

Doktori (Ph.D.) értekezés

**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.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1. Az akut lymphoblastos leukaemia története	6
1.2. A gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia (pALL) klinikopathológiája	7
1.2.1. Tünetek	8
1.2.2. Diagnózis	8
1.2.3. Citokémia	10
1.2.4. Immunfenotípus	10
1.2.5. Molekuláris biológiai módszerek	10
1.3. A gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia klasszifikációja	11
1.4. Terápia	21
1.5. Prognózis	23
1.5.1. Életkor	23
1.5.2. Fehérvérsejtszám	23
1.5.3. Immunfenotípus	23
1.5.4. Ploiditás	24
1.6. Minimális reziduális betegség (MRD)	24
1.6.1. Flow citometria (FCM)	25
1.6.2. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM)	26
1.6.3. DNS alapú valós idejű PCR	26
1.6.4. RNS alapú valós idejű RT-PCR	27
2. Célkitűzések	28
3. Anyagok és módszerek	29
3.1. Minták	29
3.2. DNS és RNS extrakció	29
3.3. t(12;21) RT-PCR	30
3.4. t(12;21) RQ-RT-PCR	30
3.5. IGH, IGK-Kde és TCRD PCR	30
3.6. IGH, IGK-Kde és TCRD RQ-PCR	36

3.7. Immuncitokémiai preparátumok	38
3.8. Pásztázó Fluoreszcens Mikroszkópia (SFM)	39
3.9. Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció (iFISH)	40
4. Eredmények.....	42
4.1. Minták	42
4.2. Az RQ-PCR és RQ-RT-PCR adatok összehasonlítása.....	45
4.3. RQ-PCR, RQ-RT-PCR és SFM adatok összehasonlítása	47
4.4. Több klónnal rendelkező beteg vizsgálata	50
5. Diskusszió.....	52
6. Az új eredmények összefoglalása.....	57
7. Köszönetnyilvánítás	59
8. Irodalomjegyzék.....	60
9. A disszertáció alapját képező kutatás és az ahhoz kapcsolódó publikációk.....	79
10. Egyéb publikációk.....	81

Rövidítések jegyzéke

ABL	Abelson murine leukaemia
ALL	acut lymphoblastos leukaemia
B-ALL	B-sejtvonal eredetű ALL
BCR	breakpoint cluster region
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
c-ALL	common acut lymphoblastos leukaemia
CBF	core binding factor
cDNS	komplementer DNS
CML	chronicus myeloid leukaemia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DI	DNS-index
DNS	dezoxi-ribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát
EFS	eseménymentes túlélés (event free survival)
ES	extraszignál
ETV6	ETS variant gén (rég neve TEL)
FAB	French-American-British
FCM	flow citometria
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluoreszcein izotiocianát
G6PDH	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
HLH	helix-loop-helix
I-BFM	nemzetközi BFM (international BFM)
iFISH	interfázis FISH (FISH on interphase nucleus)
IG	immunglobulin
IGH	immunglobulin nehézlánc (immunoglobulin heavy chain)
IGK	immunglobulin κ könnyűlánc (immunoglobulin kappa light chain)
IL3	interleukin 3
Kde	kappa deletáló elem
KIR	központi idegrendszer
LSC	lymphoid őssejt (lymphoid stem cell)

LOH	heterozigótaság elvesztése (loss of heterozygosity)
MLL	mixed-lineage leukaemia
MN	modális szám (modal number)
MNC	mononuclearis sejt (mononuclear cell)
MRD	minimális reziduális betegség (minimal residual disease)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
NK-sejt	természetes ölósejtek (natural killer cell)
NOS	máskülönben nem részletezett (not otherwise specified)
pALL	gyerekkori acut lymphoblastos leukaemia (pediatric ALL)
PAS	perjódsvav-Schiff (periodic acid-Schiff)
PB	perifériás vér (periferial blood)
PBS	Phosphate-buffered saline
PBX1	Pre-B-cell leukemia homebox 1
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
Ph	Philadelphia-kromoszóma
PGR	jó prednizolon válasz (prednisone good response)
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
RHD	Runt homology domain
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 (régi nevén AML1)
SFM	pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (scanning fluorescence microscopy)
TAD	transzkripció aktivációs domain
T-ALL	T-sejtvonal eredetű ALL
TCF3	transcription factor 3
TCR	T-sejt receptor (T-cell receptor)
TCRD	T-sejt receptor delta
TdT	terminális dezoxinukleotidil transzferáz
Tm	olvadási hőmérséklet (melting point)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1. Bevezetés

1.1. Az akut lymphoblastos leukaemia (ALL) története

Az első dokumentált leukaemiás eset Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau nevéhez köthető [1]. A francia anatómus-sebész 1827-ben egy 63 éves beteg esetét mutatta be, aki láz, általános gyengeség tüneteivel jelentkezett. Az autopszia során extrém fokú lépmeagnagyobbodást és sűrű, „kásaszerű”, gennyhez hasonló vért láttak. A leukaemia kifejezés a nagy német pathológustól, Rudolf Virchowtól származik, aki 1845-ben egy valószínűleg chronicus myeloid leukaemiában (CML) szenvedő beteg vérmintájában igen nagy számban figyelt meg fehérvérsejteket. Virchow leukaemiának nevezte el a betegséget a görög *leukos*, vagyis fehér és a *haima*, azaz vér szavakból [2]. Az első akut lymphoblastos leukaemiás gyermekről Michael Anton Biermer, Virchow egyik tanítványa számolt be 1860-ban: egy 5 éves kislánynál az első tünetek megjelenésétől a diagnózison át a beteg haláláig kevesebb, mint három nap telt el [3]. Néhány évvel később Franz Ernst Christian Neumann egy leukaemiás beteg boncolása során tett megfigyeléseiből arra a következtetésre jutott, hogy a vérben látott abnormális sejtek a csontvelőből származtak [4]. Újabb fontos mérföldkő volt a betegség történetében, amikor az 1870-es években Paul Ehrlichnek köszönhetően ismertté vált a vérkenetek megfestésének technikája, ezzel lehetővé téve a sejtek pontosabb vizsgálatát, a normális és abnormális fehérvérsejtek elkülönítését [5]. Wilhelm Ebstein 1889-ben bevezette az akut leukaemia elnevezést, hogy a gyorsan progrediáló betegséget megkülönböztesse a chronicus lefolyású esetektől [6]. Otto Naegeli 1900-ban a leukaemiákat lymphoid és myeloid csoportokra osztotta [7].

Bár a betegségről ekkor már sok minden ismert volt, az ALL kezelésében valódi terápiás sikerekre még évtizedeket kellett várni. 1948-ban Farber és munkatársai számoltak be az aminopterin hatására elért átmeneti remisszióról ALL-s gyermekeknél [8]. A következő években további citosztatikumokat vezettek be az ALL terápiájában, [9, 10], de igazán áttörő sikert a kombinált kezelések hoztak [11, 12]. Ugyanakkor a tartós remissziónak tűnő esetek többségében a betegség súlyos fellángolása következett be vagy meningealis relapszus alakult ki, ezért további kutatások folytak. Az 1962-ben Memphisben megalapított St. Jude Children Research

Hospital-ban Donald Pinkel vezetésével a „totális terápiának” nevezett kezelések hatásosságát tanulmányozták. A gyógyszeres terápiát a központi idegrendszer (KIR) besugárzásával vagy intrathecalis gyógyszer adásával egészítették ki és igen kedvező eredményekről számoltak be [13-15]. 1975-ben Németországban Hansjörg Riehm Berlinben (B), Bernhard Kornhuber Frankfurtban (F) és Günther Schellong Münsterben (M) megkezdte az első multicentrikus vizsgálatokat, létrehozva ezzel a BFM munkacsoportot [www.bfm-international.org]. 1987-ben megalakult a nemzetközi BFM-csoport (I-BFM) Németország, Ausztria, Franciaország, Belgium, Olaszország és Hollandia kezdeményezésére, hogy a nemzeti kezelési stratégiákat összehasonlítsák és közös kezelési standardokat hozzanak létre. Az azóta eltelt évtizedekben egyre növekvő számban alakultak meg a nemzeti munkacsoportok és csatlakoztak a nemzetközi BFM csoporthoz, hogy együttműködve tovább tökéletesítsék a leukaemia kezelését. Jelenleg már több mint 34 ország tagja az I-BFM-nek, köztük Magyarország is.

1.2. A gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia (pALL) klinikopathológiája

Az acut lymphoblastos leukaemia a leggyakoribb malignus betegség gyermekkorban [16]. A betegség előfordulása 2 és 5 éves kor között a legmagasabb, incidenciája Magyarországon 30-35/1.000.000 gyermek [17, 18]. Az ALL kissé gyakoribb fiúkban (fiú:lány=1,3:1). A betegség előfordulásában földrajzi eltérések is megfigyelhetők, magasabb az incidencia például Spanyolországban és Latin-Amerikában, mely feltehetően szocioökonómiai és etnikai különbségekkel magyarázható.

Bár az ALL etiológiája ismeretlen, a leukaemiás transzformáció valószínűleg különböző behatások összegződésének következménye (genetikai tényezők, fizikai vagy kémiai hatásra bekövetkező kromoszóma-károsodás, környezeti tényezők stb.). A betegség konkordanciája egypetűjű ikrek esetén 10-15%, míg csecsemőkori ALL esetén közel 100% [19, 20]. Leukaemiás beteg testvérének négyszer nagyobb esélye van a betegség kialakulására, mint az átlag populációnak [21]. Az örökletes genetikai rendellenességek közül a Down-kór, illetve az ataxia teleangiectasia hajlamosítanak ALL kialakulására, előbbi a gyerekkori ALL esetek közel 2%-ában van jelen [22, 23].

A környezeti tényezők közül a radioaktív sugárzás leukaemogén hatása bizonyított *in utero* expozíció, terápiás besugárzás és atomkatasztrófák esetén is [24-26]. Az infekciós ágensek leukaemogén hatását eddig nem sikerült egyértelműen kimutatni, bár az ALL magasabb előfordulása a jobb szociális és higiéniai körülmények között élő gyerekeknél támogatja ezt a hipotézist [27].

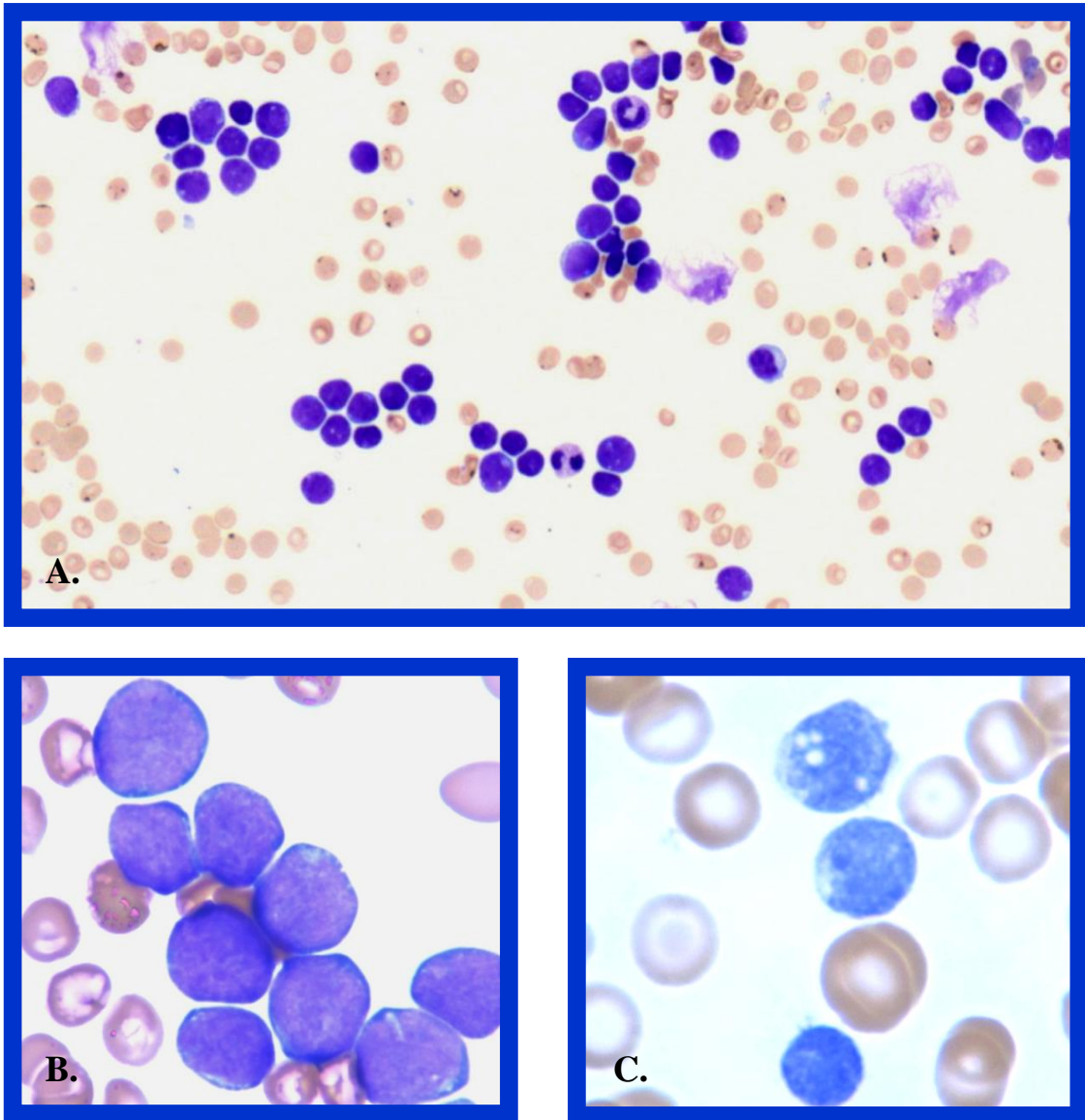
1.2.1. Tünetek

A betegség tünetei a leukaemiás klón csontvelői expansziójára és a normál haemopoiesis károsodására, valamint a nem haemopoietikus szövetek leukaemiás infiltrációjára vezethetők vissza [16]. A betegek általában rövid ideje tartó fáradékonyságról, spontán bőr- és nyálkahártya vérzésekről számolnak be. Gyakori a rossz közérzet, lethargia, fogyás, sápadtság, makacs fertőzések, láz és éjszakai izzadás. Előfordulhat csont és ízületi fájdalom, ritkán a betegség aszimmetrikus arthritis, enyhe hátfájdalom, diffúz osteopenia vagy lítikus csontléziók képében jelentkeznek. A betegek kb. 80%-ánál figyelhető meg lymphadenopathia; hepatomegalia és/vagy splenomegalia az esetek 75%-ában van jelen. Más szervek is érintettek lehetnek, mint például a vesék, a tüdők, a szív, a szemek vagy a gastrointestinalis tractus. A bőr infiltrációja ritka és általában pre-B-sejtes ALL esetén figyelhető meg. A KIR érintettsége a gyerekek kb. 5%-ában van jelen a diagnózis idején, de gyakran tünetmentes. Testicularis infiltráció a betegek 1%-ánál figyelhető meg a diagnózis felállításakor, de rejtett formában akár 25%-uknál is jelen lehet [28].

1.2.2. Diagnózis

A fizikális vizsgálat során feltűnő a sápadtság, a generalizált lymphadenopathia, a hepatosplenomegalia és a thrombocytopenia miatt kialakuló gingivális vérzések, epistaxis, petechiák, ecchymosis. A diagnózis idején a fehérvérsejtszám a betegek 50-60%-ában magasabb, mint $10 \times 10^9/L$, sőt 10%-ukban magasabb, mint $100 \times 10^9/L$. A csontvelőben az esetek többségében jellemző a hypercellularitás, de előfordulhat hypocellularitás is [29]. A normocytás, normochrom anaemia és a reticulocytopenia szinte általános jelenség.

A pontos diagnózis felállításához és a betegség klasszifikációjához fontos a csontvelőben és a vérben lévő lymphoblastok morfológiai és immunfenotípusos jellemzőinek meghatározása (1. ábra).



1. ábra. Acut lymphoblastos leukaemiás beteg csontvelő aspirátumának kenete.

A. A kis nagyítású képen feltűnő, hogy kiértő haemopoieticus aktivitás helyett lymphoid sejtek figyelhetők meg, csupán egy-egy granulocytá van jelen (Giemsa-festés). **B.** A nagyobb nagyítású képen lymphoblastok láthatók, a sejtmagok nagy méretűek, a kromatin éretlen szerkezetű, a kevés citoplazma sötétkék festődést mutat (Giemsa-festés). **C.** A képen látható lymphoblastok és a legalul lévő lymphocytá myeloperoxidáz citokémiai reakcióval nem mutatnak pozitívást.

1.2.3. Citokémia

A terminális dezoxinukleotidil transzferáz (TdT) pozitívitas az ALL-es esetek több mint 95%-ában jelen van [30]. Ugyanakkor a TdT pozitívitas nem specifikus ALL-re, az akut myeloid leukaemiás betegek kb. 10%-ában szintén megfigyelhető [31]. A perjódsvav-Schiff (PAS) reakcióval az esetek 40-70%-a mutat pozitívítást [16]. A normál lymphocytákban és a megakaryocytákban diszkrét granulumokat, a monocytákban és a granulocytákban diffúz pozitívítást látunk, míg ALL-ben a blokk pozitívitas jellemző. Savanyú foszfatáz reakcióval a T-sejtvonal eredetű ALL-ek (T-ALL) 90%-a, míg a B-sejtvonal eredetű ALL-ek (B-ALL) 2%-a mutat pozitívítást, így lehetséges a T- és non-T sejtes ALL-ek elkülönítése [32]. A lymphoblastok jellemzően myeloperoxidáz (1. ábra), Szudán fekete B és kloroacetát-észteráz negatívak, míg esetenként nem specifikus észterázal gyengén pozitívak. A citokémiai vizsgálatok az immunfenotipizálás és a molekuláris módszerek széleskörű elterjedése óta háttérbe szorultak.

1.2.4. Immunfenotípus

Az immunfenotípus vizsgálata megerősíti a morfológiai diagnózist, egyben segítséget nyújt a differenciál diagnózishoz és a betegség további klasszifikációjához. Az immunfenotípus vizsgálatok többségét flow citometriával végzik felszíni vagy citoplazmatikus markereket használva vér vagy csontvelő aspirátumokon. A diagnóziskor azonosított specifikus immunfenotípus hasznos lehet a reziduális betegség flow citometriás követéséhez.

A szövettani metszetek immunhisztokémiai vizsgálatának különösen akkor van jelentősége, ha alacsony a perifériás blastszám, ha a csontvelőmintá mennyisége nem elegendő a flow citometriás vizsgálathoz, vagy ha a diagnózist extramedulláris mintából kell felállítani.

