

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A véralvadási XIII faktor A alegység (FXIII A)
kifejeződése gyermekkori B-sejt progenitor akut
limfoblasztos leukémiában**

Gyurina Katalin

Témavezető: Prof. Dr. Kiss Csongor



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2022

**A véralvadási XIII faktor A alegység (FXIII A) kifejeződése gyermekkori B-sejt
progenitor akut limfoblasztos leukémiában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Klinikai Orvostudományok tudományágban*

Írta: Gyurina Katalin okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Hematológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Kiss Csongor

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Takács István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
Dr. Alizadeh Hussain, PhD
Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Takács István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet
tanterme, 2023. január 25. 13:00

1. BEVEZETÉS

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII) felfedezése óta élénken foglalkoztatja a kutatókat a szervezetben betöltött szerepe. A véralvadási és sebgyógyulási folyamatokban játszott biológiai funkciója számos tekintetben tisztázott. A FXIII kifejeződésének, termelődésének és funkciójának tanulmányozása a koagulációs kaszkád szempontjából váratlan, szokatlan, egészséges és patológiás szövetekben, így egyebek mellett a corneában és neoplasztikusan transzformált vérképző sejtekben a FXIII-kutatás viszonylag új területe. Utóbbiak közül az értekezés kiemelten foglalkozik a FXIII A alegység (FXIII-A) kifejeződésével leukémia sejtekben.

A leukémia a gyermekkor leggyakoribb rosszindulatú megbetegedése. [1] Az elmúlt 60 évben a gyermekkori leukémia gyógyulási aránya látványosan javult. Az 1960-as évek előtt csaknem kivétel nélkül fatális betegség tartós túlélési aránya napjainkban csaknem 80%. [2] A dinamikus fejlődés hátterében az egyre intenzívebbé váló kombinált kemoterápia állott. Ez a terápiás stratégia az egyre finomabb prognosztikai becslésen alapuló kockázat-arányos kezelési módok irányában fejlődött. A kockázati tényezők között egyre nagyobb a genetikai eltérések jelentősége, amelyek alapján egyértelműen osztályozhatók a leukémia alcsoportok. Még pontosabb a kockázat-becsléssel és célzott kezelési módszerek alkalmazásával egyre kiterjedtebb lehetőség kínálkozik a személyre szabott terápiás szemlélet érvényesítésére. A gyermekkori leukémia mintegy 70%-át a B-sejt prekursor akut lymphoblastos leukémia (BCP-ALL) teszi ki, 90% feletti tartós túléléssel társulva.

Az FXIII-A alegység kifejeződését BCP-ALL limfoblasztokban elsőként munkacsoportunk írta le 2006-ban. A kifejeződést molekuláris biológiai módszerek mellett áramlási citometriával (FC) sikerült igazolni. Az FC módszerrel százalékosan megadható a FXIII-A molekulát

kifejező leukémiás blaszt sejtek aránya, melynek köszönhetően a betegek a FXIII-A kifejeződés tekintetében csoportokra bonthatók. A kutatási eredményeket figyelembe véve a BCP-ALL-es esetekben megfigyelhető FXIII-A kifejeződési arány prognosztikai jelentőséggel rendelkezhet, mely feltehetően genetikai eltérésekkel társulva befolyásoló tényező lehet a gyógyulás kimenetelére. Az értekezésben gyermekkori BCP-ALL esetekben megfigyelhető FXIII-A kifejeződés és a mögötte álló genetikai elváltozások vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket foglaljuk össze.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A XIII-as véralvadási faktor és biológiai funkciója

A XIII-as véralvadási faktort „fibrinstabilizáló faktorként” Lóránd László és Laki Kálmán azonosította elsőként. [3, 4] Az eltelt több mint 70 év kutatómunkájának jelentős eredményei alapján csaknem minden részletében tisztázott a FXIII véralvadásban betöltött szerepe.

A plazmában keringő FXIII két A alegységből (FXIII-A) és két B-alegységből (FXIII-B) felépülő heterotetramer (FXIII-A₂B₂). A transzglutamináz aktivitással rendelkező fehérje a véralvadási kaszkád utolsó lépésében keresztkötésekkel stabilizálja a trombin hatására képződő fibrin monomereket. A B-alegység karrier fehérjeként működik, az enzimaktivitást az A-alegység fejti ki. [5]

Biológiai funkcióját tekintve a FXIII-A-nak szerepe van olyan folyamatokban, mint a sebgyógyulás, a fagocitózis, valamint a csont- és kötőszöveti mátrixállomány átalakítása. [6] Az utóbbi két évtized felismerése, hogy a FXIII-A alegység malignusan transzformált sejtekben és szövetekben is kifejeződik. Így azonosították szájüregi nyálkahártya daganatokban [7], promyelocitás leukémiában [8], akut myeloid leukémiában [9], Hodgkin limfómában [10], leukémiás limfoblasztokon. [11]

2.2. A FXIII-A kifejeződése leukémiában

Invernizzi R. és munkatársai 1992-ben vetették fel a lehetőségét annak, hogy a FXIII-A akut leukémia karakterizálásában szerepet tölthet be. Vizsgálataik során megállapították, hogy a myelomonocitás és a monocitás blasztok cFXIII-A kifejeződése korrelációban van a monocita-specifikus antigénekkal és a citokémiai markerekkel. [12] Kappelmayer J. és munkatársai 2005-ben vizsgálták a FXIII-A kifejeződését akut myeloid leukémiában. Myelomonocitás és monocitás akut myeloid leukémiában az estek több mint 50%-ban kifejeződött a FXIII-A. Így elmondható, hogy a FXIII-A megbízható intracitoplazmatikus markernek tekinthető a monocita és megakaryocita típusok esetében, és jelenléte nagymértékben prediktív mono- és megakariocita AML-re, valamint CMML-re nézve. [9]

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja a BCP-ALL-es gyermekbetegek fehérje szintű FXIII-A kifejeződésének nyomonkövetése áramlási citometriai módszer segítségével, valamint az azonosított FXIII-A csoportok genetikai hátterének tanulmányozása molekuláris genetikai vizsgálómódszerekkel.

