és a mért értékek valóban meghaladták a módszer fals pozitivitási rátáját (0,0003). Ugyanezen okból kizárható, hogy a normál, reaktív CD10+ haematogónokat detektáltuk volna, noha ismert, hogy ezek száma szignifikánsan megnő a poszt-kemoterápiás periódusban. Az SFM és az RNS adatok közti nagy különbséget magyarázhatjuk az 1. pontban leírtakkal. Ugyanakkor mivel a klonális DNS marker vizsgálatával és a kombinált immunfluoreszcens/FISH módszerrel is sejt alapon történik a tumorreziduum azonosítása, az ezen módszerekkel kapott adatok közötti szignifikáns különbség további figyelmet érdemel.

A később *ETV6/RUNX1* pozitív leukaemiás gyerekek köldökzsínórból származó vérmintáinak retrospektív analízise során azt találták, hogy a t(12;21) transzlokáció az egyik allélon a betegek 77%-ában már születéskor jelen volt. Ezek a sejtek a lymphoid őssejt és a pro-B-sejt kompartmentben rejtőzködnek, germline immunglobulin gént hordoznak és a fúziós gén nyugalmában van, hasonlóan a Ph⁺ progenitorokhoz. Leukaemia akkor alakul ki, ha ebben a régióban bekövetkezik a heterozigótaság elvesztése (LOH), amit típusos esetben a betegség kezdetekor detektálunk.

Azt gondoljuk, hogy SFM-mel, főként m5 időpontban, ezeket az ősi, preleukaemiás sejteket detektáltuk és nem az eredeti tumor sejteket. A preleukaemiás sejtek a fent említett okok miatt nem mutathatók ki sem RQ-PCR, sem RQ-RT-PCR-rel. A FISH jelmintázat alapján bizonyítani tudtuk, hogy az SFM módszerrel észlelt, dupla CD10-iFISH pozitív sejtek valóban leukaemia prekursor sejtek és nem reziduális tumorsejtek voltak. Az érintett betegek kezeletlen mintáiban komplex citogenetikai eltérések voltak jelen, a transzlokáció mellett a normál *ETV6* delécióját, a fúziós gén duplikációját, illetve ezek kombinációját láttuk. Ezzel szemben a d33 utáni követéses mintákban a CD10⁺ sejtekben csak 1 fúzió és a megtartott *ETV6* ill. *RUNX1* allélok voltak jelen, mely nem leukaemiás, hanem leukaemia prekursor sejtre utal.

A köldökzsínórvér vizsgálatokon kívül az ilyen preleukaemiás klónok létezését bizonyítják azok a tanulmányok is, melyek szerint relapszusos *ETV6/RUNX1*+ pALL-ben az eredeti t(12;21)(p13;q22) töréspontú fúzió van jelen, de teljesen más fenotípust, antigén receptor génátrendeződéseket és/vagy karyotípust mutatnak. Valószínű, hogy ezekből a preleukaemiás sejtekből ered az ebben a csoportban típusosan későn jelentkező relapszus, mint hogy egy valódi reziduumból alakulna ki.

Az egyik beteg, akinél 24 hónappal a betegség kezdete után relapszus alakult ki, azon 5 páciens közé esett, akiknél SFM-mel kimutattuk a CD10 és *ETV6/RUNX1* pozitív feltehetően ősi sejteket. Ezzel szemben a másik betegnél, akinél csak meningealis relapszus jelentkezett és csontvelő érintettsége nem volt, feltehetően helyi reziduumból indult ki a relapszus, ennek megfelelően nála nem volt detektálható MRD érték m5 időpontban. Ez is alátámasztja az SFM eredmények fontosságát.

Összefoglalva tehát egyedül a kombinált *in situ* immun- és genotípust vizsgáló SFM módszerrel azonosíthatók a CD10 és t(12;21) pozitív, de germline antigén receptor gént hordozó ancestor preleukaemiás sejtek, melyek a betegek közel 1/3-ában kimutathatók voltak a poszt-indukciós periódusban. Ezekből a sejtekből indulhat ki egy esetleges késői relapszus.

3. Eltérő biológiai viselkedésű leukaemiás szubklónok kimutatása az egyik betegnél.

Egy betegnél az IGH gén variábilis régiójának vizsgálata során több leukaemiás szubklónt sikerült azonosítani. A VDJ régiók szekvenálása megerősítette a három különböző szubklón jelenlétét. Ezek egyike sem lappangó “háttérklón” volt, hanem a betegség kezdetekor azonos mennyiségben voltak jelen. Kettő ezek közül hasonlóan viselkedett és szignifikánsan kisebb tumorhígulást mutattak az indukciós periódus alatt, mint a harmadik. Ez az eset rámutat arra, hogy ugyanarra a terápiára más-más választ kaphatunk a klonális heterogenitás miatt.