1.2.5. Molekuláris biológiai módszerek

A polimeráz láncreakció (PCR) érzékeny és gyors módszer a klonális géntrendeződések detektálására [33]. A módszer az immunglobulin (IG) és a

T-sejt receptor (TCR) gének variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsolódási (J–joining) régiójának vizsgálatán alapul: a normál sejtekre jellemző sokféle, vagyis poliklonális génátrendeződésekhez képest a daganatos, vagyis ugyanazon sejtvonalból származó sejtekben azonos génátrendeződés van jelen, melyet klonális génátrendeződés formájában ki lehet mutatni. Az eredmények értékelése során figyelembe kell venni, hogy a T-ALL esetek kb. 10-20%-a mutat klonális IG génátrendeződést [34, 35]. A B-ALL esetek közel 80%-ban hordoznak TCR- δ (TCRD), kb. 50%-ban TCR- γ , 46%-ban TCR- α és 30%-ban TCR- β génátrendeződéseket [36, 37]. A fúziós gén transzlokációk reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) után vizsgálhatók. Kvantitatív PCR segítségével a prognózist befolyásoló minimális reziduális betegség meghatározására van lehetőség.

1.3. A gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia klasszifikációja

Az acut lymphoblastos leukaemia heterogén betegségcsoport, melyet fontos további alcsoportokra osztani a különböző klinikai jellemzők és eltérő prognosztikai faktorok miatt. A jelenleg elfogadott csoportosítás az immunfenotípus, illetve a genotípus vizsgálatán alapszik, a korábban alkalmazott citomorfológiai klasszifikációt ma már nem használják.

A WHO által 2001-ben megjelentetett vérképzőszervi és lymphoid szövetek tumorainak osztályozása (*Classification of Tumors of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues*) első alkalommal egyesítette a genotípusra vonatkozó ismereteket a klinikai, morfológiai, citokémiai és immunfenotípusra vonatkozó információkkal, létrehozva ezzel egy egységes, a diagnózis felállításához valódi segítséget nyújtó klasszifikációt [38]. Ugyanakkor a betegségek genetikai és biológiai hátterének egyre pontosabb feltérképezése miatt szükségessé vált az osztályozás felülvizsgálata. A 2008-as revízió során beépítették az új tudományos és klinikai ismereteket, ezzel is finomítva a diagnosztikus kritériumokat, valamint újonnan felfedezett entitásokat vezettek be. A 2008-as WHO osztályozás az acut kórképeken belül myeloid, bizonytalan sejtvonal eredetű, és a prekursor lymphoid vonalon belül B- és T-sejtes leukaemiákat/lymphomákat különít (1. táblázat) [39]. Leukaemia esetén a csontvelőben a blastok aránya legalább 25%, míg lymphoma esetén nyirokcsomó

vagy extranodalis érintettség van jelen legfeljebb minimális csontvelő érintettség mellett.

Acut myeloid leukaemia és társuló neoplasmák

Bizonytalan sejtvonal eredetű acut leukaemiák

Differenciálatlan acut leukaemia

Kevert fenotípusú acut leukaemia t(9;22)(q34;q11.2) *BCR-ABL1*

Kevert fenotípusú acut leukaemia t(v;11q23); átrendeződött *MLL*

Kevert fenotípusú acut leukaemia, B-myeloid, NOS

Kevert fenotípusú acut leukaemia, T-myeloid, NOS

Provizórikus entitás: NK-sejtes lymphoblastos leukaemia/lymphoma

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma, NOS

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma ismétlődő genetikai rendellenességekkel

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma t(9;22)(q34;q11.2) *BCR-ABL1*

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma t(v;11q23); átrendeződött *MLL*

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma hyperdiploiditással

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma hypodiploiditással

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma t(5;14)(q31;q32) *IL3-IGH*

B lymphoblastos leukaemia/lymphoma t(1;19)(q23;p13.3) *TCF3-PBX1*

T lymphoblastos leukaemia/lymphoma

1. táblázat. Az acut leukaemiák 2008-as WHO klasszifikációja.

NOS – not otherwise specified, NK – natural killer.

Az immunfenotípus vizsgálata a leukaemiás sejtek felszínén vagy citoplazmájában expresszált antigének kimutatásán alapszik [40, 41]. A normál lymphocyták az érési sornak megfelelően specifikus antigéneket expresszálnak. Ezzel szemben a lymphoblastok megrekednek a differenciáció egy fokán, így az általuk expresszált antigénekből következtetni lehet arra, hogy a differenciálódás mely szintjén történt a leukaemiás transzformáció [42, 43]. Az eredmények értékelése során figyelembe kell venni, hogy a gyerekkori ALL-ek kb. 10-20%-a myeloid marker, leggyakrabban CD13 és CD33 koexpressziót mutat [44, 45]. Emellett ún. aszinkron

antigénexpresszió is előfordulhat, amikor az érési sor különböző pontjain megjelenő antigének egyszerre mutathatók ki [46].

Az ALL-es esetek döntő többsége (~85%) B-sejt eredetű. A B-lymphoblastok differenciáltsági fokának megfelelően több típust különíthetünk el (2. táblázat) [38]. A lymphoblastok csaknem mindig pozitívak CD19, citoplazmatikus CD22 (cCD22) és citoplazmatikus CD79a (cCD79a) B-sejt markerekre, bár önmagában ezek egyike sem specifikus. A korai őssejt marker, a CD34 expressziója kb. 80%-ban látható, gyakran társul hozzá hyperdiploiditás, alacsony incidenciájú KIR érintettség és összességében kedvezőbb prognózisú betegséget jelez [47].

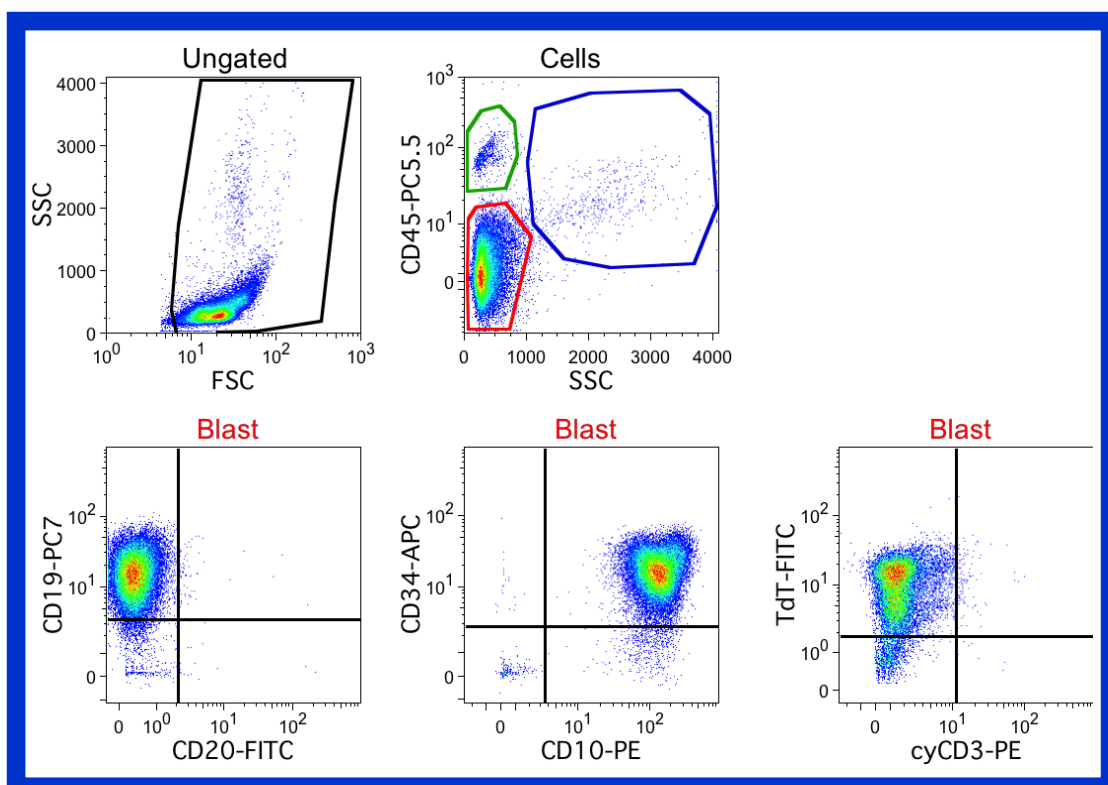
	LSC	Pro-B-ALL	c-ALL	Pre-B-ALL
CD34	+	+	+	+
CD19	-	+	+	+
cCD22	-	+	+	+
cCD79a	-	+	+	+
CD10	-	-	+	+
CD20	-	-	-	+
TdT	+	+	+	+
Ig gén	germline	germline	germline	átrendeződött
cIg	-	-	-	+
sIg	-	-	-	-

2. táblázat. A B-sejtes acut lymphoblastos leukaemia immunfenotípus alapján történő klasszifikációja a különböző markerek expressziója alapján.

LSC – lymphoid őssejt (lymphoid stem cell), cCD22 – citoplazmatikus CD22, cCD79a – citoplazmatikus CD79a, TdT – terminális dezoxinukleotidil transzferáz, cIg – citoplazmatikus immunglobulin, sIg – felszíni (surface) immunglobulin.

A legkorábbi stádiumban, az ún. korai prekursor B-ALL vagy pro-B-ALL esetén, a blastok CD19, cCD79a, cCD22 és nuclearis TdT pozitivitást mutatnak. A

következő differenciáltsági stádiumban a blastokra az előbbi markerek mellett a CD10 expresszió is jellemző. A gyerekkori esetek közel 70%-a ebbe a csoportba tartozik, ezt a típust common-ALL-nek (cALL) hívják (2. ábra). A legérettebb differenciáltsági fokban, az ún. pre-B-ALL esetén a blastok citoplazmatikus immunglobulin μ nehézláncot expresszálnak [48]. A betegek kb. 15-20%-a sorolható ebbe a csoportba.



2. ábra. Common-ALL-es gyermek csontvelő mintájának flow citometriás vizsgálata. A bal felső ábrán a fényszórási paraméterek alapján a törmelékek kizárása történik meg. A jobb felső ábrán az egyes populációk kapuzása látható, a pirossal bekeretezett sejtek a blastok, zölddel a lymphocytákat, késsel a myeloid elemeket jelöltük. Az alsó ábrák alapján a blastok CD19+, CD20-, CD10+, CD34+, TdT+, cCD3- fenotípussal rendelkeznek, vagyis egy common-ALL esettel állunk szemben. (A minta a PTE ÁOK Patológiai Intézet Flow citometriás laboratóriumának anyaga.)

A T-sejtes ALL az esetek kb. 10-15%-át képviseli [43]. A betegség az expresszált antigének alapján több csoportba osztható (3. táblázat) [38]. Az éretlen pro-T-ALL TdT, cCD3 és CD7 pozitivitás mellett CD2 és CD1a negativitással

jellemezhető. Pre-T-ALL esetén az előbbieken felül CD2 markerrel pozitivitást látunk, ugyanakkor mindkét típus CD4/CD8 kettős negatív. A közepes differenciáltságú típus a leggyakoribb, a corticalis T-ALL-re a cCD3, CD2, CD7, CD1a pozitívítás, valamint a CD4 és CD8 koexpresszió jellemző. Az érett medullaris T-ALL-t pan-T-sejt marker és vagy CD4 vagy CD8 pozitívítás, ugyanakkor CD1a negatívítás jellemzi.

	Pro-T-ALL	Pre-T-ALL	Corticalis T-ALL	Medullaris T-ALL
cCD3	+	+	+	+
CD7	+	+	+	+
CD2	-	+	+	+
CD1a	-	-	+	-
CD34	+/-	+/-	-	-
CD4/CD8	-/-	-/-	+/+	+/- vagy -/+

3. táblázat. A T-sejtes acut lymphoblastos leukaemia immunfenotípus alapján történő klasszifikációja a különböző markerek expressziója alapján.

cCD3 – citoplazmatikus CD3

A citogenetikai és molekuláris vizsgálatok során észlelt specifikus, jól azonosítható számbeli vagy strukturális kromoszóma rendellenességek elősegítik a diagnózist és jelentős prognosztikai szerepük is van [49-51].

t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*

A t(9;22) során a 9-es kromoszómán lévő *ABL1* protoonkogén fúzionál a 22-es kromoszómán lévő *BCR* génnel (Ph – Philadelphia-kromoszóma) [52]. Ha a töréspont a 22-es kromoszómán a *BCR* gén ún. 'major breakpoint cluster region'-jében (M-bcr) történik, a fúziós gén egy 210 kDa molekulásúlyú fehérjét kódol (p210^{BCR/ABL}), ez jellemző a CML-es betegeknél és a t(9;22) pozitív felnőttkori ALL 30-50%-ában. A Ph+ pozitív felnőtt ALL kb. 50%-ában, illetve a gyermeki ALL esetek döntő többségében a *BCR* töréspont az ún. 'minor breakpoint cluster region'-ban (m-bcr)

található és a fúziós gén egy 190 kDa molekulásúlyú fehérjét kódol (p190^{BCR/ABL}). Mindkét fehérje megnövekedett tirozin kináz aktivitással rendelkezik.

A Philadelphia-kromoszóma a gyerekkori ALL-ek kevesebb, mint 2-4%-ában fordul elő, a betegekre jellemző az idősebb életkor és a magas fehérvérsejtszám. A Ph+ B-ALL általában CD10, CD19 és TdT pozitív, valamint gyakoribb a myeloid-asszociált CD13 és CD33 markerek expressziója [38]. Ha kedvező klinikai jellemzőkkel (életkor, fehérvérsejtszám, terápiára adott válasz) társul, akkor valamivel jobb a prognózisa [53], amúgy a Ph- esetekkel összehasonlítva szignifikánsan alacsonyabb a komplett remissziós ráta (78% versus 96%), gyakoribb a terápia rezisztencia és a relapszus [54].

t(v;11q23) átrendeződött *MLL*

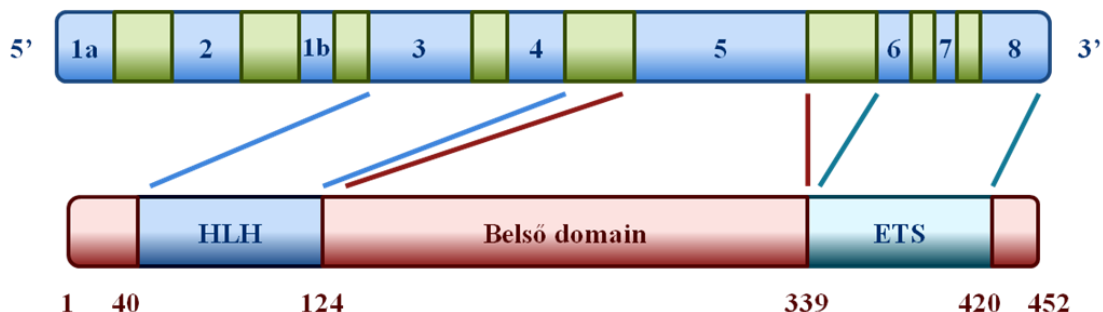
Az átrendeződés a 11q23 sávban lévő *MLL* gént és számos lehetséges fúziós partner gén közül egyet érint. Leggyakoribb ilyen gén az *AF4* a 4q21 kromoszóma régióban. A gyerekkori ALL-ek kb. 5%-ában figyelhető meg, míg csecsemőkori ALL esetén ez a leggyakoribb kromoszóma rendellenesség, az esetek 70%-ában van jelen [55]. Jellemző az átrendeződés létrejötte és az ALL kialakulása közötti rövid látencia. A transzlokáció feltehetően már *in utero* kialakul, amit a fiatal csecsemőkori magas incidencia mellett az is bizonyít, hogy a később leukaemiássá váló gyerekek Guthrie-kártyáinak vizsgálata során PCR-ral már a neonatalis vércseppben is kimutatható a fúziós gén jelenléte monoallélikusan [56, 57]. Klinikailag az *MLL* átrendeződések két évesnél fiatalabb korral, igen magas fehérvérsejt számmal, organomegaliával és KIR érintettséggel járnak. Típusosan, különösen a t(4;11) esetekre, a CD19+, a CD10- és CD24- pro-B-immunfenotípus, továbbá a CD15 pozitivitás jellemző [58, 59]. Rossz prognózissal jár, a transzlokációt hordozó csecsemők 3 éves eseménymentes túlélése (EFS) 13%, míg az erre a transzlokációra nézve negatív betegeké 67% [60].

t(12;21)(p13;q22) *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*

A t(12;21) aberrációt két különböző munkacsoport írta le egymástól függetlenül 1995-ben [61, 62]. A t(12;21) a 12-es kromoszómán lévő *TEL (ETV6)* és a 21-es kromoszómán lévő *AML1 (RUNX1/CBFA2)* géneket érinti.

Az *ETV6* (ETS variant 6) gént érintő kromoszóma transzlokációk számos haematológiai betegségben kimutathatók, eddig 30 partnergént írtak le [63]. Az *ETV6*

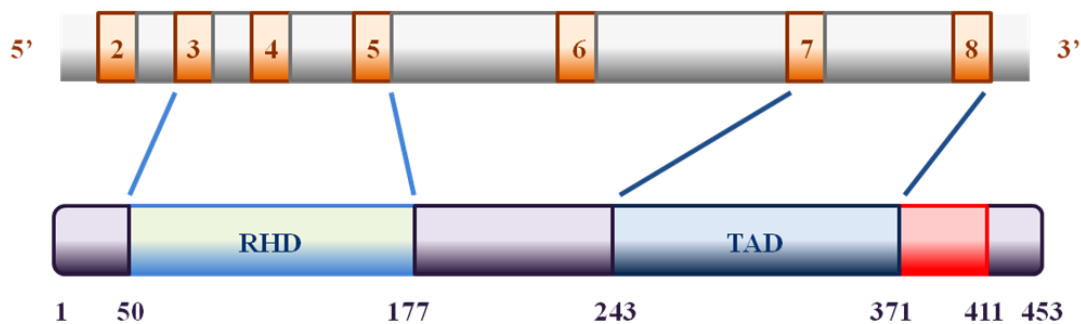
gén a 12-es kromoszóma rövidkarján a 12p13.1 régióban található, 8 exonból áll (3. ábra). Az általa kódolt 452 aminosavból felépülő fehérje 2 főbb domaint tartalmaz. A fehérje oligomerizációban és a transzkripció repressziójában szerepet játszó HLH (helix-loop-helix) domaint a 3-as és a 4-es exon, míg a szekvencia-specifikus DNS kötésért és a fehérje-fehérje interakcióért felelős ETS domaint a 6-8-as exonok kódolják. A kettő között az 5-ös exon által kódolt belső domain található, mely a HLH domainnel együtt szintén repressziós folyamatokban játszik szerepet. Az ETV6 fehérje az embrionális fejlődéshez, illetve a csontvelői haemopoiesis szabályozásához nélkülözhetetlen.