A hipotéziseinknek alapot szolgáló kérdéseink a következők voltak:

- A FXIII-A kifejeződés mértéke hogyan viszonyul a BCP-ALL-es betegek egyéb prognosztikai faktoraihoz, ismert LAIP-okhoz, valamint a teljes és az eseménymentes túléléshez?
- Azonosíthatók-e az *F13a1* génexpresszióhoz kapcsolatan egyéb genetikai eltérések? Amennyiben igen, az hogyan befolyásolja a betegek túlélését, terápiára adott válaszát?
- A FXIII-A csoportok között van-e olyan, amely a még nem azonosított 'B-other' genetikai alcsoporttal kapcsolatba hozható? Amennyiben igen, alkothat-e külön alcsoportot a 'B-other' eseteken belül?
- A FXIII-A áramlási citometriai módszerrel mért értéke lehet-e prognosztikai faktor gyermekkori BCP-ALL-es esetekben?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Retrospektív vizsgálatok

4.1.1. A tanulmányba bevont betegek, az adatok gyűjtése, kezelése

Retrospektív vizsgáltunkba 55 BCP-ALL-el diagnosztizált beteget vontunk be. A kiválasztott 1-18 év közötti gyermekbetegek 2003 és 2011 között lettek BCP ALL-el diagnosztizálva, 48 beteg a Debreceni Egyetemen, 7 beteg a Borsod-Abaúj-Zemplén megyei Egyetemi Kórházban. Kezelésük a BFM ALL-IC 2002-es protokoll szerint történt. A csontvelői minták a rutin diagnosztikai eljárásnak megfelelően aspirációt követően EDTA-t tartalmazó csövekben voltak gyűjtve. A diagnóziskor gyűjtött csontvelői minták mind az 55 esetben analizálva lettek, míg a 15. napi csontvelői mintákból 42 esetben volt utánkövetés.

4.1.2. Immunfenotípus meghatározás

Az áramlási citometriai vizsgálatokat a FACSCalibur áramlási citometriai készülékkel (Becton Dickinson, San Jose, CA), négy-színű festési eljárással végeztük. A sejtfelszíni és a citoplazmatikus festési eljárásokat a standard protokolloknak megfelelően monoklonális antitestekkel végeztük. A FXIII-A kifejeződését fluorescens isothiocianáttal (FITC) konjugáltatott monoklonális antitesttel mértünk (Sigma, St. Louis Mo). [13] Az egyes betegek leukémiás klónját abban az esetben tekintettük pozitívnak a különböző immunfenotípus markerek tekintetében, amennyiben az adott marker a sejtek legalább 20%-ban kifejeződött. Az MRD meghatározás céljából 300,000 eseményt detektáltunk. [14] Az FC adatok gyűjtését és analizálását a CellQuest 3.2 (Becton Dickinson, San Jose, Ca) és a FACS Diva (Becton Dickinson, San Jose, Ca) szoftverek segítségével végeztük el.

4.1.3. Kromoszóma analízis és fluoreszcens *in situ* hibridizációs eljárások (FISH)

A G-sávozást a standard protokolloknak megfelelően végeztük el. A kariotípus meghatározás az „International System of Human Cytogenetic Nomenclature” alapján történt. [15] A FISH eljárásokat a gyártói leírásoknak megfelelően sejtszuspenzióból történő kromoszóma preparációval végeztük LSI *MLL* DC, BA; LSI *BCR/ABL* DC, DF és *TEL/AML1* DC, SF, ES (Abbot/Vysis, Downers Grove, IL) transzlokációs próbákat alkalmazva. A sejtek DAPI-val (4,6-diamidio-2phenylindole) lettek megfestve. A protokollnak megfelelően 200 interfázisos sejtet vettünk alapul minden beteg esetében. A képeket fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Zaventem, Brüsszel) készítettük, majd az eredményeket ISIS szoftver (Metasystems, Altlussheim, Németország) segítségével analizáltuk. A betegeket a WHO szerinti genetikai csoportokba soroltuk.

4.1.4. Statisztikai analízis

Az adatokat a Shapiro-Wilk teszt segítségével osztályoztuk. A két csoport esetében a parametrikus elemzéshez a Student's t-tesztet, a nem parametrikus vizsgálatokhoz a Mann-Whitney U tesztet használtuk. Amennyiben a p-érték <0.05 volt, úgy az eredményt szignifikánsnak tekintettük. Pearson's Chi négyzet tesztet használtunk két kategória közötti variabilitás és logisztikus regresszió megállapítására, valamint a multivariancia elemzés elvégzésére.

A túlélési mutatók számításában a Kaplan-Meier-féle túlélési analízist használtuk, a túlélési görbéket a log-rank teszt segítségével készítettük el. Cox-féle regressziószámítást végeztünk, mely esetében a relatív hazard érték mellett a 95%-os megbízhatósági határt is megadtuk. A statisztikai analízisek az SPSS 20.0 biostatistikai programmal végeztük.

4.2. Prospektív vizsgálatok

4.2.1. A tanulmányba bevont betegek, az adatok gyűjtése, kezelése

A prospektív vizsgálatba 408 BCP-ALL-el kezelt beteg csontvelői mintáját és klinikai adatait gyűjtöttük lengyel (188), magyar (114), szlovák (13) centrumokból, melyek az ALLIC tanulmányban vettek részt, valamint az AIEOP-BFM tanulmányban részt vevő osztrák (93) centrumból 2011 és 2018 között. Azokat a betegeket, akik Down-szindrómával, t(9;22) genetikai eltéréssel rendelkeztek, valamint a csecsemő korú betegeket nem vettük bele a vizsgálatba. Az immunfenotípust valamennyi beteg esetében FC-val határoztuk meg. A kezelés 15. napján valamennyi beteg esetében FC módszerrel csontvelői minta vizsgálata alapján MRD meghatározás történt. A 408 betegből 310 esetben volt módunk a teljes genetikai profil meghatározására. Ezeket a mintákat a regressziós analízisbe vontuk be. Ötvenkilenc debreceni és budapesti centrumokban kezelt beteg esetében végeztünk multiplex ligációfüggő próbaamplifikációt (MLPA) kópiaszám eltérések (CNA) vizsgálata céljából. A betegek közül 6 magyar, 8 lengyel és 2 szlovák beteg esett át allogén csontvelőtranszplantáción.