Összefoglalva, a DNS alapú módszerrel azonosított több szubklón eltérő érzékenységgel reagálhat a terápiára, ezért az antigén receptor génátrendeződések és a terápiára adott válasz összefüggései további vizsgálatokat igényelnek.

6. Az új eredmények összefoglalása

1. Az *ETV6/RUNX1* pozitív gyermekkori pre-B-ALL-ben a minimális reziduális betegség (MRD) meghatározására az RNS alapú RQ-RT-PCR és a DNS alapú RQ-PCR mellett kidolgoztunk egy kombinált immunfenotípus-iFISH pásztázó fluoreszcens mikroszkópos (SFM) eljárást, mely a CD10 (immunfluoreszcencia) és t(12;21) transzlokáció (iFISH) konszekutív 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 döntéshozatal szempontjából általánosan elfogadott 10^{-3} szintnél alacsonyabb gyakoriság esetén is 100%-os biztonsággal azonosíthatók voltak.

2. Elsőként hasonlítottuk össze a DNS és RNS alapú valós idejű PCR technikával elvégzett minimális reziduális betegség vizsgálatokat a sejt alapú pásztázó fluoreszcens mikroszkópos módszerrel mért eredményekkel.

3. Az *ETV6/RUNX1*+ pre-B pALL betegek klinikai MRD vizsgálata során a kezelés 33. napjától a betegek csontvelő mintáiban 10^{-3} szintnél gyakoribb leukaemiás sejtek nem voltak kimutathatóak sem kvantitatív RNS, illetve DNS PCR, sem kombinált immunfenotípus-iFISH módszerekkel. Ugyanakkor a kezelés 33. napjától a betegek 36%-ában mutattunk ki SFM módszerrel $10^{-3} - 10^{-2}$ szintnél gyakoribb CD10+/t(12;21)+ sejteket. Ezek

azonban csak monoallélikus aberrációt mutattak, a 10^{-5} , 10^{-6} érzékenységű RNS alapú RQ-RT-PCR, valamint a DNS alapú klónspecifikus RQ-PCR eljárásokkal nem voltak detektálhatóak, ezért nem leukaemiás reziduális sejtek, hanem csontvelői leukaemia prekursor sejtek voltak.

4. Első alkalommal mutattunk ki és vizualizáltunk kezelt t(12;21)+ pre-B pALL betegekben *in utero* keletkező leukaemia prekursor sejteket a csontvelőben, melyek csak az új eljárásként kidolgozott kombinált immunfenotípus-iFISH eljárással voltak detektálhatóak. A prekursor sejtek jelenléte a kezelt betegekben összefüggést mutat a recidíva hajlammal, ezért ezek vizsgálata prediktív a betegség lefolyását illetően.

5. Az egyik betegnél a DNS alapú RQ-PCR módszerrel azonosított immunglobulin nehézlánc szubklónok eltérő hígulását láttuk a követés során, a szubklónok más-más érzékenységgel reagáltak a terápiára. Az antigén receptor génátrendeződések és a terápiára adott válasz összefüggései további vizsgálatokat igényelnek.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Pajor Lászlónak, aki a tudományos munkám során mindvégig támogatott, megismertette velem a tudományos kutatómunka minden egyes fázisát, válaszolt, kérdezett, ösztönzött, segített, biztatott, mikor mire volt szükségem.

Hálásan köszönöm Dr. Kajtár Bélának és egykori PhD társamnak, Dr. Alpár Donátnak a tudományos beszélgetéseket, vitákat, építő kritikákat, technikai segítséget. Nélkülük ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönet illeti a Patológiai Intézet összes munkatársát, különösen Lacza Ágneszt, aki megismertette és megszerettette velem a molekuláris biológia, azon belül is a PCR csodálatos világát, Rozsnyai Blankát és Kiss Robertát a PCR reakciók elvégzése során nyújtott segítségért és a jó hangulatú laborlégkör megteremtéséért, Kneif Józsefnét a citogenetikai vizsgálatok terén nyújtott segítségért, Dr. Jáksó Pált a flow citometriai mérésekért.