3. ábra. Az *ETV6* (*TEL*) gén és az általa kódolt fehérje.

HLH – helix-loop-helix domain, ETS – ETS domain

A *RUNX1* gén a 21-es kromoszóma hosszúkarján a 21q22.3 régióban található, 12 exonból áll (4. ábra) [64]. A *RUNX1* gén által kódolt 453 aminosavból álló fehérje a Runt-hoz kötött transzkripciós faktorok családjába tartozik, más néven AML1 (acut myeloid leukaemia 1) vagy CBFA2 (core binding factor alfa-2 alegység) proteinek is nevezik. A *RUNX1* fehérje legfontosabb domainjei a 3-5-ös exonok által kódolt RHD (Runt homology domain), a 7-es exon egy része és a 8-as által kódolt TAD (transzkripció aktivációs domain) és a transzkripció gátló domain. Az erősen konzervált szekvenciájú RHD a DNS kötésért és a CBF- β alegységgel való heterodimerizációért felelős, utóbbi a heterodimer komplex részeként a *RUNX1* DNS-kötő képességét erősíti. A *RUNX1* transzkripciós faktorként a haemopoieticus őssejtek differenciálódásának szabályozásában játszik szerepet [65], a protein a hozzá kapcsolódó faktoroktól függően aktivátorként és represszorként egyaránt funkcionálhat.



4. ábra. A *RUNX1* (*AML1*) gén és az általa kódolt fehérje.

RHD – Runt homology domain, TAD – transzkripció aktivációs domain.

A t(12;21)(p13;q22) transzlokáció során az *ETV6* 5' régiója (exon 1-5) fuzionál a *RUNX1* csaknem teljes kódoló régiójával [63]. A létrejövő kiméra gén tehát egyaránt tartalmazza az *ETV6* HLH és belső, valamint a *RUNX1* RHD és TAD domainjét. A transzlálódó fúziós proteinnek így megmarad a képessége, hogy kötődjön a *RUNX1* célszekvenciáihoz és represszorként hatva ezen gének deregulációját okozza, emellett a HLH-mediálta heterodimerizáció következtében a normál *ETV6* funkcióját is károsíthatja. Az esetek 70-80%-ában a nem átrendeződött *ETV6* allél deletálódik, melynek szintén szerepe lehet a leukemogenesis folyamatában.

Az *ETV6-RUNX1* transzlokáció létrejöttét korai lézióknak tartják a leukaemogenesis folyamatában, mivel neonatális vércseppek retrospektív tanulmányozása során a monoallélikus transzlokáció már kimutatható volt olyan gyerekeknél, akiknél évekkel később leukaemia alakult ki [66], ugyanakkor a transzlokáció szükséges, de nem elegendő a leukaemia kialakulásához.

A t(12;21) a leggyakoribb génátrendeződés ALL-es gyerekekben, kb. 25%-ban fordul elő [67]. A betegek többsége 1 és 12 év közötti, az életkori csúcs 2 és 5 év között van. A blastok CD19+ és CD10+, általában CD34+, emellett jellemző a CD9, CD20 és CD66c expresszió teljes vagy majdnem teljes hiánya [58, 68, 69]. Myeloid asszociált antigének, különösen a CD13 expressziója is gyakori. Jellemző a diagnóziskori alacsonyabb fehérvérsejtszám, emellett az esetek többsége nem hyperdiploid [52].

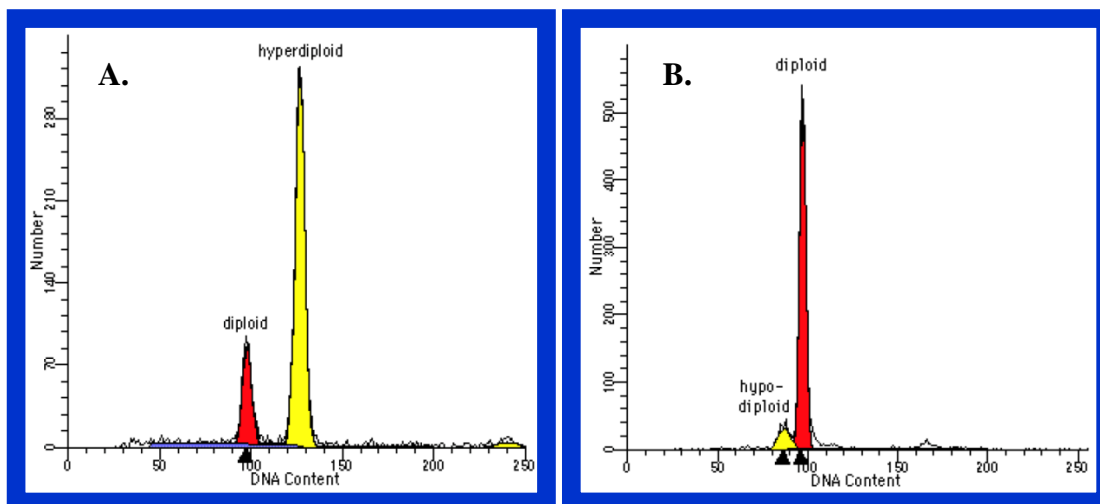
Számos tanulmány kedvező prognózisról számol be a transzlokációt hordozó gyerekeknél mind retrospektív, mind prospektív tanulmányokban, ugyanakkor a

jellemzően későn jelentkező relapszus ebben a betegcsoportban is kb. 20-25%-ban van jelen [70-76]. Mivel a transzlokáció korai lépcsőfok a leukaemogenesisben, feltételezik, hogy a késői relapszusok egy a transzlokációt hordozó perzisztáló preleukaemiás klónból erednek. Kedvezőtlen prognosztikai faktorok, mint például 10 évesnél idősebb életkor vagy magas fehérvérsejtszám jelenléte esetén rosszabb a kimenetel, bár még így is kedvezőbb, mint a transzlokációt nem hordozó esetekben. Ezeket az eltérő eredményeket csak további, nagy esetszámú, prospektív, hosszú követési idejű tanulmányok tudják majd feloldani.

Hyperdiploid B lymphoblastos leukaemia/lymphoma

Azokat a B-sejt eredetű leukaemiákat sorolják ebbe a csoportba, ahol a blastok 47 és 67 közötti modális számú (MN) kromoszómát tartalmaznak, típusos esetben strukturális eltérés nincs jelen (5. ábra) [38]. Ezen belül is elkülönítik az alacsony (MN = 47 – 50) és a magas hyperdiploid (MN = 51 – 67) alcsoportot, melyek közül az utóbbi a gyermekkori B-ALL esetek 25 - 30%-át teszi ki. Csecsemőknél nem fordul elő, gyerekeknél pedig előfordulása az életkor előrehaladtával csökken. A blastokra a CD19+ és CD10+ jellemző, emellett a legtöbb eset CD34+ és CD45- [58]. Hyperdiploid ALL-ben a kromoszómák számbeli növekedését látjuk, extra kópia leggyakrabban a 21, X, 14 és 4-es kromoszómából van jelen [77].

A hyperdiploid ALL igen kedvező kimenetelű, több mint 90%-os gyógyulási arány jellemzi. Kedvezőtlen rizikófaktorok, mint például előrehaladott életkor vagy magas fehérvérsejtszám jelenléte negatívan befolyásolhatja a prognózist, de az még így is kedvezőbb, mintha nem lenne jelen a hyperdiploiditás. Multivariáns analízis alapján a modális kromoszómaszám a legmeghatározóbb prognosztikai faktor. A 6 éves eseménymentes túlélés 51-53, 54-57 és 58-66 modális kromoszómaszám esetén 80%, 89%, illetve 99% [78]. A DNS-index (DI), vagyis a leukaemiás és a normál sejtek DNS tartalmának aránya alapján meghatározott három alcsoportban ($DI < 1,16$, $1,16 \leq DI < 1,24$, $DI \geq 1,24$) az EFS 83%, 90% és 95% volt. Szintén igen kedvező prognózissal társul, ha a 4-es, 10-es és 17-es kromoszóma tripla triszómiája szimultán van jelen [79].



5. ábra. DNS-index meghatározás.

A. Hyperdiploid ALL. **B.** Hypodiploid ALL. (A minták a PTE ÁOK Patológiai Intézet Flow citometriás laboratóriumának anyagából származnak.)

Hypodiploid B lymphoblastos leukaemia/lymphoma

Azokat a B-sejt irányba elkötelezett leukaemiákat soroljuk ebbe a csoportba, ahol a blastok kevesebb, mint 46, szigorúbb definíció szerint kevesebb, mint 45 kromoszómát tartalmaznak, a $DI < 1$ (5. ábra) [38]. Az összes ALL eset kb. 5%-a tartozik ide, egyaránt előfordul gyerek és felnőttkorban is, bár a közel haploid ALL (23-29 kromoszóma) ritkán fordul elő gyerekeknél. A blastokra a CD19 és CD10 pozitivitás jellemző. A kromoszómavesztés mellett strukturális eltérések is jelen lehetnek, de a közel haploid esetekben ezek jelenléte nem gyakori. A hypodiploid ALL rossz prognózissal társul, a csoporton belül a 44-45 kromoszómával rendelkező betegek esetén legkedvezőbb a kimenetel [80].

$t(5;14)(q31;q32)$ *IL3-IGH*

Ez egy ritkán előforduló transzlokáció, az esetek kevesebb, mint 1%-ában fordul elő, gyerekek és felnőttek egyaránt érintettek lehetnek. A klinikai tünetek hasonlóak a többi ALL típusnál előfordulókhöz, de tünetmentes eosinophilia formájában is jelentkezhet a betegség [38]. A blastokra a CD10+ és CD19+ immunfenotípus jellemző. Az eosinophil sejtek nem részei a leukaemiás klónnak, hanem reaktív populációt képviselnek.

t(1;19)(q23;p13.3) E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)

A t(1;19)(q23;p13.3) az *E2A(TCF3)* és a *PBX1* gén fúzióját eredményezi. Ez a transzlokáció viszonylag gyakori gyerekeknél, a B-ALL esetek 6%-ában van jelen, míg felnőtteknél ritkábban fordul elő. Klinikailag a pre-B immunfenotípus jellemző, a blastok CD19, CD10, CD9 és citoplazmatikus immunglobulin nehézlánc pozitívak. A betegek gyakran magas fehérvérsejt számmal és LDH szinttel, valamint központi idegrendszeri érintettséggel jelentkeznek [81]. Korábbi tanulmányokban rossz prognózisúnak tartották, de a modern intenzív terápiának köszönhetően manapság már nem számít annak.

A ma már nem használt citomorfológiai klasszifikáció a French-American-British (FAB) csoport irányelvein alapult [82, 83]. A gyermekkori ALL-ek kb. 85%-át az L1 csoportba sorolták, melyekre a kis vagy közepes méretű, kerek vagy ovális maggal, elmosódott kromatinállománnyal és hiányzó vagy kis nucleolusszal rendelkező lymphoblastok a jellemzőek [84]. A halvány festődésű citoplazma annyira gyér lehet, hogy számos sejtben a mag szinte kidudorodik.

Esetenként a lymphoblastok nagyobbak, ovális vagy irreguláris magkontúrral és kevésbé homogén kromatinállománnyal rendelkeznek. A sejtmagok változatosak, gyakran prominens, néha több nucleolus is jelen lehet. A citoplazma bőségebb, de szintén halványan festődik. Az ilyen morfológiai variánsokat L2 lymphoblastoknak nevezte a FAB klasszifikáció, a gyermekkori ALL esetek kevesebb, mint 15%-a tartozott ebbe a csoportba [84].

A nagy, homogén L3 blastok mélykéen festődő citoplazmával rendelkeznek, melyben általában éles határú vacuolumok vannak. A nagy sejtmagok kerek vagy ovális alakúak, finoman pontozott kromatinnal és változatos, néha elég prominens nucleolusszal rendelkeznek [84].

1.4. Terápia

A gyermekkori akut lymphoblastos leukaemia 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 [85, 86]. 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 ALL kezelése fél év intenzív és másfél év fenntartó terápiából áll. A kezelés nemzetközi protokollok ajánlásainak megfelelően, a betegeket standard, közepes és magas rizikójú csoportokba osztva történik citosztatikumok, sugárkezelés, csontvelő vagy őssejt transzplantáció, illetve ezek kombinációjának alkalmazásával [86].

Az indukciós kezelés célja a lehető legtöbb daganatsejt elpusztítása, melyet kombinált citosztatikus terápiával érnek el. A központi idegrendszeri relapszusok megelőzésére nagy dózisú intravénás és intrathecalis metotrexát (MTX) és/vagy sugárterápia is a kezelési protokollok része [86]. Komplet haematológiai remisszióról beszélünk, ha az indukció végén a regenerálódó csontvelőben a blastok aránya 5% alatti és extramedullaris tumor sincs jelen. A kezelés megkezdése utáni 8. napon a korai prednizolon válasz megítélésére perifériás vér (PB) vizsgálatot végeznek. Jó prednizolon válasz (PGR) esetén a vérben a blastszám alacsonyabb, mint $1 \times 10^9/L$, ez a kezelés előtti blastszámtól függetlenül kedvező prognózisra utal [87]. Az ALL IC-BFM 2002 protokollnak megfelelően a 15. és a 33. napon (d15 és d33) elvégzett csontvelő vizsgálatok eredményét, illetve további faktorokat is figyelembe véve rizikócsoportokba sorolják a betegeket [86]. A korai prednizolon válasz és a d15 csontvelői blastarány vizsgálata közül az utóbbi rendelkezik magasabb prediktív értékkel, segítségével a PGR kategóriába tartozó esetek további rizikó szerinti felosztása lehetséges [88]. Az indukciós blokk végén mért 5% feletti reziduális blastarány igen magas rizikójú betegséget jelez, ilyen esetekben az öt éves EFS csak 39%, szemben a komplett remisszióban lévő betegeknél látott 76%-hoz képest [86].

A konszolidáció vagy Protokoll M és a késői reintenzifikáció során adott kombinált kezeléssel az indukciós fázist túlélő blastsejtek elpusztítása és a KIR-i recidíva megelőzése a cél. Csontvelő aspirációt a blokk elején (w12) és a késői reintenzifikáció előtt az ötödik hónapban (m5) végeznek. Az intenzív terápiát követő fenntartó kezelés célja az összes reziduális leukaemiás daganatsejt elpusztítása, mert ezek tehetők felelőssé egy esetleges késői relapszusért. A kezelés befejezése után 2 éves záróvizsgálatot végeznek.

1.5. Prognózis

A gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia klinikai lefolyását és a beteg várható túlélését sok tényező befolyásolja. Az 1.3. fejezetben ismertetett strukturális és számbeli kromoszóma eltérések mellett ma már számos, a prognózis meghatározásában szerepet játszó paramétert ismerünk. Mivel az egyes rizikófaktorok prognosztikai szerepét nagy betegcsoportokon elvégzett vizsgálatok statisztikai adatai alapján határozták meg, az ettől való egyéni eltérés akár jelentős is lehet.

1.5.1. Életkor

Az 1 éves kor alatt, illetve a 6 évesnél idősebb korban jelentkező betegség esetén rosszabb a prognózis, mint az 1-6 éves korú gyerekeknél kialakult ALL esetén [89]. A csecsemőkori ALL esetén ez feltehetően más, szintén rossz prognózissal társuló faktorok jelenlétével magyarázható, mint a magas fehérvérsejtszám, KIR érintettség a diagnózis idején, CD10 negativitás, hepato- és/vagy splenomegalia, bizonyos kromoszóma eltérések jelenléte [90].

1.5.2. Fehérvérsejtszám

A diagnózis felállításakor mért fehérvérsejtszám igen fontos tényező a prognózis meghatározásának szempontjából: $50 \times 10^9/L$ -nél magasabb értékek esetén rosszabb a prognózis, míg a $10 \times 10^9/L$ -nél alacsonyabb fehérvérsejtszámmal rendelkező betegek EFS adatai kedvezőbbek [91].

1.5.3. Immunfenotípus

A B-sejt eredetű betegségek közül legjobb a CD10 pozitív cALL prognózisa. A CD34 expresszió B-ALL esetén kedvező, T-ALL esetén kedvezőtlen kimenetellel társul [47]. A T-sejtes fenotípusú leukaemiák közül a korai T-sejtes prekursor ALL a legkedvezőtlenebb prognózisú betegség [92]. A ritkán előforduló kevert fenotípusú leukaemiákra rosszabb eseménymentes túlélés jellemző, mint a B-ALL esetekre, mely

részben a diagnosztikai nehézségeknek és a kezelés során fellépő dilemmáknak is köszönhető [93].

1.5.4. Ploiditás

Gyerekeknél a ploiditás meghatározása a legfontosabb prognosztikai faktor [94]. A hyperdiploid, különösen a több mint 51 kromoszómával rendelkező esetekben a legjobb a prognózis, ez az ALL esetek kb. 25-30%-át jelenti [51, 95]. Ha a DNS-indexet vizsgáljuk, akkor az 1,16-nál nagyobb értékkel rendelkező betegeknek jobbák a kilátásai [94]. Náluk a 4 éves eseménymentes túlélés közel 90%, mely feltehetően a kemoterápiás szerekekkel szembeni nagyobb érzékenységgel magyarázható [94, 96]. A majdnem tetraploid (az esetek kb. 1%-a), valamint a 47-50 kromoszómával rendelkezők, vagyis akiknél a DNS-index 1,00 és 1,16 közé esik (az esetek 15%-a) a közepes prognózisú csoportba sorolhatók [89, 97]. A 47-50 kromoszómával rendelkező betegeknél leggyakrabban addicionális 21, X, 8, 10-es kromoszóma van jelen, továbbá az esetek 76%-ában egyéb strukturális rendellenesség is kimutatható [98]. Ha a 21-es triszómia az egyetlen jelenlévő kromoszóma rendellenesség, akkor a betegségnek különösen jó a prognózisa, ami részben az egyéb kedvező faktorok társulásának is köszönhető [99].

Hypodiploiditás az esetek kb. 5%-ában fordul elő, leggyakoribb a 20-as kromoszóma elvesztése [100, 101]. A közel haploid kromoszómaszámmal rendelkező betegek (kevesebb, mint 1%) igen rossz prognózissal rendelkeznek [102]. Normál diploid karyotípus a betegek kb. 8-10%-ánál figyelhető meg, ők közepes prognózissal jellemezhetők [97]. A pseudodiploiditás (MN = 46, strukturális eltérésekkel vagy kromoszóma szubsztitúcióval társulva) a betegek 50-60%-ánál van jelen és általában rossz prognózissal társul [89, 95].