A lengyel, szlovák és magyar betegek az ALL IC-BFM 2009 tanulmány alapján voltak kezelve, míg az osztrák betegek a AIEOP-BFM 2009 tanulmány szerint. Az eltérő kezelési protokollok miatt a bécsi centrumból származó mintákat csak a kezdeti eltérések és a FXIII-A kifejeződés közötti összefüggések analíziséhez használtuk fel. A FXIII-A kifejeződés és a túlélési adatok összehasonlításához csak az azonos kezelési protokollal kezelt betegeket vizsgáltuk meg. A lengyel, szlovák és magyar esetek között összesen 21 visszaesést detektáltunk. A visszaesett ALL-es betegek az ALL-REZ BFM 2002 protokoll alapján voltak kezelve (ClinicalTrials.gov azonosító:NCT00114348). A diagnosztikus rizikó besorolást, valamint a 8. napi perifériás vérből megállapított prednisolon választ az ALL IC-BFM 2009 tanulmány alapján végeztük. Az alacsony hypodiploid (<45 kromoszómaszám) és az iAMP21 genetikai eltéréssel rendelkező eseteket a magas kockázati csoportba (BFM-HR) csoportosítottuk az ALL IC-BFM 2009

tanulmány elveinek megfelelően. A 15. napi csontvelő mintákon FC-MRD meghatározást végeztünk. Az MRD eredmények alapján három rizikócsoporthat különítettünk el: alacsony rizikójú csoport (FLR), közepes rizikó csoport (FMR) és magas rizikó csoport (FHR). A standard rizikó csoportba (BFM-SR) azok az estek kerültek, amelyek FLR státusszal és konvencionális rizikó faktorok szerinti SR besorolással rendelkeztek. Azok a betegek, akik a FMR, illetve FHR státusszal rendelkeztek, a betegség kórismézésekor, illetve a 8. napi prednisolon-válasz alapján, konvencionális módszerekkel meghatározott, esetleg kedvezőbb kockázati csoportból az intermedier rizikó csoportba (BFM-IR), illetve a magas rizikó (BFM-HR) kerültek, rendre.

Az ALL IC-BFM 2009 tanulmányban alkalmazott „standard” terápiás karok az ALL IC-BFM 2002 tanulmány karjaival azonosak voltak. A magyar és a szlovák betegek randomizálva voltak. A BFM-IR és a BFM-HR csoportba tartozó betegek vagy az ALL IC-BFM 2002-es tanulmánynak megfelelő standard korai intenzifikációban részesültek, vagy egy „augmentált” korai intenzifikációt kaptak a BFM és a Gyermek Tumor Csoport (CCG) által javasolt protokollnak megfelelően. [16, 17] Azok a betegek, akik IR BCP-ALL-lel lettek diagnosztizálva 2 g/m² methotretaxe (Mtx) kezelést kaptak az ALL IC-BFM 2002-es tanulmánynak megfelelően vagy 5 g/m² methotretaxe (Mtx) adagot az ALL-BFM 86 protokoll szerint a konszolidációs fázisban. A lengyel betegek esetében nem történt randomizálás: a BFM-IR és a BFM-HR csoportba tartozó betegek standard korai augmentált intenzifikációt kaptak. Az IR BCP-ALL-es betegek 2 g/m² methotretaxe (Mtx) kezelést kaptak.

4.2.2. Immunfenotípus meghatározás

A mintákat 5-8 színű festési eljárással FacsCantoII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) és Navios and FC-500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) áramlási citometriai készülékekkel analizáltuk. A sejtvonal meghatározás a EGIL kritérium alapján történt. [18] A sejtfelszíni és a citoplazmatikus festési eljárásokat a standard protokolloknak megfelelően

monoklonális antitestekkel végeztük. A FXIII-A kifejeződését fluoreszcens isothiocianáttal (FITC) konjugáltatott monoklonális antitesttel mértünk. Az FXIII-A meghatározás érzékenységének vizsgálatához a FXIII-A kifejeződés százalékos meghatározásához a maradék limfoblasztokban három párhuzamos sorozathígítást végeztünk (10X, 100X, 1000X). Az FXIII-A kifejeződés százalékos aránya a maradék limfoblasztokban egyértelműen megbecsülhető volt, amikor a limfoblasztok aránya 0,04% felett volt.

Minden központ ugyanolyan csöveket használt a FXIII-A meghatározáshoz. Valamennyi immunfenotípus markert, így az FXIII-A jelölődést 20%, vagy azt meghaladó küszöbérték fölött pozitívnak. Az FXIII-A kifejeződés jelentőségének részletesebb vizsgálatához, három csoportot határoztunk meg: BCP-ALL FXIII-A negatív blasztokkal (<20% FXIII-A pozitív limfoblasztok; FXIII-A negatív csoport), BCP-ALL FXIII-A mérsékelten pozitív kifejeződéssel (20-79% FXIII-A pozitív limfoblasztok; FXIII-A dim csoport) és BCP-ALL FXIII-A erősen pozitív kifejeződéssel (80% FXIII-A pozitív limfoblasztok; FXIII-A bright pozitív csoport). Kontrollnak normál limfoblasztokat használtunk. Az FC adatok FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vagy Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) szoftverek segítségével lettek kielemezve. Az áramlási citométerek kontrollja a Cytometer Setup&Tracking (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vagy a Flow Check Pro (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) fluoreszcens mikrogöngyökkel történt. A vizsgálatban részt vevő összes laboratórium részt vett a UK-NEQAS Leukocyte Immunophenotyping MRD programban, valamint sikeresen teljesítették az ALLIC Annual Ring Trials-t. [19]

4.2.3. Genetikai vizsgálatok

A csontvelői mintákat 24 órán belül a standard protokollnak megfelelően feldolgoztuk. FISH meghatározáshoz az áramlási citometriai vizsgálatokhoz használt csontvelői mintákat használtuk, valamint a gyártók által ajánlott próbákat. Az alacsony rizikójú csoportba soroltuk a t(12;21)/ETV6-RUNX1 átrendeződéssel rendelkező vagy magas hyperdiploiditással (51-65

kromoszóma) rendelkező eseteket. A magas rizikójú csoportba az *MLL* transzlokációval rendelkező, *iAMP21* genetikai eltéréssel rendelkező, komplex kariotípussal rendelkező közel haploid (23-29 kromoszóma) vagy alacsony hypodiploid (<45 kromoszóma) eseteket. A közepes rizikójú csoportba kerültek a t(1;19)-es esetek, valamint azok a genetikai eltérések, amelyek sem az alacsony sem a magas rizikójú csoportba nem illettek be, beleértve a 'B-other' genetikai alcsoportot is.