Köszönöm Dr. Lóránd Tamásnak (Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet), hogy tudományos diákkörös hallgatóként türelemmel és szeretettel foglalkozott velem. Nála nyerhettem először bepillantást az igazi kutatómunkába.

Végül szeretnék köszönetet mondani családomnak a sok éves támogatásért, különösen férjemnek a türelemért, megértésért és biztatásért, melyek nélkül e disszertáció elkészítése nem lett volna lehetséges. Köszönet Takács Tímeának, amiért mindig számíthattam rá és gyermekeimnek, Bálintnak, Benedeknek és Dominiknak, amiért soha nem hagyták, hogy elfelejtsem, mi is a legfontosabb az életben.

9. A disszertáció alapját képező kutatás és az ahhoz kapcsolódó publikációk

Eredeti közlemények:

1. **László R**, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Ottófy 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(1):158-60. IF: 1,948
2. 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(1):23-30. IF: 1,559

Idézhető absztrakt:

1. **László R**, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Pajor L. Sejt, gén és expresszió alapú technikák alkalmazása a minimális reziduális betegség nyomonkövetésére. *Hematológia-Transzfuziológia*. 2006, 1. Suppl., 39:35.

Előadások:

1. **László R**, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Pajor L. Sejt, gén és expresszió alapú technikák alkalmazása a minimális reziduális betegség nyomonkövetésére. Malignus Lymphoma Konferencia. Győr, 2006. ápr. 6-8.
2. **László R**, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. Acut lymphoblastos leukaemiás gyermekek monitorizálása különböző vizsgálati módszerekkel. VII. PhD Tudományos Napok. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2005. ápr. 14-15.
3. **László R**, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. A minimális reziduális betegség DNS, RNS és sejt alapú komplex analízise gyermekkori acut lymphoblastos leukemiában. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov. 11-13.
4. **R László**, D Alpár, B Kajtár, Á Lacza, P Jáksó, L Pajor. DNA, expression and cell based complex analysis of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. XII. Meeting of the European Association for Haematopathology. Thessaloniki, Görögország, 2004. szept. 26-okt. 1.

5. **László R.** Klónspecifikus génátrendeződés vizsgálatok a Magyar Gyermekonkológiai Munkacsoport acut lymphoblastos leukaemia beteganyagán. Pécsi Akadémiai Bizottság Sejtbiológiai Munkabizottságának Doktorandusz Szimpóziuma II. Pécs, 2003. jan. 8.

Egyéb publikációk – eredeti közlemények:

1. **László R,** Degrell P, Kellermayer M, Bollmann D, Egyed M, Seres L, Pajor L. Crystal-storing histiocytosis associated with only one of two consecutive, but genetically unrelated B-cell lymphomas. *Pathol Res Pract.* 2009, 205(4):273-8. IF: 1,219.
2. 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, 73(7):651-7. IF: 3,259.
2. Pajor L, Kajtár B, Jáksó P, Lacza Á, **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 lymphomas. *Histopathology.* 2006, 49(5):553-7. IF: 3,216.
3. Lóránd T, Kocsis B, Sohár P, Nagy G, József P, Kispál G, **László R,** Prókai L. Synthesis and antibacterial activity of fused Mannich ketones. *Eur J Med Chem.* 2002, 37(10):803-12. IF: 1,705.

Egyéb publikációk – idézhető absztraktok:

1. Kajtár B, Alpár D, Tóth J, **László R,** Jáksó P, Kereskai L, Nagy Z, Pajor L. Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Blood review.* 2007, 1. Suppl., 21:78. IF: 5,922.
2. Kajtár B, Tóth J, Alpár D, Jáksó P, Kereskai L, **László R,** Nagy Z, Pajor L. Simultaneous appearance of +8 in Ph+ and Ph- cells during imatinib treatment of CML: a report of two cases. *Blood review.* 2007, 1. Suppl., 21:123. IF: 5,922.
3. Alpár D, Kajtár B, Tóth J, Nagy Z, Jáksó P, **László R,** Kereskai L, Pajor L. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffin-embedded tissue sections. *Blood review.* 2007, 1. Suppl., 21:124. IF: 5,922.
4. Kereskai L, Jáksó P, **László R,** Kálmán E, Pajor L. A malignus lymphomák aspirációs citológiai diagnosztikájának lehetőségei. *Hematológia-Transzfuziológia.* 2006, 1. Suppl., 39:26.

Impakt faktor összesen, idézhető absztraktok nélkül: 12,906

Idézhető absztraktok impakt faktora: 17,766