1.6. Minimális reziduális betegség (MRD)

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 a leukaemiás sejtek

legalacsonyabb szintje, mely egy adott diagnosztikai eljárással kimutatható [103]. 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.

A minimális reziduális betegség vizsgálata nem csak azért fontos, mert a terápiás protokollok egyre nagyobb számában meghatározó tényező, hanem azért is, mert a betegség kimenetelének megjólásában is fontos szerepe van függetlenül más prognosztikai faktoroktól [104-111]. Az AIEOP-BMF ALL 2000 tanulmány a klónspecifikus génátrendeződések valós idejű PCR (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 [52, 112-114].

1.6.1. Flow citometria (FCM)

A sejt alapú módszerek közül a flow citometriás (FCM) immunfenotipizálás gyors, egyszerű és érzékeny módszer az MRD meghatározásához [110, 111, 115]. A módszer a leukaemiás sejtek kóros fenotípus expressziójának kimutatásán alapszik, ami kétségtelenül sok esetben jelen van, de messze nem az összes ALL-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 csontvelőminta sejtjein, a kemoterápiás kezelés után aktívan proliferáló csontvelőben már láthatóvá válhatnak [116]. Az FCM megbízhatóságát befolyásoló másik fontos tényező a vizsgálat elvégzéséhez rendelkezésre álló sejtek száma. Ha 10.000 sejt közül szeretnénk megtalálni 1 leukaemiás sejtet, akkor legalább 100.000 mononuclearis sejtet kell megvizsgálni, mivel minimum 10 leukaemiás találat kell az FCM eredmények értékeléséhez [117]. A használt markereknek stabilan kell expresszálniuk a leukaemiás sejteken, ugyanakkor a vizsgálatot végzőnek tisztában kell lennie azzal is, hogy a kemoterápia hatására markerek nyeresé, illetve vesztesé is előfordulhat [118]. 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.

1.6.2. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM)

Egy másik ígéretes, bár nem széles körben elterjedt sejt alapú módszer az MRD monitorizálásra a pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM – Scanning Fluorescent Microscopy) [119]. SFM esetén a flow citometriával szemben morfológiai kontroll és morfometriai paraméterek együttes használatával történik a vizsgálni kívánt leukaemiás sejtpopuláció kiválasztása. A konszekutív immunfluoreszcens és interfázis citogenetika, valamint az immunfenotípus alapján történő relokalizáció révén ugyanannak a sejtnek virtuálisan a feno- és genotípusa is vizsgálható [120, 121]. Az immunfluoreszcens és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) jelmintázat automatikus szkennelése révén 10^4 nagyságrendű sejt vizsgálható rövid időn belül [122, 123]. A mikroszkópos 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 paramétereire alapján, majd az autofluoreszcens objektumok kizárása történik meg. Ezt követi az immunfenotipizálás, így a konszekutív FISH analízist csak az egyedülálló, nem autofluoreszcens, az adott markerre nézve pozitív sejteken értékeljük. További előnye a módszernek, hogy egy citopreparátum elkészítéséhez elegendő 5×10^5 mononuclearis sejt.

1.6.3. DNS alapú valós idejű PCR (RQ-PCR)

Az antigén receptor génátrendeződések PCR vizsgálata megbízható, pontos és a gyerekkori ALL esetek döntő többségében használható módszer az MRD monitorizálására [124, 125]. Az 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 [116]. A 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 [37, 113]. Ugyanakkor az IG és TCR gének másodlagos átrendeződésen is áteshetnek, ami oligoklonalitáshoz vezet, azaz különböző klonális IG/TCR gént hordozó szubklónok alakulnak ki. B-ALL esetén az immunglobulin nehézlánc (IGH) gén hajlamos szubklón képződésre, az esetek akár 30-40%-ában multiplex génátrendeződés lehet jelen [126]. Előfordulhat, hogy egyes minor klónok rejtve maradnak a diagnózis idején és csak a betegség lefolyása során válnak dominánssá és detektálhatóvá [127]. Ezért a nemzetközi ajánlások két vagy több különböző átrendeződés vizsgálatát javasolják [125]. Bár a leukaemiás betegek többségénél valóban lehetőség van több marker azonosítására, az esetek kb. 30%-ában ezek nem mindegyike detektálható kellő szenzitivitással [112]. Személyenként két vagy több marker klónspecifikus régiójának meghatározása viszonylag költséges és időigényes folyamat.

1.6.4. RNS alapú valós idejű RT-PCR

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 [116]. Ugyanakkor kromoszóma transzlokációk a gyermekkori 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 [128]. 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 [129].

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 szemlélítve.
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 fenotípus- és genotípus vizsgálaton alapuló pásztázó fluoreszcens mikroszkópia során mért eredményekkel, az esetleges eltérések lehetséges okainak feltárása.
7. Több klónnal rendelkező beteg esetének bemutatása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében diagnosztizált, akut lymphoblastos leukaemiában szenvedő gyermekek csontvelő mintáin végeztük el. A betegség diagnózisának felállítása a WHO 2008 [39] által rögzített diagnosztikus elvek alapján történt. Precursor B-ALL fennállása esetén először a t(12;21) pozitív betegcsoportot azonosítottuk, majd az ő mintáikon végeztük el a további vizsgálatokat. A protokollnak megfelelően a követéses minták a következő időpontokban érkeztek: 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 kezelték [86]. A vizsgálatok elvégzéséhez szükséges írásos beleegyezést a gyermekek szülei megadták.

3.2. DNS és RNS extrakció

A mononucleáris (MNC) csontvelői sejteket Ficoll-PaqueTM PLUS (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) sűrűség grádiens centrifugálással választottuk el egymástól és a sejteket -70 °C-on tároltuk. 5×10^5 sejtet citospin preparátumok készítéséhez használtunk [120, 130]. A DNS-t friss vagy fagyasztott 1×10^7 MNC-ből izoláltuk QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításai szerint. A teljes RNS-t friss 2×10^7 mononucleáris sejtől nyertük ki TRIzol[®] reagens (Invitrogen Life Technologies Ltd, Paisley, UK) felhasználásával a gyártó útmutatása szerint. A DNS és RNS koncentrációját 260 nm-en mértük spektrofotométerrel (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA).

3.3. t(12;21) RT-PCR

A reverz transzkripció és a nested PCR elvégzéséhez az irodalomban leírt primereket és protokollt használtuk [115]. Pozitív kontrollként a t(12;21)(p13;q22) transzlokációt hordozó REH sejtvonalat (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany), negatív kontrollként a K562 (DSMZ GmbH) sejtvonalat használtuk. Az RNS minőségét az ABL a2/a3 exonok amplifikációjával ellenőriztük [131]. Minden reakciót iCycler típusú thermocycler készülékben (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) végeztünk el. A termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézissel azonosítottuk.

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

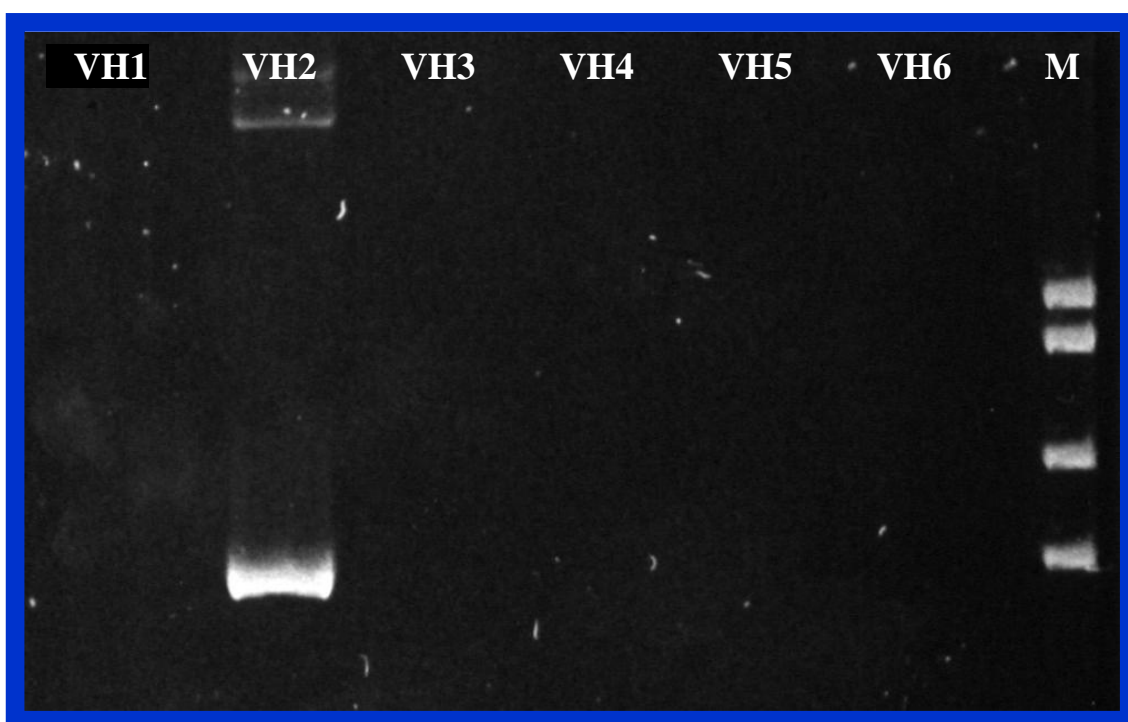
A t(12;21) pozitív betegektől származó RNS 1 µg-jával RT-PCR-t végeztünk 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland) felhasználásával. Ezt követően a cDNS-t LightCycler® rapid thermal cycler rendszerben amplifikáltuk. Az *ETV6/RUNX1* fúziós terméket fluoreszcens hibridizációs próbák segítségével detektáltuk [132]. A PCR-t a LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes (F. Hoffmann-La Roche AG) kit segítségével hajtottuk végre a gyártó utasításainak megfelelően.

A kezdeti denaturálás után (95°C, 10 perc) 50 cikusból álló denaturálás (95°C, 10 sec), annealing (57°C, 5 sec) és extenzió (72°C, 10 sec) következett, amit az olvadási görbe analízis és a hűtés (40°C, 1 perc) követett. Az RNS szintjét ugyanabban a cDNS mintában jelen lévő humán glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PDH) RNS szintjével normalizáltuk a LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set (F. Hoffmann-La Roche AG) segítségével.

3.5. IGH, IGK-Kde és TCRD PCR

A monoklonális Ig nehézlánc (IGH), Ig könnyűlánc – kappa deletáló elem (IGK-Kde) és T-sejt receptor-δ (TCRD) génátrendeződéseket családspecifikus

primerek felhasználásával PCR és heteroduplex analízis segítségével azonosítottuk [113, 133, 134]. Negatív kontrollként 5 egészséges donor perifériás vér (PB) mintájából izolált MNC keveréke szolgált, pozitív kontrollnak a REH sejtvonalat használtuk (DSMZ GmbH). A PCR reakciókat iCycler típusú thermocycler készülékben (Bio-Rad Laboratories Inc.) végeztük el 200 μ M dNTP (Invitrogen Life Technologies Ltd), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 2,0 mM MgCl₂, 20 pmol minden egyes primerből és 1,5 U Taq DNS polimeráz (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) jelenlétében. A kezdeti denaturálást (94°C, 5 perc) 40 ciklus denaturálás (94°C, 1 perc), annealing (60°C, 1 perc) és extenzió (72°C, 1 perc), majd a végső elongáció (72°C, 10 perc) és heteroduplex analízis követte. A heteroduplex analízis során a PCR termékeket 94°C-on 5 percig denaturáljuk, majd renaturációt (4°C, 60 perc) követően gélelektroforézist végzünk (6. ábra) [134].

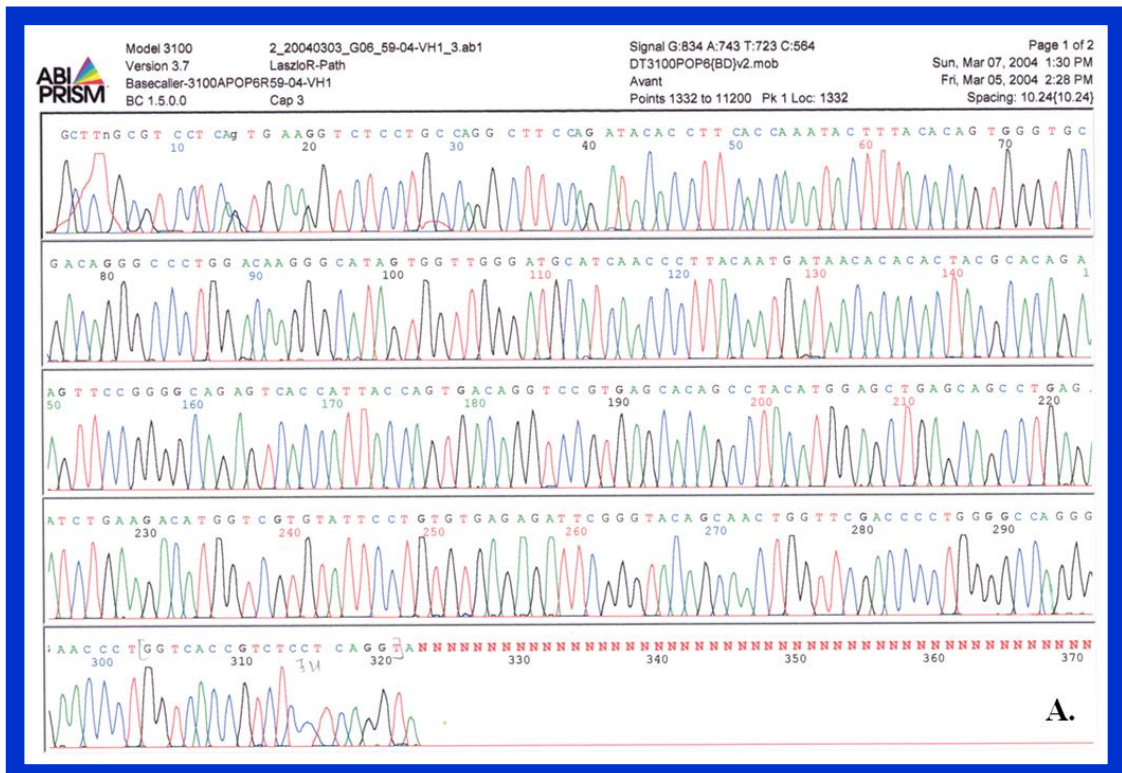


6. ábra. Immunglobulin nehézlánc génátrendeződés vizsgálat családspecifikus VH és konszenzus JH primerekkel.

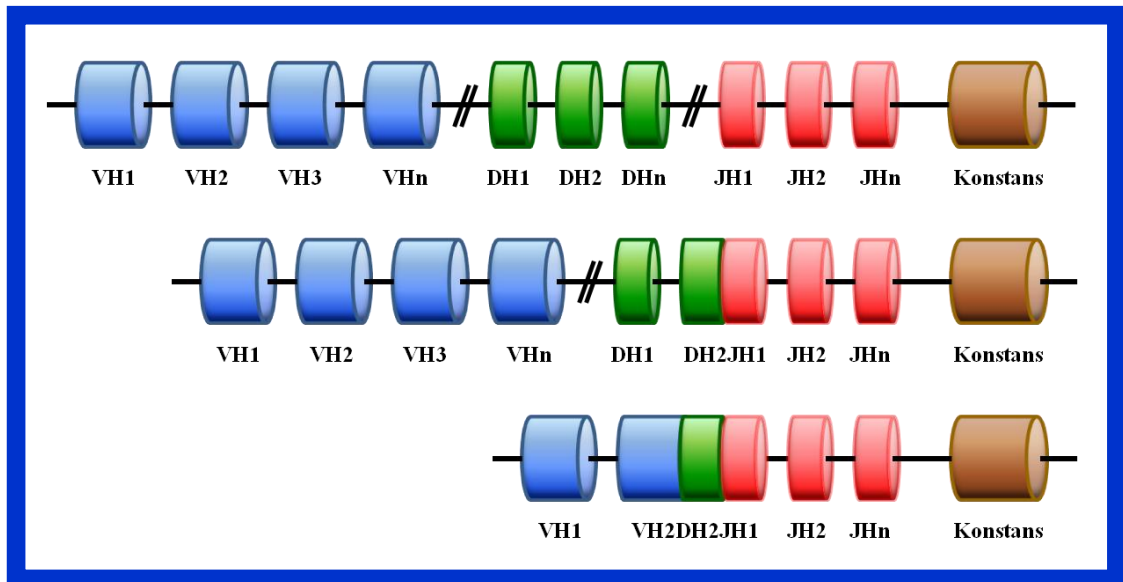
Jelen esetben poliakrilamid gélelektroforézist követően a VH2 családba tartozó primerrel látunk monoklonalitást. M – molekulásúly marker.

A heteroduplex analízis során a keletkezett DNS homo-, illetve heteroduplexek az eltérő konformációjuk miatt más-más elektroforetikus mobilitással rendelkeznek. A módszer segítségével elkülöníthetők a klonális génátrendeződés során keletkezett és homoduplexet képző PCR termékek a reaktív poliklonális háttér amplifikációjából származó heteroduplex termékektől. A PCR termékeket a méretük alapján 6%-os (IGK-Kde) vagy 8%-os (IGH, TCRD) poliakrilamid gélelektroforézissel (260V, 90 perc) választottuk szét és 0,5 µg/ml etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

Klonális génátrendeződés esetén a DNS terméket kivágtuk és GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich Corp.) használatával visszanyertük a gélből. Ezt követően fluoreszcens szekvenálást végeztünk BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével ABI automata szekvenálón (Applied Biosystems) a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvenálást az esetleges gépi leolvasási hibák elkerülése miatt mindkét irányból elvégeztük (7. ábra).



átrendeződést hordozó génszakasz egyedi junkcionális régiójára tervezhetünk klónspecifikus primert.



8. ábra. Az immunglobulin nehézlánc génátrendeződés leegyszerűsített folyamata.

A különböző kromoszómákon található immunglobulin génrégiókban a variábilis és a konstans géneket nem kódoló DNS szakaszok választják el egymástól. A B-sejtekben az IG génátrendeződés első lépése a nehézlánc génekben zajlik le: véletlenszerűen egy D-régió közel kerül egy J-génhez és a köztük lévő DNS-szakasz deletálódik. Ezt követően a kialakult DJ-komplex és egy V-gén között történik rekombináció, majd a köztes DNS szakasz deléciója után kialakul a VDJ komplex. A transzkripciót követően a variábilis és konstans régió közti intron szakasz splicingja, illetve egyéb érési folyamatok után létrejön a transzlációra kész érett mRNS. A könnyűlánc és a TCRD gének esetén hasonló módon zajlik a génátrendeződés folyamata, de előbbieket nem tartalmazznak D szegmenseket.