A csontvelői mintákból a DNS-t QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Németország) használatával nyertük ki. Az MLPA vizsgálatokhoz SALSA MLPA P335-B2 ALL-IKZF1 (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) próbákat használtunk. A kópiaszám eltérések szempontjából három csoportot különítettünk el: jó prognosztikai csoportba tartoznak azok az esetek, ahol a nem volt detektálható deléció az *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *BTG1*, *EBF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RBI* génekben vagy izolált deléció volt megfigyelhető az *ETV6*, *PAX5*, *BTG1*, *ETV6* gének esetében valamint további egyetlen deléció volt detektálható a *BTG1*, *PAX5*, vagy *CDKN2A/B* génekben; közepes kockázati csoportba tartoztak azok az esetek, ahol a *CDKN2A/B* génben történt deléció vagy kombinációban a *CDKN2A/B/PAX5* génnel jelent meg a deléció; rossz prognosztikai csoportba soroltuk azokat az eseteket, ahol *IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*, *RBI* génekben jelent meg deléció, illetőleg minden olyan genetikai elváltozást, amely a fentebbi csoportokban nem illettek bele. [20-23]

4.2.4. Statisztikai analízis

Az adatokat a Shapiro-Wilk tesz segítségével osztályoztuk. A két csoport esetében a parametrikus elemzéshez a Student's t-tesztet, a nem parametrikus vizsgálatokhoz a Wilcoxon teszt használtuk. Abban az esetben, ahol több mint két csoportot elemeztünk a Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztuk. A Dunn's többszörös összehasonlítása tesztet post hoc tesztként alkalmaztuk. A betegek kezdeti paramétereit, mint például az életkor és a fehérvérsejtszám, kategorikus változókká alakítottuk át prognosztikai hatásuk alapján. A dichotóm kategorikus

változókat Pearson's Chi-négyzet teszttel hasonlítottuk össze, multinomiális logisztikus regresszió módszerrel elemeztük a több változós eseteket. Amennyiben a p-érték <0.05 volt, úgy az eredményt szignifikánsnak tekintettük. A túlélési mutatók számításában a Kaplan-Meier-féle túlélési analízist használtuk. Hazard érték (HR) és a 95%-os megbízhatósági határ (CI) mellett Cox-féle regressziószámítást végeztünk. Az eseménymentes túlélés elemzésének végpontját az ALL diagnózisa és az első visszaesés vagy halál között eltelt idővel határoztuk meg. A statisztikai elemzésekhez és a képek szerkesztéséhez a STATA/IC 14.2 (College Station, TX, USA), az SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) és a GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) statisztikai programokat használtuk.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok

4.3.1. A tanulmányba bevont betegek, a minták gyűjtése, kezelése génexpressziós vizsgálatokhoz

Munkánk során génexpressziós vizsgálatok elvégzéséhez országosan gyűjtöttük a csontvelői betegmintákat 2015-2018 között. A vizsgálat engedélyezését az ETT TUKEB a 43033-1/2014/EUK (423/2014) számon adta meg.

Összesen 71 újonnan diagnosztizált BCP-ALL-es beteg csontvelői mintáját választottuk ki az analízis elvégzéséhez. A kizárási kritériumok között szerepelt az <1 életévét be nem töltött beteg, a Down-szindrómával halmazott BCP-ALL, valamint Ph+-ALL.

4.3.2. A betegminták feldolgozása MicroArray analízis elvégzéséhez

A diagnózis idején történt csontvelői aspirátumból 2 ml mennyiséget PAXgene Blood RNA (PreAnalytix, Hombrechtikon, Svájc) csövekbe gyűjtöttünk, melyből PAXgene Blood miRNA kit (PreAnalytix, Hombrechtikon, Svájc) segítségével nyertük ki a minőségileg és mennyiségileg is megfelelő RNS extraktumot. [24] A 71 betegmintából 42 esetben (14 FXIII-A negatív; 21 közepesen FXIII-A pozitív (FXIII-A dim); 7 erősen FXIII-A pozitív (FXIII-A

bright)) volt eredményes az izolálás, melyet Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) segítségével minőségi ellenőrzésnek is alávetettünk. Az analízist követően azokat a mintákat vittük fel a MicroArray chip-ekre, melyek RIN (RNA integrity number) értéke elérte vagy meghaladta 8,0 határt.

4.3.3. Az immunfenotípus és a kromoszóma analízis, valamint a FISH vizsgálatok a retrospektív és a prospektív tanulmányok esetében egyaránt az ismertetett módszerekkel kerültek elvégzésre.

4.3.4. MicroArray és gén ontológiai analízis

Affymetrix GeneChip Human Primeview array segítségével 28.869 jól definiált gén kifejeződési mintázatát elemeztünk. 3'IVT Expression kitet (Affymetrix) valamint GeneChip WT Terminal Labeling and Control kitet (Affymetrix) használtunk 250 ng RNS minta amlifikációjához és azonosításához. A mintákat 16 órán keresztül 45°C-on hibridizáltuk, majd a standard mosási protokollnak megfelelően készítettük elő GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) génchipe történő felvitelhez. A mintákat a GeneChip Scanner 7G (affymetrix) készülék segítségével elemeztük. A kapott nyers adatokat a NCBI's Gene Expression Omnibusba töltöttük fel, ahol a GEO adatbázisban a GSE134480 azonosító szám alatt nyilvánosan hozzáférhető (<https://ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE134480>).

A gén ontológiai analízist (GO) Cytoscape 3.4.0 szoftver (cytoscape.org) segítségével a ClueGo applikáción keresztül végeztük el. Az adatok vizsgálatának beállításai alapján a GO biológiai funkciókat és a GO immunológiai rendszerhez kapcsolatos megjelenő funkciókat állítottuk be. Statisztikai analízishez a kétoldalú hypergeometrikus tesztet és a Benjamini-Hochberg FDR tesztet használtuk. Szignifikáns GO kategóriának fogadtuk el azokat, melyek p-értéke <0.05 és a κ értéke <0.4 volt.

4.3.5. Azonosított gének valós idejű minőségi polimeráz láncreakcióval (RT-Q-PCR) történő validálása, azok *in silico* vizsgálata

A microarray vizsgálatok során kapott adatokat RT-Q-PCR eljárással validáltuk. Az elemzéshez 384-lyukú TaqMan alacsony-denzitású assay-t (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk, minden minta esetében duplikátum formában. Validálásra a géneket két szempont alapján választottuk ki: 1) a microarray analízis során kapott fold-change értékeket alapul véve azokat a géneket választottuk ki melyek fold-change >2.0 volt; 2) a GO adatbázis alapján azonosított biológiai funkcióval rendelkező géneket. Az RT-Q-PCR reakciók esetén a normalizálást *B2M*, *GAPDH* és *GUSB* referencia génekre nézve vizsgáltuk. A gének kifejeződésének értékeit a ΔC_t értékek alapján normalizáltuk. A *F13a1* génnel egyidejűleg kifejeződő validált géneket a STRING v11. [25] és a GeneHancer [26] szoftver alkalmazásával vizsgáltuk.