A 7. ábráról leolvasott szekvenciában a germline V, D és J génszegmenseket a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [137] és az IMGT (www.imgt.org) [138] online szekvencia azonosító szoftverek segítségével határoztuk meg (9. ábra).

Download ▾ GenBank Graphics Sort by: E value ▾

Homo sapiens chromosome 14, alternate assembly CHM1_1.1
Sequence ID: [ref|NC_018925.2|](#) Length: 107278286 Number of Matches: 12

Range 1: 106511298 to 106511573 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	3e-142	276/276(100%)	0/276(0%)	Plus/Minus

Features: [IGHV1-17](#)

```

Query 2          CTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCAGGCTTCCAGAT 61
|
Sbjct 106511573 CTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCAGGCTTCCAGAT 106511514

Query 62         ACACCTTCACCAAATACTTTACACAGTGGGTGCGACAGGGCCCTGGACAAGGGCATAGTG 121
|
Sbjct 106511513 ACACCTTCACCAAATACTTTACACAGTGGGTGCGACAGGGCCCTGGACAAGGGCATAGTG 106511454

Query 122        GTTGGGATGCATCAACCCTTACAATGATAACACACACTACGCACAGAAGTTCCGGGGCAG 181
|
Sbjct 106511453 GTTGGGATGCATCAACCCTTACAATGATAACACACACTACGCACAGAAGTTCCGGGGCAG 106511394

Query 182        AGTCACCATTACCAGTGACAGGTCCGTGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG 241
|
Sbjct 106511393 AGTCACCATTACCAGTGACAGGTCCGTGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG 106511334

Query 242        ATCTGAAGACATGGTCGTGTATTCTGTGTGAGAGA 277
|
Sbjct 106511333 ATCTGAAGACATGGTCGTGTATTCTGTGTGAGAGA 106511298

```

Range 11: 106200768 to 106200819 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
97.1 bits(52)	1e-17	52/52(100%)	0/52(0%)	Plus/Minus

Features: [IGHJ5](#)

```

Query 289        CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 340
|
Sbjct 106200819 CAACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT 106200768

```

4. Results of IMGT/JunctionAnalysis

3'-REGION	P	N	D-REGION	5'-J-REGION	J name	D name	Vmut	Dmut	Jmut	Ngc
tgtgtgagaga	t	tc	..gggtacag.....	..caactggttcgacccctgg	Homsap IGHJ5*02	Homsap IGHD5-18*01	0	1	0	1/2

9. ábra. A germline génnek meghatározása a BLAST és IMGT szekvencia azonosító szoftverrel.

A 7. ábráról leolvasott szekvenciában a IGHV1-17, az IGHD5-18 és az IGHJ5 családba tartozó germline géneket azonosítottunk.

A germline génszakaszok azonosítása után klónspecifikus primert terveztünk a junkcionális régióra (10. ábra). Bár a primer tervezésben segítségünkre volt az Oligo 6 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, USA) a tervezés során számos problémát kellett megoldanunk. Mivel a konstans reverz primerek adott Tm értékkel (melting point – olvadáspont) rendelkeztek, ehhez kellett igazítanunk a tervezett primerekét is. Ahogy a 10. ábrán is látható, a klónspecifikus régió gyakran csak néhány bázispár hosszúságú, ami nehezzé teszi specifikus primer

tervezését. Ugyanakkor ez a régió gyakran G-C nukleotidokban gazdag, ami három hidrogén-kötés révén erősebb kapcsolatot jelent az A-T nukleotidok két hidrogén-kötésével szemben, ezáltal jelentősen emelkedik az olvadáspont.

TCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCCA
GGCTTCCAGATACACCTTCACCAAATACTTTACACAGTGGGTGCGACAGG
GCCCTGGACAAGGGCATAGTGGTTGGGATGCATCAACCCTTACAATGATA
ACACACACTACGCACAGAAGTTCCGGGGCAGAGTCACCATTACCAGTGAC
AGGTCCGTGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGA
CATGGTCGTGTATTCCTGTGTGAGAGATTCGGG*TACAGCAACTGGTTCG
ACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGT

10. ábra. A 7. ábráról leolvasható szekvencia.

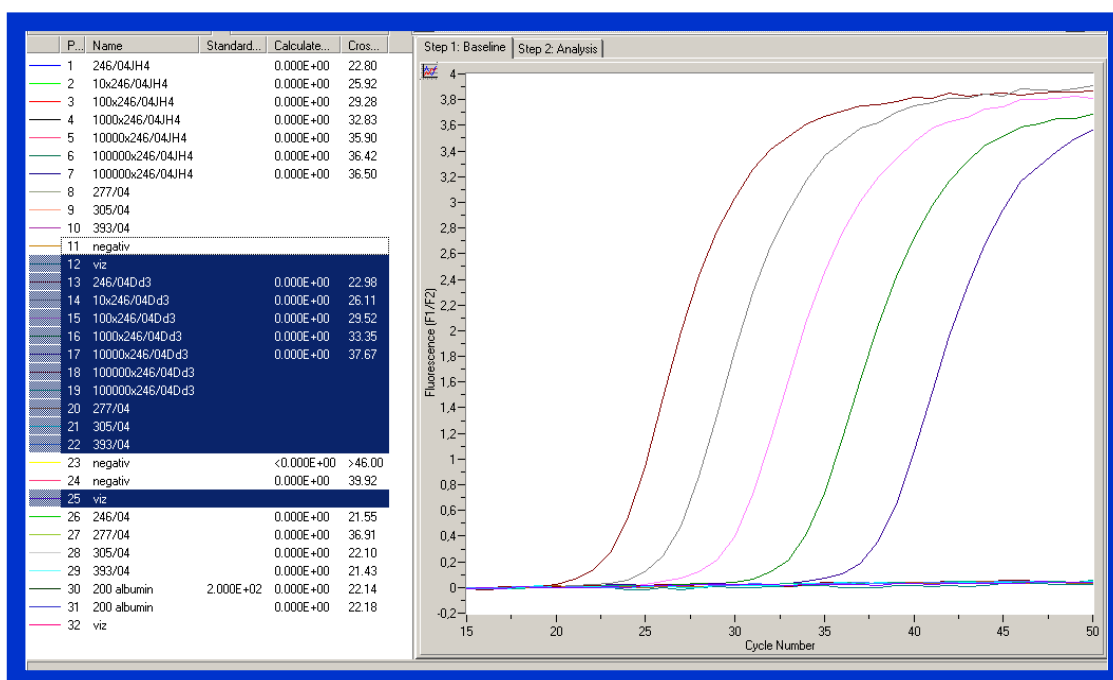
Feketével az IGHV1, kékkel az IGHJ5 régiót, aláhúzással a forward és reverz primereket, zöld színnel az IGHD5 gént jelöltük. Pirossal a 9. ábra alapján azonosított junkcionális régiót emeltük ki, melyre a dupla aláhúzással jelzett klónspecifikus primert terveztük. A csillag jelölés az IGHD szakaszban lévő mutációt jelzi, a germline gén a jelzett pozícióban adenint tartalmaz.

Túl rövid primer esetén nő a nem megfelelő helyre való kötődés esélye, míg túl nagy bázisszám esetén a primer rendelés költségei növekednek meg, valamint szintén nő a nem specifikus kapcsolódás valószínűsége. A tervezés során a primeren belül kialakuló hélix képződést, a primer saját magához és a próbához való kapcsolódását is vizsgáltuk, a közöttük kialakuló hidrogén-kötések számát próbáltuk minimalizálni.

3.6. IGH, IGK-Kde és TCRD RQ-PCR

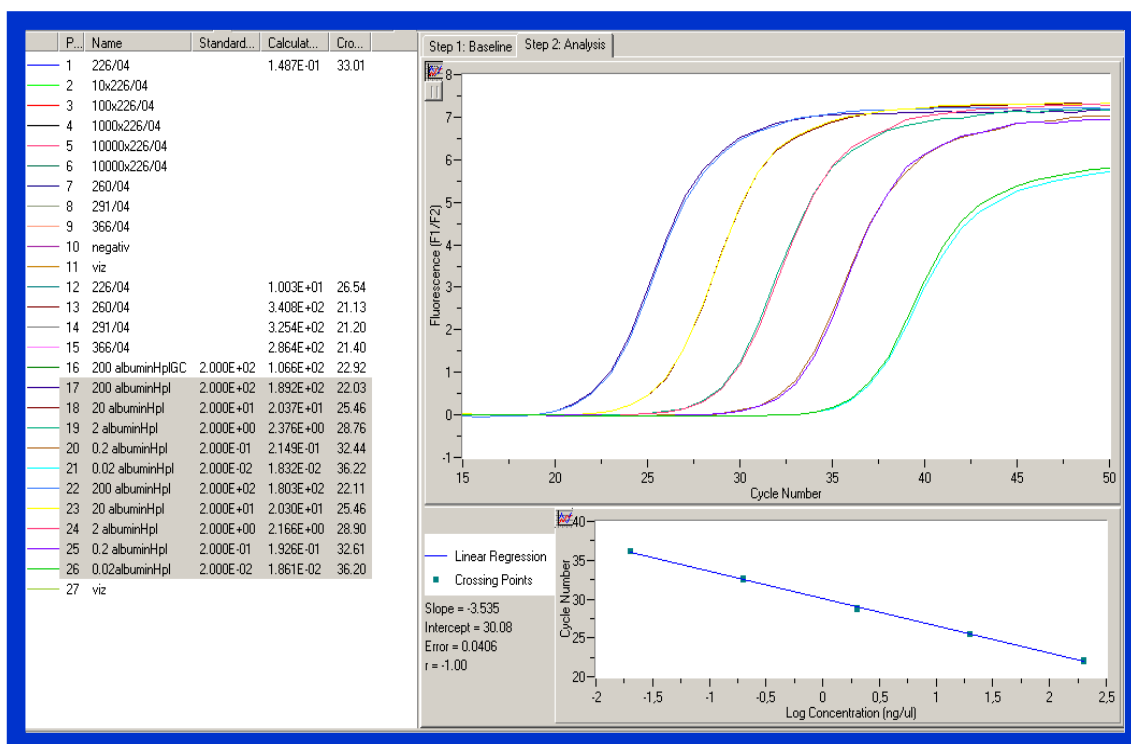
A valós idejű PCR reakciókat LightCycler™ rapid thermal cycler rendszer (F. Hoffmann-La Roche AG) segítségével végeztük el az irodalomban megadott germline reverz primerekkel és próbákkal [139-141], valamint az általunk tervezett forward, a junkcionális régióra specifikus primerekkel. A termékeket kettős 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. Az RQ-PCR reakciókat 20 µl össztérfogatú reakcióelegyben végeztük el 200 µM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 3,0-4,0 mM MgCl₂, 20 pmol minden egyes primerből, 2 pmol a próbákból és 1,5 U FastStart Taq DNS polimeráz (F. Hoffmann-La Roche AG) jelenlétében. A kezdeti denaturálást (95°C, 10 perc) 50 ciklus denaturálás (95°C, 30 sec), annealing és extenzió (62°C, 1 perc), végül a hűtés (40 °C, 1 perc) követte. A reakció érzékenységét úgy állapítottuk meg, hogy a diagnosztikus DNS-ből hígítási sort készítettünk az MNC-ből származó negatív kontrollba, az érzékenységet a legkisebb, de még pozitív reakciót adó hígítás adta meg (11. ábra).



11. ábra. A kezeletlen minta DNS-éből készített hígítási sor segítségével határoztuk meg a reakció érzékenységét, mely jelen esetben 10^{-4} volt.

Az albumin gént használtuk a minták közötti mennyiségi és minőségi különbségek korrigálásához [142]. Standard görbéket a Human Genom Albumin (F. Hoffmann-La Roche AG) vízben történő tízszeres hígítási sorából nyertünk (12. ábra).



12. ábra. A Human Genom Albumin (F. Hoffmann-La Roche AG) vízben történő tízszeres hígítási sora és az ennek segítségével kapott standard görbe.

Az albumin gént a DNS minták közötti mennyiségi és minőségi különbségek korrigálásához használtuk.

3.7. Immuncitokémiai preparátumok

Az SFM vizsgálatok elvégzéséhez először citológiai preparátumokat készítettünk. Szilanizált tárgylemezek 240 mm²-es területére 5x10⁵ mosott, majd RPMI 1640 oldatban (Sigma-Aldrich Corp.) felvett mononuclearis sejtkeverékből citospin preparátumokat készítettünk (Hettich citocentrifuga, Tuttlingen, Germany). Ezt követően a lemezeket levegőn szárítottuk, majd 4°C-on 20 percig 3,7%-os formaldehid oldatban fixáltuk. A sejtpreparátumokat 2x5 perces, 900W mikrohullámú kezelésnek tettük ki 0,01 mol/L, pH 6,0 citrát pufferben, melyet PBS öblítés követett. A nem specifikus kötőhelyeket 1,3,5-trinitrobenzol oldattal (Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Germany) blokkoltuk. Primér antitestként jelöletlen egér anti-CD10 antitestet (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) használtunk, a

reakciót biotinilált anti-egér antitest (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) és avidin-FITC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) segítségével hívtuk elő. Az utófixálást (3,7% formaldehid, 10 perc, 4°C) detergenssel való mosás és etanolos szárítás követte. A lemezeket 0,005 µg/ml Vectashield-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) oldattal (Vector Laboratories) fedtük le.

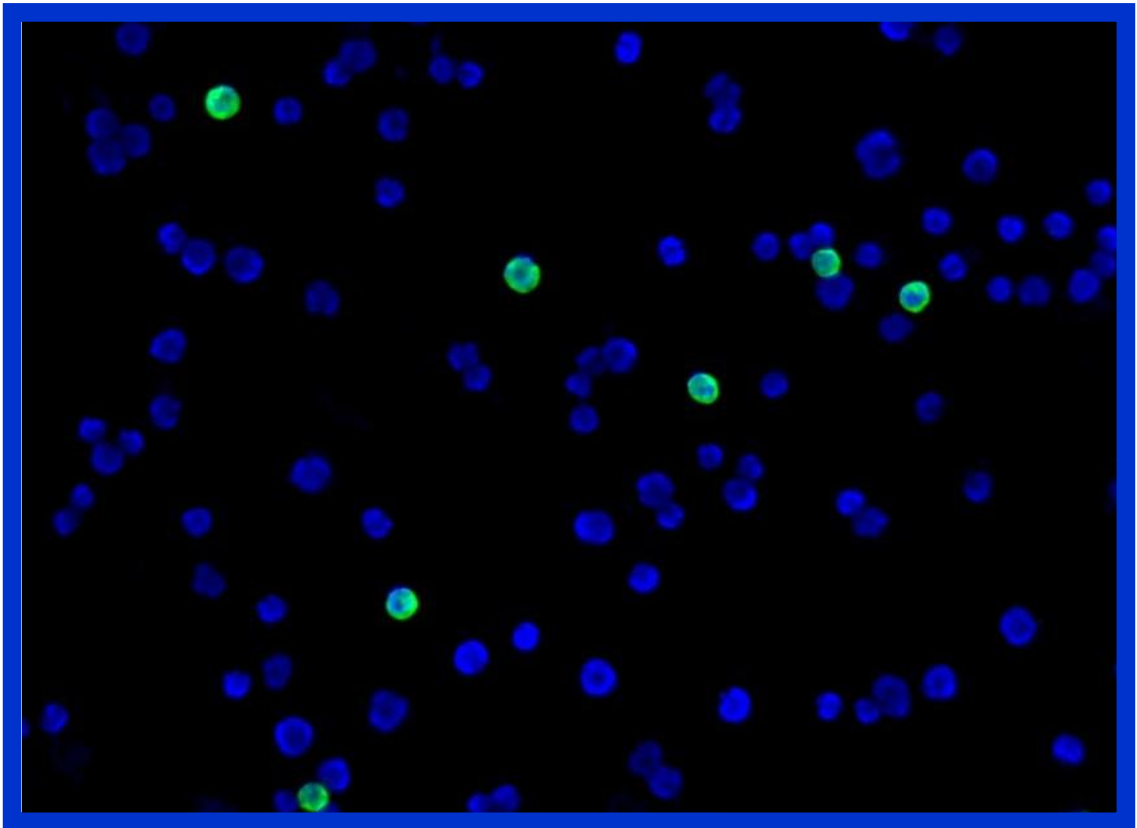
3.8. Pásztázó fluoreszcens mikroszkópia (SFM)

Az automatizált szkenneléshez és analízishez a 8 tárgylemezes motorizált tárgyasztallal, magas felbontású fekete-fehér CCD kamerával (CV-M1, JAI A/S, Copenhagen, Denmark) felszerelt Zeiss Axioplan 2ie Mot mikroszkóp állomást használtunk, melyet a Metafer 4.0 (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Germany) 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, mindegyik előtt finomfókuszálással. A DAPI+ objektumokat a következő paraméterek alapján tekintettük sejtmagnak: háttérfestés objektum küszöb: 18%; minimum objektum terület: 20 µm²; maximum objektum terület: 350 µm²; maximum relatív konkavitás mélység: 0,5; maximum aspektus arány: 3,5. Az objektum nélküli, valamint a csak részlegesen felvett DAPI objektumokat tartalmazó képeket töröltük. A sejtek 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 (13. ábra). A későbbiekben elvégzett *ETV6/RUNX1* iFISH jeleket csak az egyedülálló, nem autofluoreszcens, CD10+ objektumokon vizsgáltuk.

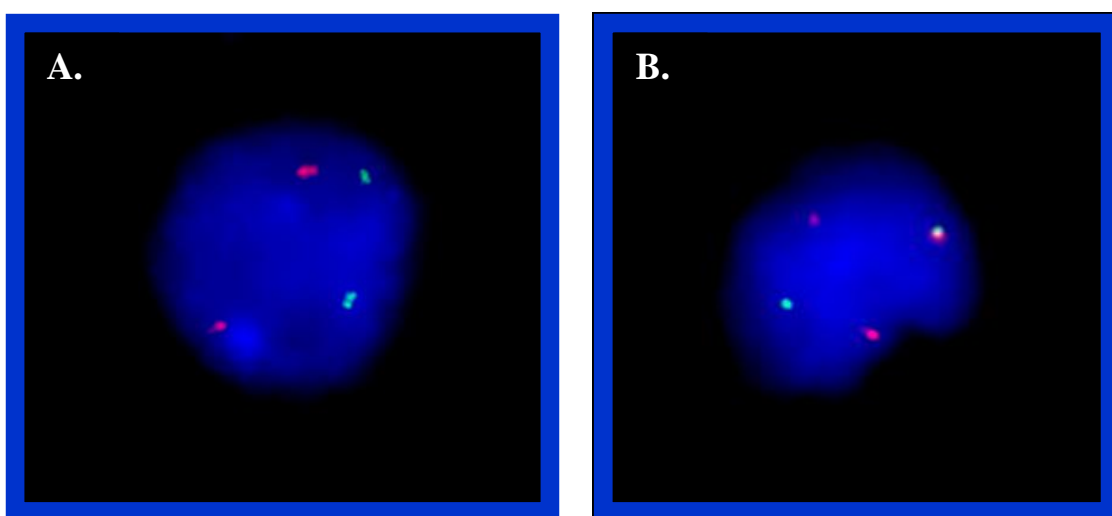


13. ábra. Fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) a CD10+ sejtek intenzív zöld jelet bocsátanak ki, a negatív sejtekben a sejtmag háttérfestése (DAPI) látható.

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

Az immuncitokémiai jelölés után ugyanazon a preparátumon interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizációt (iFISH) hajtottunk végre. A fedőlemezeket 0,005%-os Tween 20/PBS oldatban áztattuk le, ezt követően PBS-ben mostuk a preparátumokat. A lemezeket egy éjszakán át -20°C -on Carnoy-oldatban tartottuk fixálás céljából. Levegőn szárítás után a mintát Vysis LSI *ETV6/RUNX1* átrendeződésre specifikus fúziós, kétszínű, extraszignálos (ES) próbával jelöltük a gyártó (Vysis Inc., Des Plaines, IL, USA) útmutatása alapján.

A CD10+ sejtmagok relokalizációját a Metafer 4.0 szoftver segítségével végeztük el a tárolt galériaképek alapján. A relokalizált magokat az Isis (In situ imaging system) modul mind SpectrumGreen, mind SpectrumOrange csatornában (40x objektív, 6 fókusz sík vizsgálata, síkok közötti távolság 0,40 µm) 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 (14. ábra).



14. ábra. A CD10+ sejtek relokalizációja FISH jelölés után.

A. A SpectrumGreen – zöld jel az *ETV6*, míg a SpectrumOrange – piros jel a *RUNX1* gének lokalizációját mutatja. Normál sejtmagokban két-két különálló piros és zöld jel látható, a sejt egy normál csontvelői haematogónnak felel meg. **B.** A t(12;21) transzlokációt hordozó sejtmagokban egy sárga fúziós szignál, valamint egy kisebb méretű, alacsonyabb intenzitású piros extraszignál figyelhető meg a piros és zöld 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) pozitívnak meg kellett haladnia az átlag fals pozitívnak + 2SD küszöbértéket, mely immunfenotipizálás esetén $0,21\% + 2 \times 0,15\% = 0,51\%$, FISH genotipizálás esetén $15,8\% + 2 \times 0,75\% = 17,30\%$ volt [123].

4. Eredmények

4.1. Minták

A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében diagnosztizált acut lymphoblastos leukaemiás gyerekek 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 által rögzített diagnosztikus elvek alapján történt [39]. 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 [143].

A betegek átlagéletkora a diagnózis idején 2 és 17 év között váltakozott, az átlag 6,07 év, a nemek aránya 1:1 volt. A kezelési protokolloknak megfelelően a diagnosztikus csontvelő aspirátumon kívül a következő követéses időpontokban érkeztek minták: a 15. napon (d15) (11 minta), az indukciós blokk végén a 33. napon (d33) (14 minta), a konszolidációs fázis megkezdése előtt a 12. héten (w12) (10 minta), valamint a késői reintenzifikáció előtt az 5. hónapban (m5) (14 minta) (4. táblázat). Az átlagos követési idő 30,5 hónap (20-38 hónap) volt.

Míg a terápia megkezdése előtti diagnosztikus mintákban igen nagy számban voltak jelen mononuclearis sejtek, addig a terápia hatására ezek száma a követéses időpontokban már jelentősen lecsökkent. Sokszor a beküldött anyag térfogata is igen változó volt, melynek háttérében 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.

Beteg	Minta db szám	Életkor dg.-kor	DNS marker	Követés 2006. dec.-ig
#1	5	2	1	31 hónap
#2	3	3	3	34 hónap
#3	3	10	2	34 hónap
#4	5	4	2	38 hónap
#5	5	4	2	34 hónap
#6	5	6	1	32 hónap
#7	5	6	1	31 hónap
#8	5	2	1	37 hónap
#9	5	5	2	31 hónap
#10	5	17	2	28 hónap
#11	5	8	1	27 hónap
#12	3	10	2	27 hónap
#13	4	5	1	23 hónap
#14	5	3	2	20 hónap
	63	6,07		30,5 hónap

4. táblázat. Az *ETV6/RUNX1* transzlokációt hordozó pALL-es betegek adatai.

A táblázatban feltüntettük a 14 beteg követéses mintáinak darabszámát, a páciensek diagnóziskori életkorát, a vizsgált DNS markerek számát és a követési idő hosszát.

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. Eredményeinket az 5. táblázatban foglaltuk össze [143]. Egy betegnél (#1) alakult ki relapszus 24 hónap követés után, a #7 betegnél pedig a betegség kezdete után 27 hónappal meningealis relapszus jelentkezett.

Beteg	Módszer	d15	d33	w12	m5
#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
	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

5. táblázat. A sejt, DNS és RNS alapú MRD eredmények.

A tumorhígulást az adott target relatív mennyiségének negatív logaritmusaként fejeztük ki.

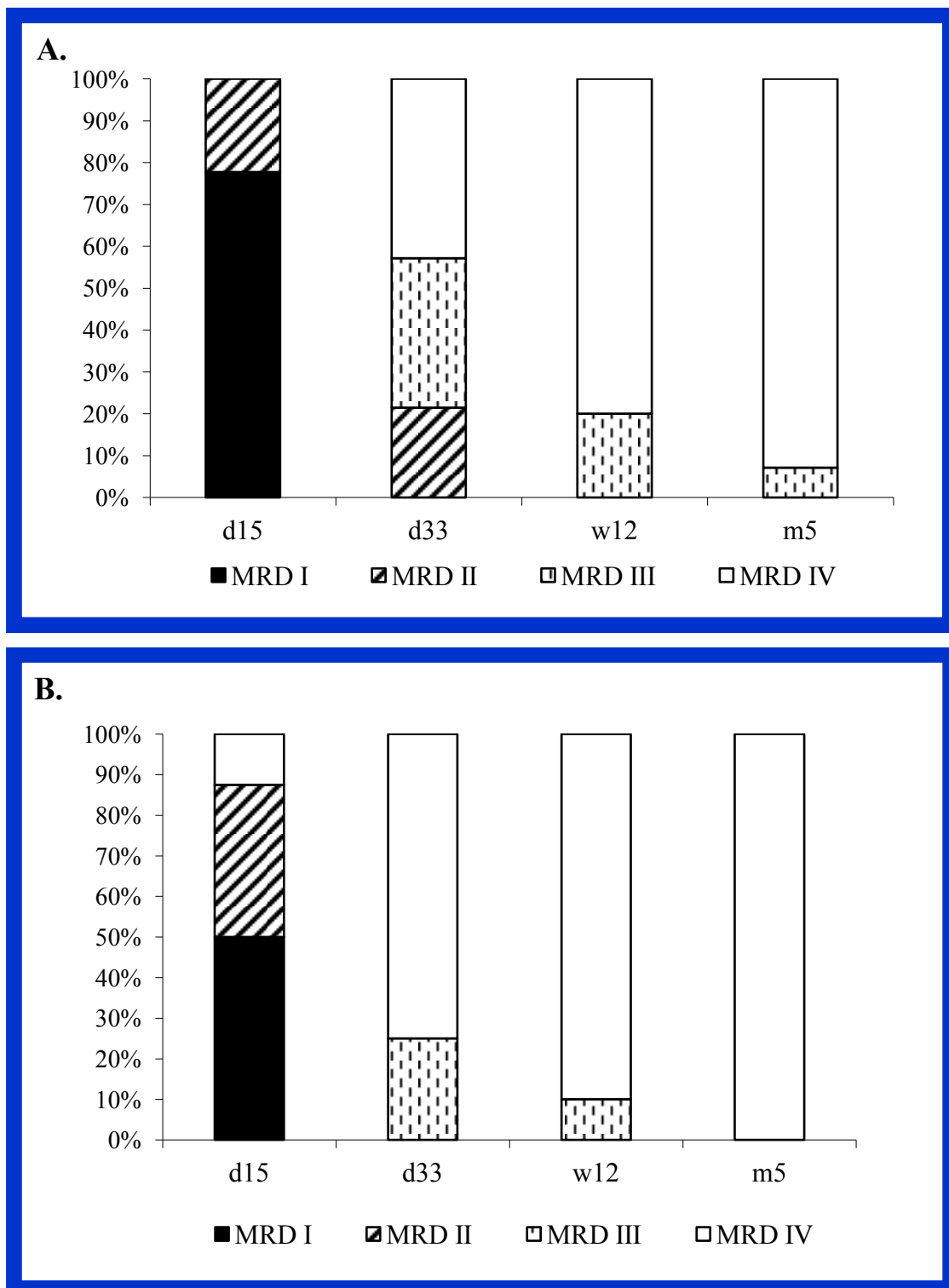
NA – nincs adat

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

A DNS alapú RQ-PCR módszerrel minden betegnél sikerült klonális géntrendeződést 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-markerral 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 (5. táblázat). Mindkét esetben az RQ-RT-PCR eredmény a leukaemiás sejtek nagyobb redukcióját mutatta és a #4 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 (#7 és #8) 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.

A kezelésre adott válasz könnyebb áttekinthetősége érdekében a betegek MRD értékeit RQ-PCR és RQ-RT-PCR esetén 4 csoportba osztottuk: $MRD \geq 10^{-2}$ (MRD I), $MRD 10^{-2} - 10^{-3}$ között (MRD II), $MRD 10^{-3}$ to 10^{-4} között (MRD III) és MRD kevesebb, mint 10^{-4} vagy nem detektálható (MRD IV) (15. ábra). Feltűnő a különbség a DNS ill. RNS alapú módszerrel mért MRD eredmények között d15 esetén: MRD I kategóriába 78% vs 50%, MRD II kategóriába 22% vs 37,5% esett. Habár ezen időpontokban minden betegnél detektálható volt az MRD, egy esetben (#4) a betegség szintje 10^{-4} alá csökkent RQ-RT-PCR-rel, míg RQ-PCR-rel nem. Számottevő különbség adódik akkor is, ha az MRD IV-es csoportba tartozó adatok százalékos eloszlását vizsgáljuk a követés függvényében. Senki sem tartozott ebbe a csoportba d15 esetén DNS alapú módszerrel, míg RNS alapúnál 12,5%. A következő időpontban az ide tartozó betegek aránya RQ-RT-PCR-rel csaknem duplája az RQ-PCR-rel mértnek (75% vs 43%) és ez a különbség, bár csökken, de a megfigyelési periódus teljes egészében jelen van az RNS gyorsabb clearance-ét mutatva.



15. ábra. Az egyes MRD tartományokba eső betegek százalékos megoszlása RQ-PCR és RQ-RT-PCR esetén.

A betegek MRD értékeit RQ-PCR és RQ-RT-PCR esetén 4 csoportba osztottuk: $MRD \geq 10^{-2}$ (MRD I), $MRD 10^{-2} - 10^{-3}$ között (MRD II), $MRD 10^{-3} - 10^{-4}$ között (MRD III) és MRD kevesebb, mint 10^{-4} vagy nem detektálható (MRD IV). **A:** RQ-PCR. **B:** RQ-RT-PCR.

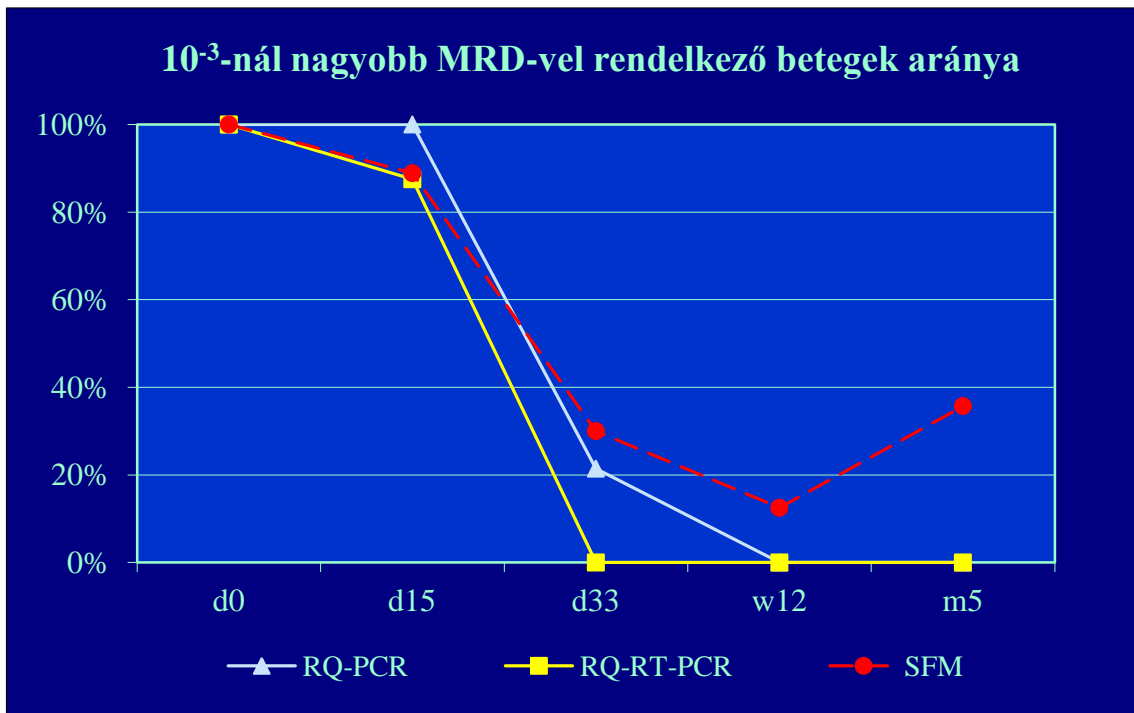
Az RQ-PCR és RQ-RT-PCR módszerekkel mért adatok alapján a különböző MRD kategóriákba eső betegek százalékos arányát a 6. táblázatban foglaltuk össze. A DNS alapú adatokkal összehasonlítva egyértelműen az RNS nagyobb és gyorsabb hígulása látható a követés alatt.

Kategória	MRD tartomány	d15 DNS / RNS	d33 DNS / RNS	w12 DNS / RNS	m5 DNS / RNS
MRD I	$MRD \geq 10^{-2}$	78 / 50	0 / 0	0 / 0	0 / 0
MRD II	$10^{-2} > MRD \geq 10^{-3}$	22 / 37,5	21 / 0	0 / 0	0 / 0
MRD III	$10^{-3} > MRD \geq 10^{-4}$	0 / 0	36 / 25	20 / 10	7 / 0
MRD IV	$MRD < 10^{-4}$	0 / 12,5	43 / 75	80 / 90	93 / 100

6. táblázat. Az adott MRD kategóriába eső betegek százalékos aránya a különböző követéses időpontokban RQ-PCR és RQ-RT-PCR módszerekkel mérve.

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 (5. táblázat), míg 10^{-3} értéknél ez csak az RNS alapú módszerre volt igaz (16. ábra). 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.

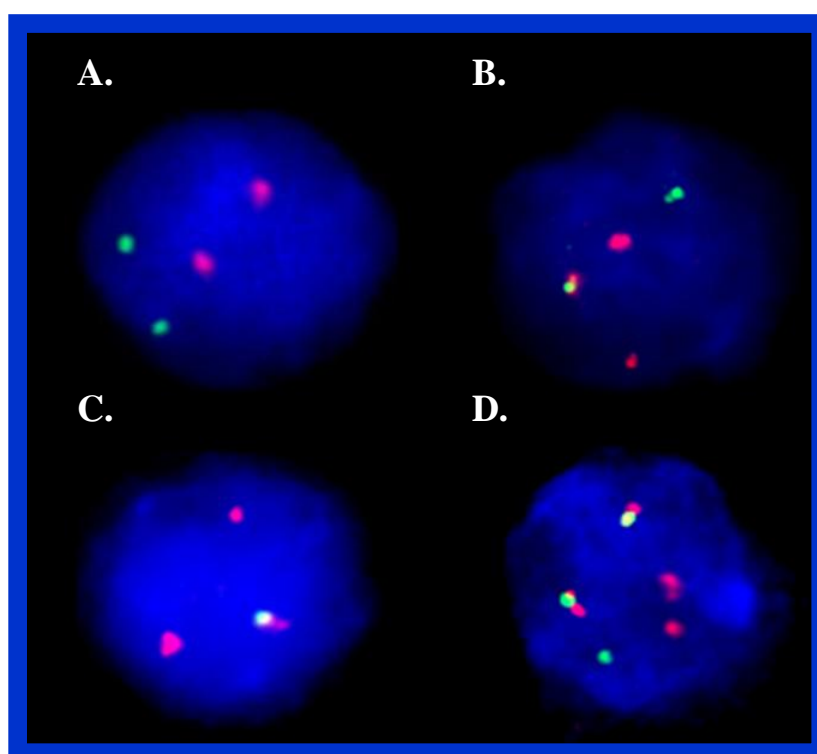


16. ábra. A 10⁻³-nál nagyobb MRD-vel rendelkező betegek százalékos aránya RQ-PCR, RQ-RT-PCR és SFM módszerekkel.

A betegek ezen csoportja m5 időpontban átlagosan kisebb tumor dilúciós faktorial rendelkezett (1.9, tartomány: 1.4 – 2.5) a w12-nél látott értékkel (2.1) összehasonlítva. A konkrét eseteket megnézve (5. táblázat) azt látjuk, hogy az m5 időpontban SFM-mel kimutatható reziduummal rendelkező betegek közül kettőnél (#1 és #4) 1.5 log, három esetben (#6, #8 és #9) 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 sejt valóban leukaemia prekursor sejt és nem reziduális

tumorsejtek (17. ábra). 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 heterozigótaság elvesztését (LOH – loss of heterozygosity) eredményezi vagy a fúziós gén duplikációja. A kérdéses 5 beteg kezeletlen mintáiban komplex citogenetikai eltérések voltak észlelhetők: 3/5-ben átrendeződés és 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 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 (17. ábra).