4.3.6. Statisztikai analízis

A tanulmány során a microarray adatokat Genespring GX14.9.1 szoftverrel (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) analizáltuk. Volcano plot analízissel választottuk ki a statisztikailag szignifikáns géneket. Az affymetrix vizsgálat során kapott adatokat a Robust MultiArray Average szoftverbe konvertáltuk, mellyel a normalizációt végeztük el. Az azonosított differenciáltan kifejeződő (DE) géneket ANOVA, Tukey post-hoc [27], mérsékelt T-teszt és Benjamini-Hochberg FDR tesztekkel vizsgáltuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Retrospektív vizsgálatok eredményei

A vizsgálatba bevont 55 ALL-es beteg közül 18 esetet találtunk FXIII-A negatívnak és 37 mintát FXIII-A pozitívnak. A FXIII-A kifejeződés mintázata különböző volt a két csoportban. A FXIII-A pozitivitás cut-off-ját 20%-ra állítottuk be, ennek megfelelően a betegeket 2

csoportra, FXIII-A pozitív és FXIII-A negatív csoportra bontottuk. Az FC rizikócsoportokat a 15. napon FC-vel mért a MRD státusz alapján különítettük el. A genetikai rizikó csoportokat, a 'B-other' genetikai alcsoportot és a rizikó csoportokat az ALL IC-BFM 2002-es tanulmány alapján definiáltuk.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a klasszikus prognosztikai markerek, mint a kor, a kezdeti fehérvérsejtszám nem mutatnak korrelációt a FXIII-A kifejeződéssel. Bár a prednisonra adott válasz esetében jóval magasabb értéket találtunk a FXIII-A negatív csoportban, mint a FXIII-A pozitív csoportban (29% vs. 5.7%), statisztikailag nem mutatott szignifikanciát.

Megvizsgáltuk a FXIII-A kifejeződés és az egyéb kategóriák közötti összefüggéseket is. A kor, a kezdeti FVS, a prednison válasz, az FC és genetikai rizikó csoportok közötti összefüggések egyedül csak a 'B-other' genetikai alcsoportban mutatott szignifikáns eltérést a FXIII-A negatív és FXIII-A pozitív csoportok összehasonlításában (OR: 7.1; 95%, CI: 1.7-29.1; $p=0.006$).

A FXIII-A és a 'B-other' genetikai alcsoport közötti összefüggést a multivariációs logisztikus regressziós analízis is alátámasztotta (OR: 7.1; 95%, CI: 1.7-29.1; $p=0.006$). A két csoport közötti különbség akkor is megmaradt, ha az olyan kezdeti paramétereket, mint a kor vagy a FVS is hozzávettük az analízishez (OR: 7.8; 95%, CI: 1.8-34.7; $p=0.007$).

A Kaplan-Meier féle túlélési görbék szignifikáns különbséget mutattak a FXIII-A pozitív és a FXIII-A negatív csoportok között mind az eseménymentes túlélés (EFS) mind a túlélés (OS) tekintetében ($p=0.031$ és $p=0.008$). A 10 éves EFS és OS szignifikánsan magasabb a FXIII-A pozitív (84%, 95%, CI: 67.4-92.4 és 89%, 95%, CI: 73.7-95.8) betegek között, mint a FXIII-A negatív (61%, 95%, CI: 35.3-79.2 és 61%, 95%, CI: 35.3-79.2) estekben. Az EFS és az OS közötti szignifikáns különbség nem csak abban az esetben volt megfigyelhető, ha a FXIII-A kifejeződést vettük alapul, hanem a különbség megmaradt akkor is, ha az ismert genetikai alcsoportokat vetettük össze a 'B-other' genetikai alcsoporttal (EFS $p=0.058$, OS $p=0.021$).

A túlélés tekintetében kapott adatokat multivariációs Cox regressziós analízissel is megvizsgáltuk. Abban az esetben, amikor a Cox vizsgálatokba bevontuk a kezdeti prognosztikai paramétereket is (kor és FVS), a FXIII-A kifejeződés mutatkozott a legerősebb hatásként az OS tekintetében (HR: 4.8; 95% CI: 1.2-19.2; $p=0.025$).

A fentebbi eredményt, miszerint a FXIII-A a vizsgált paraméterek között a legmeghatározóbb a túlélési adatok tekintetében egy másik uni- és multivariációs analízissel is sikerült alátámasztanunk. Ennél az elemzésnél az összes klinikai paraméter, belevéve az ismert genetikai alcsoportokat, a kezdeti paramétereket, mint a kor és a kezdeti FVS, a FXIII-A kifejeződés, vizsgáltuk a EFS és az OS tekintetében. Az eredmények mindkét esetben szignifikáns különbséget mutattak.

A kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a FXIII-A kifejeződés prognosztikai tényező lehet BCP ALL esetében. A FXIII-A negativitás egy rosszabb kimenetellel társul, ami nem csupán a 'B-other' genetikai alcsoporttal való összefüggésből adódik, hanem önmagában is rosszabb túlélést feltételez.

A EFS és az OS tekintetében a 15. napi FC-MRD eredmények a fenti megállapításokat támasztják alá. A FC-MRD alapján alkotott három csoport esetében is szignifikánsan elkülönült a FLR és az FMR csoport az FHR csoporttól mind az EFS mind az OS tekintetében: $p=0.01$ mind az EFS és az OS esetében az FLR és az FHR csoport között; $p=0.01$ az EFS esetében és $p=0.004$ az OS esetében az FMR és FHR csoport között.

5.2. Prospektív vizsgálatok eredményei

5.2.1. A FXIII-A klinikai jelentősége gyermekkori akut progenitor B-sejtes limfoblasztos leukémiában

Prospektív vizsgálataink során a retrospektív vizsgálatainkkal szemben, három csoportot különítettünk el a FXIII-A kifejeződés szempontjából: a FXIII-A negatív (FXIII-A <20%), a FXIII-A dim (FXIII-A 20-79%) és a FXIII-A bright (FXIII-A 80%) csoportokat.

A FXIII-A kifejeződés egy folyamatot ír le, melynek köszönhetően nehezen különíthető el élesen a FXIII-A negatív és a FXIII-A bright csoporttól. A dot plot-okat elemezve elmondható, hogy a negatív kifejeződési mintázat esetén a leukémiás lymphoblastok átfedésben voltak a FXIII-A negatív normál limfocitákkal. A bright esetekben a leukémiás blaszt sejtpopuláció szinte teljesen elvált a normál limfocitáktól. A dim mintázat esetén a leukémiás lymphoblastok széles, de homogén csoportként jelentek meg, részben átfedve a normál limfocitákkal. A 408 elemzett minta esetében 137 volt negatív, 189 került a dim csoportba és 82 esetet soroltunk a bright csoportba.