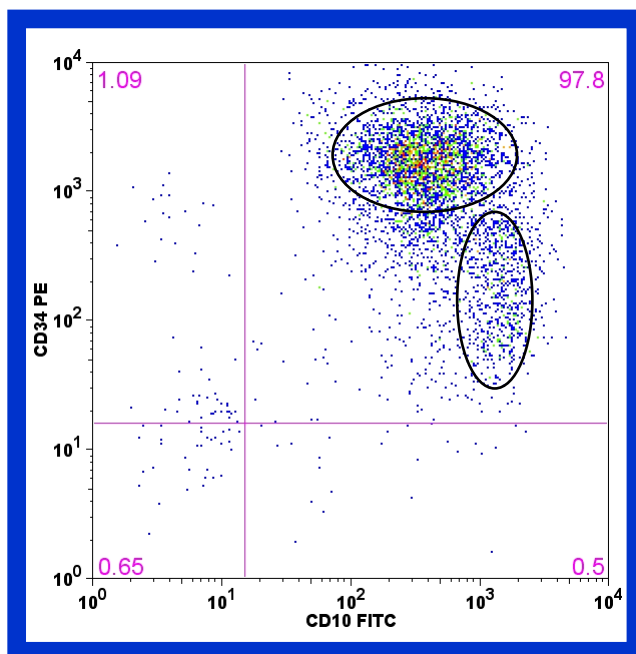


17. ábra. CD10 pozitív sejtek iFISH mintázata az *ETV6/RUNX1* transzlokációra specifikus fúziós, kétszínű, extraszignálos próbával.

A. Egy normál csontvelői haematogónban transzlokáció nincs jelen, a homológ kromoszómapároknak megfelelően 2 piros és 2 zöld jel látható. **B.** Primordiális/prekursor leukaemiás sejtkben a monoallélikus t(12;21) átrendeződésnek megfelelően 1 sárga fúziós, 1+1ES piros és 1 zöld jelet látunk. **C.** Leukaemiás sejtekben a monoallélikus átrendeződés mellett a normál *ETV6* deléciója következtében a zöld jel hiányzik, 1fúziós sárga és 1+1ES piros szignál **D.** vagy a fúziós gén duplikációja következtében 2 fúziós sárga, 1+1ES piros és 1 zöld jel figyelhető meg. (Saját vizsgálat, nem publikált ábra.)

4.4. Több klónnal rendelkező beteg vizsgálata

A klónspecifikus DNS alapú RQ-PCR-ral azonosítottunk egy több klónnal rendelkező beteget is, akinél a leukaemiás klónok eltérő viselkedését is sikerült kimutatnunk. A multiplex IGH PCR reakció során a 14-ből 1 esetben (#5) 3 klonális génátrendeződést találtunk három különböző V_H géncsaládból. Az egyes klónok 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 klón jelenléte a leukaemiás sejtek CD10 és CD34 expressziójának flow citometriás fenotipizálása alapján is sejthető volt (18. ábra).

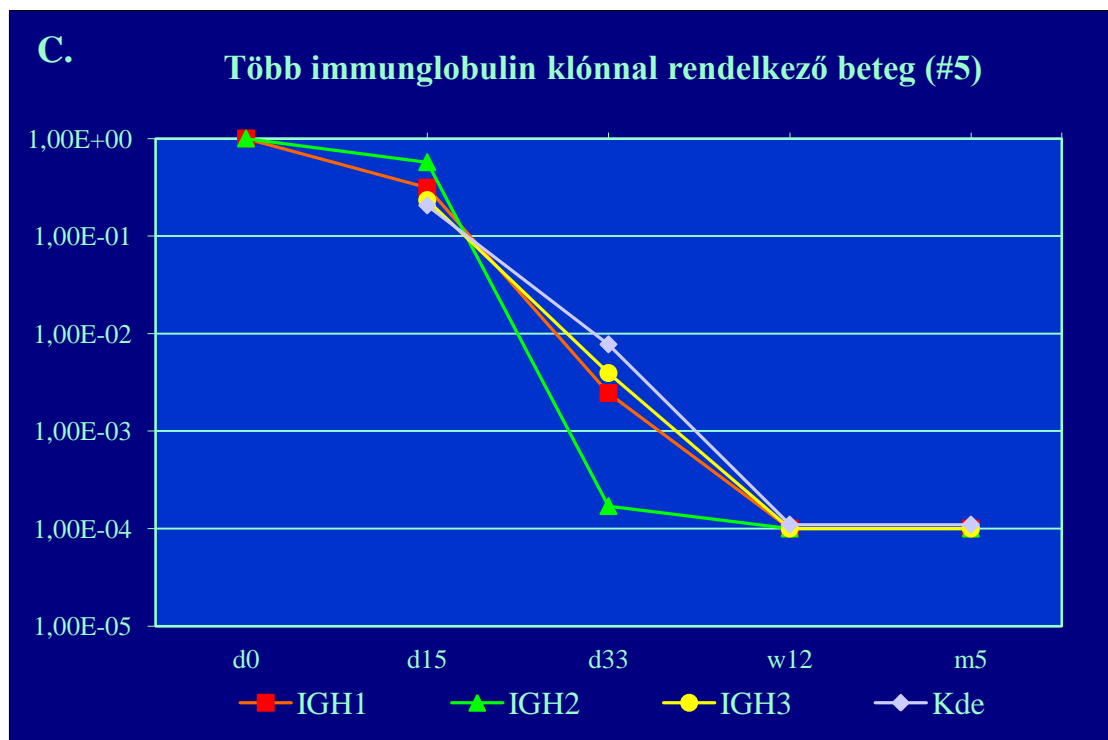
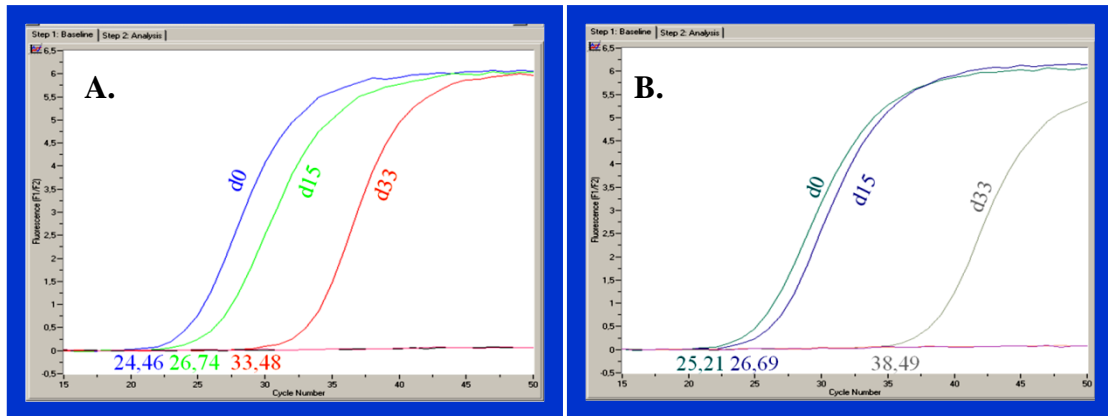


18. ábra. Az #5 beteg diagnosztikus csontvelő mintájának flow citometriás fenotipizálása.

A CD10 és CD34 pozitív blastok az intenzitásbeli különbség alapján két populációra különíthetők el.

A tumor clearance klónspecifikus DNS alapú RQ-PCR vizsgálatakor a különböző klónok eltérő viselkedését is sikerült kimutatnunk (19. ábra). Habár egyik klón esetén sem volt detektálható MRD érték w12 és m5 esetén, d33 időpontban 1.4 log különbségig terjedő különböző tumorhígulást mértünk (5. táblázat).

Feltételezzük, hogy ez a szignifikáns különbség az egyik ill. a másik két klón között a későbbi követési időpontokban is fennállt, csak a céltarget olyan alacsony mennyiségben volt jelen, hogy az meghaladta az RQ-PCR módszer szenzitivitását.



19. ábra. Az #5 betegnél az immunglobulin nehézlánc gén klónspecifikus RQ-PCR vizsgálata során különböző hígulást mutató leukaemiás klónok jelenlétét sikerült kimutatni.

Az **A.** és **B.** ábrán az RQ-PCR reakció görbéi láthatók a két eltérő viselkedésű IGH1 és IGH2 klón esetén. A **C.** ábrán a 3 immunglobulin klón és a KDE hígulását ábrázoltuk, jól látható, hogy IGH2 esetén a másik három markertől eltérő clearance van jelen.

5. Diszkusszió

A gyermekkori acut lymphoblastos leukaemia kezelése igazi sikertörténet, a betegség 5 éves túlélése az utóbbi néhány évtized alatt alig 10%-ról napjainkra 85-90%-ra emelkedett [85, 86]. A kezelés nemzetközi protokollok ajánlásai szerint történik, melyhez a betegeket standard, közepes és magas rizikójú csoportokba sorolják [86]. 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 [108, 109].

Az MRD detektálására a klónspecifikus génátrendeződések DNS alapú RQ-PCR vizsgálatát [113], a különböző kromoszóma transzlokációk során létrejövő kiméra mRNS expressziójának RQ-RT-PCR vizsgálatát [52] és a flow citometriás immunfenotipizálást használják [114]. Amellett, hogy mindhárom módszernek ismertek az előnyei és a hátrányai [110, 144-147], 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 [130, 148]. 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 eredményeket pedig összehasonlítottuk a DNS és RNS alapú adatokkal.

A vizsgálatainkat a pALL esetek kb. 25%-át kitevő t(12;21) transzlokációt hordozó, újabban az érdeklődés középpontjába kerülő alcsoportján 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 [70-76]. Ezen ellentmondásos adatok miatt választottuk ki ezt az alsóportot az MRD vizsgálatok elvégzéséhez. 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.

A *ETV6/RUNX1* pozitív betegek RQ-PCR és RQ-RT-PCR-rel mért MRD adatainak összehasonlításával csak néhány tanulmány foglalkozik [131, 149, 150]. A DNS és az RNS alapú MRD mérések között több mint egy, vagy akár két nagyságrendbeli különbségről több munkacsoport is beszámolt [151-153].

Munkánk során 14 *ETV6/RUNX1* pozitív beteg 63 csontvelő mintáját vizsgáltuk DNS, RNS és *in situ* sejt alapú SFM módszerrel [143]. A kezelési protokolloknak megfelelően a diagnosztikus csontvelő aspirátumon kívül a következő követéses időpontokban érkeztek minták: a 15. napon, az indukciós blokk végén a 33. napon, a konszolidációs fázis megkezdése előtt a 12. héten, valamint a késői reintenzifikáció előtt az 5. hónapban. 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

[154-158]. 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.

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) [123]. Ugyanezen okból kizárható, hogy a normál, reaktív CD10+ haematogónokat detektáltuk volna, noha ismert, hogy ezek száma szignifikánsan megnő a poszt-kemoterápiás periódusban [159, 160]. 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 köldökzsínorból származó vérmintáinak retrospektív analízise során azt találták, hogy a t(12;21) transzlokáció az egyik allélon a betegek 77%-ában már születéskor jelen volt [161]. Ezek a sejtek a lymphoid őssejt és a pro-B-sejt kompartmentben rejtőzködnek, germline immunoglobulin gént hordoznak és a fúziós gén nyugalomban van [162], hasonlóan a Ph+ progenitorokhoz [163, 164]. 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 prekurzor

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 [165, 166]. Valószínű, hogy ezekből a preleukaemiás sejtekből ered az ebben a csoportban típusosan későn jelentkező relapszus, mint hogy egy valódi reziduumból alakulna ki [69, 70, 73].

A #1 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 alakult ki és csontvelő érintettsége nem volt, feltehetően helyi reziduumból alakult ki a relapszus, ennek megfelelően nála nem volt detektálható érték m5 időpontban. Ez is alátámasztja az SFM eredmények fontosságát.

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

Egy betegnél az IGH gén variábilis régiójának vizsgálata során több leukaemiás klónt sikerült azonosítani. A VDJ régiók szekvenálása megerősítette a három különböző klón 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:

1. A DNS alapú módszerrel sokkal megbízhatóbban követhető a tumor mennyiség csökkenése, mint az RNS alapú módszerrel, ugyanakkor az RQ-RT-PCR a

tumorsejtek aktivitásáról szolgált értékes információkat.

2. 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. A DNS alapú módszerrel azonosított több klón 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 elkülöníthetők, 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 kvantitatív RNS, illetve DNS PCR, valamint kombinált immunfenotípus-iFISH módszerekkel nem voltak kimutathatóak. 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 DNS alapú RQ-PCR módszerrel azonosított immunglobulin nehézlánc klónok eltérő hígulását láttuk a követés során, a klónok eltérő érzékenységgel reagáltak a terápiára. Az antigén receptor génátrendeződések és a terápiára adott válasz összefüggései további vizsgálatokat igényelnek.

7. 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 Pathológiai 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 laborléggör 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 a 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.

8. Irodalomjegyzék

1. Velpeau A. Sur la résorption du pus et sur l'altération du sang dans les malades. *Rev Med.* 1827, 2:216-8.
2. Virchow R. Weisses Blut, Froriep's Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde. 1845, 36:151-6.
3. Mukherjee S. The Emperor of All Maladies, A Biography of Cancer. Scribner, 2010.
4. Neumann E. Über die Bedeutung des Knochenmarks für die Blutbildung. *Zentralblatt für die medizinischen Wissenschaften.* 1868, 44:122.
5. Ehrlich P. Contributions to the Theory and Practice of Histological Staining. M.D. dissertation, University of Leipzig, 1878.
6. Ebstein W. Über die acute Leukämie und Pseudoleukämie. *Deutsch Arch Klin Med.* 1889, 44:343.
7. Naegeli O. Über rothes Knochenmark und Myeloblasten. *Deutsch Med Wochenschr.* 1900, 26:287.
8. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff J. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (Aminopterin). *N Engl J Med.* 1948, 238:787-93.
9. Burchenal JH, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP: Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood.* 1953, 8:965-99.
10. Farber S, Schwachman H, Toch R, Downing V, Kennedy BH, Hyde J. The effect of ACTH in acute leukemia in childhood. Proceedings of the 1st Clinical ACTH Conference, Mote JR editor, 1950, 328-30.
11. Frei E 3rd, Holland JF, Schneiderman MA, Pinkel D, Selkirk G, Freireich EJ, Silver RT, Gold GL, Regelson W. A comparative study of two regimens of combination chemotherapy in acute leukemia. *Blood.* 1958, 12:1126-48.
12. Frei E 3rd, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ, Hananian J, Selawry O, Holland JF, Hoogstraten B, Wolman IJ, Abir E, Sawitsky A, Lee S, Mills

- SD, Burgert EO Jr, Spurr CL, Patterson RB, Ebaugh FG, James GW 3rd, Moon JH. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*. 1965, 5:642-56.
13. George P, Hernandez K, Hustu O, Borella L, Holton C, Pinkel D. A study of "total therapy" of acute lymphocytic leukemia in children. *J Pediatr*. 1968, 3:399-408.
 14. Aur RJ, Simone J, Hustu HO, Walters T, Borella L, Pratt C, Pinkel D. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood*. 1971,3:272-81.
 15. Simone J, Aur RJ, Hustu HO, Pinkel D. "Total therapy" studies of acute lymphocytic leukemia in children. Current results and prospects for cure. *Cancer*. 1972, 6:1488-94.
 16. Cortes JE, Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia, A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer*. 1995; 76: 2393-2417.
 17. Török Sz, Borgulya G, Schuler D. A gyermekkori rosszindulatú daganatok gyakoriságának és túlélési mutatóinak változásai 1988 és 1997 között az Országos Gyermektumor Regiszter adatai alapján. *Orvosi Hetilap*. 2001, 142:1211-5.
 18. Török Sz, Borgulya G, Jakab Zs, Schuler D, Fekete Gy. A gyermekkori leukémiás megbetegedések epidemiológiai vizsgálata hazánkban az 1980 és 2000 közötti évre vonatkozóan. *Orvosi Hetilap*. 2002, 143:2675-9.
 19. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003, 102:2321-33.
 20. Keith L, Brown ER, Fields C, Stepto R. Age group differences of twins with leukemia. *Bibl haemat*. 1973; 39:1125-35.
 21. Schmitt TA, Degos L. Leucemias familiales. *Bull Cancer*. 1978, 1:83-8.
 22. Robison LL, Nesbit ME Jr, Sather HN, Level C, Shahidi N, Kennedy A, Hammond D. Down syndrome and acute leukemia in children: a 10-year retrospective survey from Childrens Cancer Study Group. *J Pediatr*. 1984, 2:235-42.
 23. Hecht F, Koler RD, Rigas DA, Dahnke GS, Cae MP, Tisdale V, Miller RW. Leukaemia and lymphocytes in ataxia –teleangiectasia. *Lancet*. 1966, 2:1193.

24. Stewart A, Kneale GW. Radiation dose effects in relation to obstetric x-rays and childhood cancers. *Lancet*. 1970, 1(7658):1185-8.
25. Simpson CL, Hempelmann LH, Fuller LM. Neoplasia in children treated with X-rays in infancy for thymic enlargement. *Radiology*. 1955, 6:840-5.
26. Ichimaru M, Ishimaru T, Belsky JL. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950-71: Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res*. 1978, 3:262-82.
27. McNally RJ, Eden TO. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol*. 2004, 3:243-63.
28. Kim TH, Hargreaves HK, Brynes RK, Hawkins HK, Lui VK, Woodard J, Ragab AH. Pretreatment testicular biopsy in childhood acute lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 1981, 2(8248):657-8.
29. Breatnach F, Chessells JM, Greaves MF. The aplastic presentation of childhood leukaemia: a feature of common-AL. *Br J Haematol*. 1981, 3:387-93.
30. Stass SA, Dean L, Peiper SC, Bollum FJ. Determination of terminal deoxynucleotidyl transferase on bone marrow smears by immunoperoxidase. *Am J Clin Pathol*. 1982 2:174-6.
31. Janossy G, Hoffbrand AV, Greaves MF, Ganeshaguru K, Pain C, Bradstock KF, Prentice HG, Kay HE, Lister TA. Terminal transferase enzyme assay and immunological membrane markers in the diagnosis of leukaemia: a multiparameter analysis of 300 cases. *Br J Haematol*. 1980 2:221-34.
32. Catovsky D, Cherchi M, Greaves MF, Janossy G, Pain C, Kay HE. Acid-phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1978, 1(8067):749-51.
33. Krolewski JJ, Dalla-Favera R. Molecular genetic approaches in the diagnosis and classification of lymphoid malignancies. *Hematol Pathol*. 1989, 3(2):45-61.
34. Kitchingman GR, Rovigatti U, Mauer AM, Melvin S, Murphy SB, Stass S. Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1985, 65(3):725-9.
35. Ha K, Minden M, Hozumi N, Gelfand EW. Immunoglobulin mu-chain gene rearrangement in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1984, 73(4):1232-6.