Harminchat esetben a FXIII-A kifejeződést a diagnosztikus és a kezelés 15. napján is vizsgáltuk. Az FLR csoportba tartozó eseteket kizártuk, mivel a 0.1% alatti lymphoblast arány esetén nehezen állapítható meg a FXIII-A kifejeződés aránya. Az FMR és az FHR csoportba tartozó betegek esetében a 15. napi FXIII-A kifejeződés szignifikánsan alacsonyabb volt a kezdeti értékekhez képest ($p < 0.001$). A FXIII-A negatív, *de novo* esetek FXIII-A kifejeződése nem változott szignifikánsan a 15. napra. A FXIII-A *de novo* esetek egyike sem haladta meg a 20%-os határértéket a 15. napra, nem váltak pozitívvá.

Kaplan-Meier féle túlélési görbével elemeztük a FXIII-A kifejeződés, az EFS és az OS közötti lehetséges összefüggéseket, elmondható, hogy a FXIII-A pozitív és a FXIII-A negatív betegek között nem volt detektálható szignifikáns különbség.

Megvizsgáltuk az EFS és az OS összefüggéseit a három FXIII-A csoport esetében. Azt tapasztaltuk, hogy az EFS-ben szignifikáns különbség mutatkozott a FXIII-A dim csoportot összevetve a FXIII-A negatív csoporttal ($p=0.012$) és a FXIII-A bright csoporttal ($p=0.001$). A Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján megállapítható, hogy a FXIII-A dim csoport öt éves EFS-e szignifikánsan nagyobb (93%), mint a FXIII-A bright (61%) és a FXIII-A negatív (70%) csoportoknak. Az öt éves EFS a dim, a negatív és a bright csoportban a következőképpen alakult: FXIII-A dim 93%, FXIII-A negatív 70% és FXIII-A bright 61%. Az EFS tekintetében az átlagos után követési idő a FXIII-A dim csoport esetében 1736 nap (95% CI: 1675 és 1796 nap), a FXIII-A bright csoport esetében 1277 nap (95% CI: 1153 és 1400 nap), a FXIII-A negatív csoport esetében 1588 nap (95% CI: 1484 és 1692 nap) volt.

Az öt éves OS a FXIII-A dim csoportban 95% volt, mely szignifikánsan magasabb, mint a FXIII-A negatív csoportban (88% $p=0.044$). A FXIII-A dim és a FXIII-A bright csoport (87%) közötti különbség nem mutatott szignifikáns különbséget. Az OS tekintetében az átlagos utánkövetési idő a FXIII-A dim csoport esetében 1755 nap (95% CI: 1699 és 1810 nap), a FXIII-A bright csoport esetében 1454 nap (95% CI: 1341 és 1567 nap), a FXIII-A negatív csoport esetében 1661 nap (95% CI: 1572 és 1749 nap) volt.

Az ismert kockázati tényezőket, az ismert rizikó csoportokat multivariációs Cox regressziós analízis segítségével vizsgáltuk meg két FXIII-A csoport összevetésében. Egyik esetben a FXIII-A negatív csoportot vetettük össze a FXIII-A dim csoporttal, másik esetben a FXIII-A dim csoportot a FXIII-A bright csoporttal. A kategorikus változók, mint az FXIII-A kifejeződés mintázata, az életkor, a prednison válasz, a genetikai kockázati kategóriák megoszlása és a „B-other” genetikai alcsoport megoszlása szignifikáns hatással voltak az öt éves EFS és az öt éves OS adatokra a dim vs. negatív FXIII-A csoportok esetében. Az ALL IC-BFM 2009-es tanulmány szerinti rizikó csoportok esetében szignifikáns különbség mutatkozott az öt éves OS

adatok tekintetében. A multivariációs analízis esetén, ahol csak a genetikai rizikó csoportokat (jó vs. közepes) hasonlítottuk össze, mely eseté nem a szignifikancia megmaradt.

Az FXIII-A kifejeződés, az ALL BFM-IC 2009 kockázati kategóriák (BFM-HR vs. BFM-IR) és a genetikai kockázati csoportok esetében szignifikáns különbségek voltak a dim és bright FXIII-A csoportok túlélési adatai között. A multivariációs Cox analízisben az FXIII-A kifejeződés és a genetikai kockázati csoportok összevetése esetén a szignifikancia továbbra is megmaradt.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a FXIII-A negatív és a FXIII-A bright csoport társult kedvezőtlen eredményekkel az EFS és az OS tekintetében. A két csoportot összehasonlítva a prednizon válasz és a genetikai kockázati csoport szignifikánsan különbözött. A rossz prednizon válasz a FXIII-A negatív csoportra volt jellemző, míg a magas rizikójú genetikai eltérések a FXIII-A bright csoportban tömörültek.

A kópiaszám eltéréseket (CNA) 59 beteg esetében vizsgáltunk, melyek közül 20 eset a FXIII-A negatív, 26 a FXIII-A dim és 13 a FXIII-A bright csoportba tartozott. Rossz prognosztikai CNA volt kimutatható valamivel magasabb arányban (7/20) a FXIII-A negatív csoportban, mint a FXIII-A dim (4/26), és a FXIII-A bright (1/13) csoportban. A különbségek azonban nem voltak szignifikánsak.

5.2.2. A FXIII-A kifejeződés, a minimális maradék betegség (MRD) és a genetikai rizikó csoportok közötti összefüggések

Az FXIII-A kifejeződés és más ismert rizikófaktorok közötti összefüggéseket a Pearson-féle Chi-négyzet teszttel és multinomiális logisztikus regressziós modellekkel vizsgáltuk. A különböző FXIII-A kifejeződési mintázatok nem korreláltak szignifikánsan sem az ALL BFM-IC 2009, sem az FC MRD kockázati kategóriák szerinti csoportokkal. A közepes genetikai rizikó csoport szignifikánsan gyakrabban fordult elő a FXIII-A negatív csoportban, mint a

FXIII-A dim vagy FXIII-A bright csoportban ($p=0.009$ és $p=0.039$). Korreláció ugyanolyan mértékben fordult elő a FXIII-A negatív és FXIII-A pozitív csoportokban és a „B-other” genetikai alcsoportban ($p=0.008$ FXIII-A negatív és FXIII-A dim csoport; $p=0.004$ FXIII-A negatív és FXIII-A bright csoport).

Azok a betegek, akik FXIII-A dim vagy FXIII-A bright lymphoblastokkal rendelkeznek kevesebb eséllyel fognak a 'B-other' genetikai alcsoportra jellemző genetikai eltéréssel rendelkezni (OR: 0.49 és 0.35). Ez az összefüggés akkor volt látható, ha a kategorikus változók közül a kort, a nemet, és a fehérvérsejtszámot figyelembe vettük.

Az iAMP21 genetikai eltérés szintén szignifikánsan gyakoribb volt ($p = 0,029$) az FXIII-A negatív csoport esetében, mint a másik két FXIII-A csoporthoz képest. Más ismert genetikai aberrációk hasonló eloszlást mutattak a három FXIII-A kifejeződési csoporton belül.

5.3. Génexpressziós vizsgálatok eredményei

5.3.1. A BCP ALL-es minták karakterizálása

Vizsgálataink során 42 BCP ALL-es betegminta RNS-ét használtuk fel génexpressziós mintázat analízisére. A citoplazmatikus FXIII-A kifejeződést FC módszer segítségével állapítottuk meg. A prospektív vizsgálatainknak megfelelően, három csoportot különítettünk el: FXIII-A negatív, FXIII-A dim és FXIII-A bright.

A genetikai csoportokat figyelembe véve, 27 beteg az ismert genetikai eltérések csoportba, míg 15 beteg a 'B-other' genetikai alcsoportba tartoztak. A 'B-other' genetikai alcsoportba tartozó betegek közül az alábbi megoszlás volt megfigyelhető: 7/12 FXIII-A negatív, 6/21 FXIII-A dim és 2/7 FXIII-A bright.

5.3.2. A BCP-ALL-es minták génexpressziós mintázata

A differenciáltan kifejeződő géneket (DE) a FC módszer alapján megállapított FXIII-A kifejeződés és a 'B-other' genetikai alcsoport alapján határoztuk meg. A DE gének volcano plot módszer alkalmazásával voltak szűrve. A FXIII-A negatív és a FXIII-A bright csoportot összevetve 26 DE gént azonosítottunk. A FXIII-A dim és a FXIII-A bright csoportok összehasonlítása során 155 DE gént, míg a FXIII-A negatív és a FXIII-A dim csoport között 88 DE gént azonosítottunk. Egy-két kiugró értéket leszámítva a heat map analízis során megállapítottuk, hogy nemcsak fehérje szinten, hanem génexpressziós szinten is elválik a három FXIII-A csoport egymástól. A heat map analízis során megfigyelhető volt, hogy a FXIII-A negatív és a FXIII-A bright csoportba tartozó minták egymáshoz közel csoportosulnak, viszont szépen elkülönülnek a FXIII-A dim csoporttól.

A 'B-other' genetikai alcsoport génexpressziós mintázatának összehasonlítása a többi betegmintával, melyet non-'B-other' alcsoportnak nevezünk el, 142 DE gént azonosítottunk, amennyiben a fold-change értéket 1.5-re állítottuk be. A heat map analízis során a 'B-other' genetikai alcsoport elkülönült a non-'B-other' genetikai alcsoporttól.

A fenti eredmények tekintetében megvizsgáltuk, hogy a 'B-other' genetikai alcsoport esetében azonosított DE gének mutatnak-e összefüggést a FXIII-A alcsoportokkal. A FXIII-A negatív csoport és a 'B-other' genetikai alcsoport, valamint a FXIII-A negatív csoport és a non-'B-other' genetikai alcsoport összevetése során 32 DE gént azonosítottunk. A heat map analízis során megállapítottuk, hogy a 'B-other' genetikai alcsoportban tömörülő DE gének kifejeződési mintázata átfedést mutat a FXIII-A negatív csoportba tartozó DE gének kifejeződési mintázatával.

5.3.3. A differenciáltan kifejeződött gének funkcionális karakterizálása BCP-ALL-es mintákon

A funkcionális kategóriával kibővített FXIII-A kifejeződési mintázat alapján azonosított DE gének 156 génontológiai (GO) folyamatban vettek részt. A DE gének többsége, különösen a legerősebb statisztikai p-értékkel rendelkezők, epigenetikai és/vagy génexpressziót szabályozó folyamatokhoz kapcsolódnak, mint például hiszton módosulás, kromatin szerveződés, RNS destabilizáció, a génexpresszió poszt-transzkripciós szabályozása stb. vagy más szabályozó és sejtes folyamatok, például apoptózis és morfogenezis. Ezen túlmenően azonosítottunk olyan peptidil-lizin módosulását eredményező biológiai folyamatokat, amelyek kapcsolatban állnak a FXIII-A ismert fiziológiai funkciójával, amely katalizálja a fibrin monomerek közötti g-glutamil- ϵ -lizilamid keresztkötések képződését, és így oldhatatlan vérrög keletkezik.

A „B-other” státusz alapján történő összehasonlítás esetén, amikor a fold change érték >2.0 , sokkal kevesebb GO folyamatot azonosítottunk, mint a FXIII-A státusz alapján történt összehasonlítás folyamán. A *CCL5*, *CD3G*, *IL7R* és a *PLAC8* gének, melyek a limfocita és T-sejt apoptotikus folyamatokban vesznek részt túlprezentált állapotban voltak, míg a *CX3CR1* és a *RORA* gének a makrofágok migrációját szabályozzák. Abban az esetben, ha a fold change $>1,5$ értékre állítottuk, úgy további biológiai folyamatokban résztvevő gének lettek szignifikánsak. Ezek a gének a következők: *BCL10*, *CX3CR1*, *GNLY*, *PTPRC*, *STK4*, *TNFSF10*, *ATP2B1*, *DNAJC3*, *PLAC8*, *THRA*, *MAPKBP1*, *PER1*, *RORA*, *USP32*, *CCL5*, *GNG2*, *PLCB3*, *BCL10*, *CCL5*, *CD3G*.

5.3.4. A globális transzkriptomikai adatok validálása

A FXIII-A kifejezési állapot szerint vagy a 'B-other' genetikai státusz alapján microarray eljárással azonosított DE gének közül 45 gént választottunk ki RT-Q-PCR validálásra. A fold change értékek alapján 13/45, a funkcionális biológiai jellemzőkkel rendelkező gének közül

32/45 gént választottunk ki. Az RT-Q-PCR validálás során egyedül a *RORA* gént nem tudtuk detektálni, ami valószínűleg technikai hiba miatt történhetett.

5.3.5. Az FXIII-A kifejeződést alapul véve az eredményeink

Az *F13A1* gént minden mintában azonosítottuk és RT-Q-PCR módszerrel validáltuk. Az RT-Q-PCR validálást követően megállapítottuk, hogy a három FXIII-A alcsoportnak megfelelően három eltérő intenzitás volt megfigyelhető a gén kifejeződésének intenzitásában. A *F13A1* gén esetében a legkisebb intenzitás a FXIII-A negatív csoportban, a legnagyobb a FXIII-A bright csoportban volt megfigyelhető. Ez a tendencia volt megfigyelhető a *ANGPTL2*, *RAPGEF5*, *SEMA6A*, *HAPI*, *NUCKS1* és *TRH* gének esetében is. A *FOXO1* gén esetében a FXIII-A bright csoportra volt jellemző a legnagyobb intenzitás, és a legalacsonyabb a FXIII-A dim csoportra. A *PLAC8* gén esetében a legnagyobb intenzitást a FXIII-A dim csoportban mértünk, a legalacsonyabbat a FXIII-A bright csoportban.