36. Pelicci PG, Knowles DM 2nd, Dalla Favera R. Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor genes. *J Exp Med.* 1985, 1;162(3):1015-24.
37. Felix CA, Poplack DG, Reaman GH, Steinberg SM, Cole DE, Taylor BJ, Begley CG, Kirsch IR. Characterization of immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol.* 1990, 8(3):431-42.
38. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
39. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009, 30;114(5):937-51.
40. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood.* 1986, 68(1):1-31.
41. 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(10):1783-6.
42. Greaves MF. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science.* 1986, 7;234(4777):697-704.
43. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993, 15;82(2):343-62.
44. Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KI. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med.* 1991, 21;324(12):800-8.
45. Kurec AS, Belair P, Stefanu C, Barrett DM, Dubowy RL, Davey FR. Significance of aberrant immunophenotypes in childhood acute lymphoid leukemia. *Cancer.* 1991 15;67(12):3081-6.

46. Hurwitz CA, Loken MR, Graham ML, Karp JE, Borowitz MJ, Pullen DJ, Civin CI. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1988, 72(1):299-307.
47. Pui CH, Hancock ML, Head DR, Rivera GK, Look AT, Sandlund JT, Behm FG. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993, 1;82(3):889-94.
48. Vogler LB, Crist WM, Bockman DE, Pearl ER, Lawton AR, Cooper MD. Pre-B-cell leukemia. A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1978, 20;298(16):872-8.
49. Bloomfield CD, Secker-Walker LM, Goldman AI, Van Den Berghe H, de la Chapelle A, Ruutu T, Alimena G, Garson OM, Golomb HM, Rowley JD, Kaneko Y, Whang-Peng J, Prigogina E, Philip P, Sandberg AA, Lawler SD, Mitelman F. Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989, 15;40(2):171-85.
50. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993, 1;81(9):2237-51.
51. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990, 15;76(8):1449-63.
52. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. 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, 1901-28.
53. Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W, Pui CH, Masera G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2000, 6;342(14):998-1006.
54. Crist W, Carroll A, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M, Behm F, Link M, Steuber P, Ragab A, Hirt A, Brock B, Land V, Pullen J. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and

- cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1990, 1;76(3):489-94.
55. Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood*. 1993, 1;81(9):2386-93.
 56. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 9;94(25):13950-4.
 57. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev*. 2005, 81(1):123-9.
 58. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002, 16(7):1233-58. Review.
 59. Parkin JL, Arthur DC, Abramson CS, McKenna RW, Kersey JH, Heideman RL, Brunning RD. Acute leukemia associated with the t(4;11) chromosome rearrangement: ultrastructural and immunologic characteristics. *Blood*. 1982, 60(6):1321-31.
 60. Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC, Head DR, Mahmoud HH, Sandlund JT, Furman WL, Roberts WM, Crist WM, Raimondi SC. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1994, 12(5):909-15.
 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, 15;85(12):3662-70.
 62. 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, 23;92(11):4917-21.
 63. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Basinko A, De Braekeleer M. ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res*. 2012, 36(8):945-61.

64. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Férec C, De Braekeleer M. RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. *Future Oncol.* 2011, 7(1):77-91.
65. Okuda T, Nishimura M, Nakao M, Fujita Y. RUNX1/AML1: a central player in hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2001, 74(3):252-7.
66. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet.* 1999, 30;354(9189):1499-503.
67. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Masera G, Harbott J, Biondi A. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *Blood.* 1997, 15;90(2):571-7.
68. Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M, Pullen DJ, Camitta B. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia.* 1998, 12(11):1764-70.
69. De Zen L, Orfao A, Cazzaniga G, Masiero L, Cocito MG, Spinelli M, Rivolta A, Biondi A, Zanescio L, Basso G. Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia.* 2000, 14(7):1225-31.
70. Rubnitz JE, Behm FG, Wichlan D, Ryan C, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Hancock ML, Relling MV, Evans WE, Pui CH, Downing JR. Low frequency of TEL-AML1 in relapsed acute lymphoblastic leukemia supports a favorable prognosis for this genetic subgroup. *Leukemia.* 1998, 13:19-21.
71. 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, 92:4792-7.
72. Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia.* 1999, 13:6-13.

73. Zuna J, Hrusák O, Kalinová M, Muzíková K, Stary J, Trka J. TEL/AML1 positivity in childhood ALL: average or better prognosis? *Leukemia*. 1999, 13:22-4.
74. 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, 90:4933-7.
75. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998, 91: 1716-22.
76. Gandemer V, Chevret S, Petit A, Vermeylen C, Leblanc T, Michel G, Schmitt C, Lejars O, Schneider P, Demeocq F, Bader-Meunier B, Bernaudin F, Perel Y, Auclerc MF, Cayuela JM, Leverger G, Baruchel A; FRALLE Group. Excellent prognosis of late relapses of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: lessons from the FRALLE 93 protocol. *Haematologica*. 2012, 97(11):1743-50.
77. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, Gaynon PS, Hirsch B, Magenis RE, McGavran L, Patil S, Pettenati MJ, Pullen J, Rao K, Roulston D, Schneider NR, Shuster JJ, Sanger W, Sutcliffe MJ, van Tuinen P, Watson MS, Carroll AJ. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007, 46(7):684-93.
78. Dastugue N, Suciú S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, Bakkus M, Pagès MP, Yakouben K, Nelken B, Uyttebroeck A, Gervais C, Lutz P, Teixeira MR, Heimann P, Ferster A, Rohrlich P, Collonge MA, Munzer M, Luquet I, Boutard P, Sirvent N, Karrasch M, Bertrand Y, Benoit Y. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 2013, 28;121(13):2415-23.
79. 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(5):734-40.
80. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, Dastugue N, Schrappe M, Pui CH, Basso G, Silverman LB, Janka-Schaub GE. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007, 15;110(4):1112-5.
 81. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, Look AT, Mahoney D, Ragab A, Pullen DJ, Land VJ. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1990, 1;76(1):117-22.
 82. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976, 33(4):451-8.
 83. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*. 1981, 47(4):553-61.
 84. Miller DR, Leikin S, Albo V, Sather H, Hammond D. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br J Haematol*. 1981, 48(2):199-206.
 85. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007, 109(3):926-35.
 86. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, Gonzalez A, Izraeli S, Janic D, Jazbec J, Konja J, Kaiserova E, Kowalczyk J, Kovacs G, Li CK, Magyarosy E, Popa A, Stark B, Jabali Y, Trka J, Hrusak O, Riehm H, Masera G, Schrappe M. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. 2014, 32(3):174-84.

87. Felice MS, Zubizarreta PA, Alfaro EM, Sackmann-Muriel F. Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001, 23(7):411-5.
88. Möricke A, Lauten M, Beier R, Odenwald E, Stanulla M, Zimmermann M, Attarbaschi A, Niggli F, Schrappe M. Prediction of outcome by early response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Klin Padiatr*. 2013, 225 Suppl 1:50-6.
89. Ribeiro RC, Pui CH. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Pathol*. 1993, 7(3):121-42.
90. Crist W, Pullen J, Boyett J, Falletta J, van Eys J, Borowitz M, Jackson J, Dowell B, Frankel L, Quddus F, Ragab A, Vietti T. Clinical and biologic features predict a poor prognosis in acute lymphoid leukemias in infants: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1986, 67(1):135-40.
91. Friedmann AM, Weinstein HJ. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncologist*. 2000, 5(4):321-8.
92. Allen A, Sireci A, Colovai A, Pinkney K, Sulis M, Bhagat G, Alobeid B. Early T-cell precursor leukemia/lymphoma in adults and children. *Leuk Res*. 2013, 37(9):1027-34.
93. Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, Zdrahalova K, Kalina T, Sterba J, Jabali Y, Mihal V, Blazek B, Cerna Z, Prochazkova D, Hak J, Zemanova Z, Jarosova M, Oltova A, Sedlacek P, Schwarz J, Zuna J, Trka J, Stary J, Hrusak O. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica*. 2010, 95(6):928-35.
94. Trueworthy R, Shuster J, Look T, Crist W, Borowitz M, Carroll A, Frankel L, Harris M, Wagner H, Haggard M, Mosijczuk A, Pullen J, Steuber P, Land V. Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1992, 10(4):606-13.
95. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, Catovsky D, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, Garwicz S, Golomb HM, Hossfeld DK, Lawler SD, Mitelman F, Nilsson P, Pierre RV, Philip P, Prigogina E, Rowley JD, Sakurai M, Sandberg AA, Secker Walker LM, Tricot

- G, Van Den Berghe H, Van Orshoven A, Vuopio P, Whang-Peng J. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1986, 67(2):415-20.
96. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, Veerman AJ. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. *Blood*. 1995, 1;85(3):751-6.
 97. 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(4):864-71.
 98. Raimondi SC, Roberson PK, Pui CH, Behm FG, Rivera GK. Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*. 1992, 15;79(12):3245-52.
 99. Raimondi SC, Pui CH, Head D, Behm F, Privitera E, Roberson PK, Rivera GK, Williams DL. Trisomy 21 as the sole acquired chromosomal abnormality in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1992, 6(3):171-5.
 100. Pui CH, Williams DL, Raimondi SC, Rivera GK, Look AT, Dodge RK, George SL, Behm FG, Crist WM, Murphy SB. Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1987, 70(1):247-53.
 101. Betts DR, Kingston JE, Dorey EL, Young BD, Webb D, Katz FE, Gibbons B. Monosomy 20: a nonrandom finding in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990, 2(3):182-5.
 102. Gibbons B, MacCallum P, Watts E, Rohatiner AZ, Webb D, Katz FE, Secker-Walker LM, Temperley IJ, Harrison CJ, Campbell RH, Nash R, Broadbent V, Chessells JM. Near haploid acute lymphoblastic leukemia: seven new cases and a review of the literature. *Leukemia*. 1991, 5(9):738-43.
 103. Rák K. Minimális reziduális betegség a hematológiában. *Orv Hetil*. 2001, 142(21):1091-5.
 104. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of

- minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998, 352: 1731-8.
105. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú 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. *N Engl J Med*. 1998, 339: 591-8.
 106. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000, 96:2691-6.
 107. Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000, 14:783-5.
 108. Jacquy C, Delepaut B, van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermeylen C, Cornu G, Martiat P. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol*. 1997, 98: 140-6.
 109. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA, Bartram CR, van Dongen JJ, Panzer-Grümayer ER. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*. 2000, 14:1939-43.
 110. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol*. 2001, 2:409-17.
 111. Björklund E, Mazur J, Söderhall S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2003, 17:138-48.
 112. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden VH, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR; International BFM Study Group (I-BFM-

- SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008, 22(4):771-82.
113. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. 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, 13:110-8.
 114. Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T Bjorklund E, Biondi A, van den Beemd MW, Baars E, Vidriales B, Parreira A, van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. *Leukemia*. 2001, 15:1185-92.
 115. Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJ, Szczepański T. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2002, 162-92.
 116. Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009, 23(5):1083-98.
 117. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999, 15;38(4):139-52.
 118. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, Bugarin C, Veltroni M, Michelotto B, Ratei R, Coliva T, Valsecchi MG, Biondi A, Dworzak MN; I-BFM-ALL-FCM-MRD Study Group. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia*. 2005, 19(1):49-56.
 119. Bocsi J, Varga VS, Molnár B, Sipos F, Tulassy Zs, Tárnok A. Scanning fluorescent microscopy analysis is applicable for absolute and relative cell frequency determinations. *Cytometry A*. 2004, 61A: 1-8.

120. Méhes G, Lörch T, Ambros PF. Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis. *Cytometry*. 2000, 42: 357-62.
121. Méhes G, Ambros PF, Gardner H. Detecting disseminated solid tumor cells in hematopoietic samples: methodological aspects. *Haematologia*. 2001, 31: 97-109.
122. Kajtár B, Méhes G, Lorch 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: 506-14.
123. 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.
124. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003, 17(6):1013-34.
125. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grümayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007, 21(4):604-11.
126. Beishuizen A, Hählen K, Hagemeijer A, Verhoeven MA, Hooijkaas H, Adriaansen HJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. *Leukemia*. 1991, 5(8):657-67.
127. 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, 1;99(7):2315-23.
128. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007, 21(4):622-6.
 129. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003, 17(12):2318-57.
 130. 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, 7:1969-75.
 131. Hermans A, Gow J, Selleri L, von Lindern M, Hagemeyer A, Wiedemann LM, Grosveld G. Bcr-abl oncogene activation in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988, 2:628-33.
 132. Madzo J, Zuna J, Muzíková 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, 97:105-13.
 133. Szczepanski 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, 99:2315-23.
 134. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assesment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997, 11:2192-99.

135. Falus A. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. Semmelweis kiadó, Budapest, 1996.
136. Gauss GH, Lieber MR. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol.* 1996, 16(1): 258–69.
137. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000, 7:203-14.
138. Lefranc MP, Giudicelli V, Kaas Q, Duprat E, Jabado-Michaloud J, Scaviner D, Ginestoux C, Clément O, Chaume D, Lefranc G. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system[®]. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:593-7.
139. 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, 14:1426-35.
140. 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, 98:2456-65.
141. 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, 16:928-36.
142. Pongers-Willemse MJ, Verhagen OJ, Tibbe GJ, Wijkhuijs AJ, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE, Van Dongen JJ. Real-time quantitative PCR detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia.* 1998, 12:2006-14.
143. 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(1):158-60.
144. Wasserman R, Yamada M, Ito Y, Finger LR, Reichard BA, Shane S, Lange B, Rovera G. V_H gene rearrangement events can modify the immunoglobulin heavy chain during progression of B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1992, 79:223-8.

145. Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, Hählen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: Implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1994, 83:2238-47.
146. Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, van Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJ. Precursor-B-ALL with D_H-J_H gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia*. 2001, 15:1415-23.
147. van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, van Wering ER, van Dongen JJ. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 2003, 17:1834-44.
148. Hennerbichler S, Méhes G, Schmied R, Wintersteiger R, Dohr G, Ambros P Sedlmayr P. Detection and relocation of rare events. A comparative study using the laser scanning cytometer and the Metafer/RCDetect microscope scanning system. *J Biochem Biophys Methods*. 2002, 53:109-15.
149. 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.
150. Drunat S, Olivi M, Brunie G, Grandchamp B, Vilmer E, Bieche I, Cavé H. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2001, 114:281-9.
151. Taube T, Eckert C, Körner G, Henze G, Seeger K. Real-time quantification of TEL-AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods. *Leuk Res*. 2004, 28:699-706.
152. Fronkova E, Madzo J, Zuna J, Reznickova L, Muzikova K Hrusak O, Stary J, Trka J. TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can

- complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia*. 2005, 19:1296-7.
153. Metzler M, Mann G, Monschein U, Lodzinski M, Gall C, Flohr T, Viehmann S, Langer T, Schrappe M, Gadner H, Haas OA, Panzer-Grümayer ER. 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, 91:683-6.
 154. 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-alpha. *Br J Haematol*. 1995, 91:126-31.
 155. 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, 87:2588-93.
 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 alpha therapy? *Leukemia*. 1998, 12:1076-80.
 157. Pajor L, Vass JA, Kereskai L, Szuhai K, Molnár L, Jáksó P. Silent Philadelphia chromosome: A distinct developmental stage in a Philadelphia chromosome-positive chronic myeloproliferation? *Cancer Genet Cytogenet*. 2000, 118:14-9.
 158. 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, 9:174-9.
 159. van Lochem EG, Wiegers YM, van den Beemd R, Hahlen K, van Dongen JJ, Hooijkaas H. Regeneration pattern of precursor-B-cells in bone marrow of acute lymphoblastic leukaemia patients depends on the type of preceding chemotherapy. *Leukemia*. 2000, 14:688-95.
 160. van Wering ER, van der Linden-Schrever BE, Szczepanski T, Willemse MJ, Baars EA, van Wijngaarde-Schmitz HM, Kamps WA, van Dongen JJ. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute

- lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol.* 2000, 110:139-46.
161. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene.* 2004, 23:4275-83.
 162. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, van Delft FW, Bateman CM, Titley I, Kearney L, Szczepanski T, Gonzalez D, Ford AM, Potter NE, Greaves M. Clonal origins of ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia.* 2015, 29(4):839-46.
 163. 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, 81:2898-902.
 164. 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, 83:1744-9.
 165. Konrad M, Metzler M, Panzer S, Östreicher I, Peham M, Repp R, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grümayer 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, 101:3635-40.
 166. Pine SR, Wiemels JL, Jayabose S, Sandoval C. TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2003, 27:155-64.

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

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

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:

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:

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.

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.

László R, Alpár D, Kajtár B, Lacza Á, Jáksó P, Pajor L. A minimális reziduális betegség DNS, RNS és sejt alapú komplex analízise gyermekkori akut lymphoblastos leukemiában. Magyar Humángenetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. nov. 11-13.

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.

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

10. Egyéb publikációk

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.

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.

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.

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.

Idézhető absztraktok:

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.

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.

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.

Kereskai L, Jáksó P, **László R**, Kálmán E, Pajor L. A malignus lymphomák aspirációs cytológiai diagnosztikájának lehetőségei. *Hematológia-Transzfuziológia*. 2006, 1. Suppl., 39:26.

Előadások:

B Kajtár, D Alpár, J Tóth, **R László**, P Jáksó, L Kereskai, Z Nagy, L Pajor. Factors of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. International Society of Haematology, European & African Division. Budapest, 2007. aug. 29-szept. 2.

Kereskai L, Jáksó P, **László R**, Kálmán E, Pajor L. A malignus lymphomák aspirációs cytológiai diagnosztikájának lehetőségei. Malignus Lymphoma Konferencia. Győr, 2006. ápr. 6-8.

Kajtár B, **László R**, Pajor G, Alpár D. Cytológiai minták virtuális-szimultán pheno- és genotypus vizsgálata pásztázó fluoreszcens mikroszkópiával. 64. Pathológus Kongresszus. Pécs, 2005. szept. 22-24.

Poszter:

Alpár D, Kajtár B, Tóth J, **László R**, Pajor L. Dupla fúziós és disszociációs FISH szondák automatizált értékelése paraffinos metszeteken. 66. Pathológus Kongresszus. Balatonfüred, 2007. okt. 4-6.

B Kajtár, J Tóth, D Alpár, P Jáksó, L Kereskai, **R László**, Z Nagy, L Pajor. Simultaneous appearance of +8 in Ph⁺ and Ph⁻ cells during imatinib treatment of

CML: a report of two cases. International Society of Haematology, European & African Division. Budapest, 2007. aug. 29-szept. 2.

D Alpár, B Kajtár, J Tóth, Z Nagy, P Jáksó, **R László**, L Kereskai, L Pajor. Automated evaluation of dual fusion and breakapart FISH probes on paraffin-embedded tissue sections. International Society of Haematology, European & African Division. Budapest, 2007. aug. 29-szept. 2.

László R, Ujj Gy, Szabó É, Krasznai G, Pajor L. Atípusos subcutan panniculitis-szerű T-sejtes lymphoma. Malignus Lymphoma Konferencia. Budapest, 2004. jún. 3-5.