Az, hogy milyen lehetséges kölcsönhatások lehetnek a validált gének és a FXIII-A kifejeződés között, a használt STRING v11 funkcionális fehérjetársítási hálózatokat tartalmazó adatbank segítségével sem tudtuk felmérni. Ennek ellenére a *FOXO1* gén esetében egy FXIII-A függő kifejeződést tudtunk azonosítani. A GeneHancer adatbázis segítségével *in silico* azonosítani tudtuk olyan enchancer (fokozó) folyamatokat, amelyek szerepet játszhatnak a *F13A1* gén és a validált gének közötti párhuzamos felszabályozásban. Az *ATF7*, *POLR2A*, *RAD21* és a *SMARCA5* gének transzkripció faktor kötőhelyeit sikerült azonosítanunk 14 gén esetében.

5.3.6. Eredmények a 'B-other' státuszt elemezve

A 'B-other' státuszt alapul véve olyan DE géneket választottunk validálásra, amelyek biológiai folyamatokban (makrofág migráció, limfocita apoptotikus folyamat, T-sejt apoptotikus folyamat és ezek szabályozása) vesznek részt. Ebben az esetben a GO elemzési eredmények kevésbé voltak változatosabbak, mint az FXIII-A kifejezés alapú GO esetében.

Öt gén esetében tudunk különböző kifejeződési intenzitásokat validálni RT-Q-PCR technikával. A *DFFA*, *GIGYF1*, *GIGYF2* és a *INTS3* gének túlexpresszáltak a 'B-other' csoportban, míg a *CD3G* a non-'B-other' csoportban jelenik meg overexpresszált állapotban. A microarray analízis során, valamint a biológiai funkciók alapján kiválasztott *RORA*, *IL7R*, *CCL5*, *PLAC8* és *CX3CR* géneket nem sikerült validálnunk.

6. MEGBESZÉLÉS

A XIII-as véralvadási faktor A alegységének normál kifejeződési helyei a monociták, a megakariociták és a thrombociták. [28] Munkacsoportunk azonosította a FXIII-A kifejeződését BCP-ALL-es mintákon áramlási citometriai, immunoblotting és lézer scanning mikroszkópiával. [8, 29] A BCP-ALL-es limfoblasztokban megfigyelhető FXIII-A kifejeződés alapján új alcsoportot, illetve alcsoportokat határozhatunk meg. Retrospektív vizsgálataink során megállapítottuk, hogy mind a tartós túlélés, mind az eseménymentes túlélés tekintetében a FXIII-A pozitív csoportba tartozó BCP-ALL-es esetek szignifikánsan jobb túlélési adatokkal rendelkeztek, mint a FXIII-A negatív csoportba tartozók.

Retrospektív vizsgálataink eredményei más magyarázatot is adhatnak a FXIII-A negatív esetek rossz kimenetelére. A „B-other” genetikai alcsoportba sorolt betegekben szignifikánsan gyakrabban fordultak elő FXIII-A negatív limfoblasztok mind az egy-, mind a többváltozós elemzés szerint. Így a FXIII-A kifejeződés hiánya – egyelőre ismeretlen módon – összefügg a kedvezőtlen kórlefyással jellemzett „B-other” genetikai mintázattal. Ez a „biomarker jelleg” egyúttal felhívja a figyelmet arra, hogy a FXIII-A negatív esetek részletes molekuláris genetikai értékelést igényelnek. Az áramlási citometriával történő FXIII-A meghatározás egy költség- és időhatékony eljárásnak bizonyul, mely a BCP-ALL-es betegek esetében prognosztikai jelentőséggel bírhat. Retrospektív vizsgálatainknak számos korlátai voltak. Egyrészt viszonylag kevés (55) betegmintát tudtunk analizálni, másrészt csak DNS minták álltak rendelkezésünkre,

RNS minták hiányában nem tudunk sem génexpressziós vizsgálatokat, sem MLPA vizsgálatokat elvégezni a pontosabb molekuláris genetikai elemzések érdekében.

A retrospektív vizsgálatainkban kapott eredményeinket prospektív vizsgálattal kívántuk alátámasztani. A prospektív vizsgálatainkban a FXIII-A potenciális hasznosságát vizsgáltuk, mint rizikó-asszociált biomarker az ALL BFM-IC 2009 klinikai vizsgálat keretein belül kezelt BCP-ALL-lel diagnosztizált gyermekek esetében. A vizsgálatban két különböző, a nemzetközi BFM munkacsoporton belül működő gyermekkori ALL-kezelési konzorciumhoz tartozó négy nemzetközi munkacsoport csatlakozott (lengyel, magyar, szlovák: ALLIC és osztrák: AIEOP-BFM). A tanulmányba bevont esetek nagy száma (408) lehetővé tette az FXIII-A kifejeződés mintázatainak részletesebb vizsgálatát.

A prospektív vizsgálat során a FXIII-A kifejeződést a retrospektív vizsgálattal szemben nem kettő, hanem három csoportra osztottuk: FXIII-A negatív (<20%), FXIII-A dim (20-79%) és FXIII-A bright ($\geq 80\%$). A legtöbb BCP-ALL-es gyermek a FXIII-A dim csoportba tartozott. Ez a szubpopuláció az egyváltozós Kaplan-Meier analízis szerint jobb túlélési eredményt ért el mind a FXIII-A bright, mind a FXIII-A negatív csoporttal szemben. Az FXIII-A negatív alcsoport gyengébb túlélési esélyeit befolyásolta, hogy ebben a csoportban halmozódtak a közepes genetikai kockázati csoportba tartozó betegek, illetve a 'B-other' genetikai alcsoport esetei. Számos tanulmány mutatta már ki, hogy a 'B-other' BCP-ALL-ben szenvedő betegeknél nagyobb a relapszus kockázata. [30] Többváltozós Cox regressziós analízissel megállapítottuk, hogy a 'B-other' genetikai alcsoportnak szignifikáns prognosztikai értéke van a EFS és az OS tekintetében a FXIII-A negatív vs. FXIII-A dim csoportot figyelembe véve. Azt a tendenciát figyeltük meg, hogy a rossz prognosztikai CNA-ek a FXIII-A negativitással társulnak; azonban az MLPA vizsgálatba bevont kis esetszám miatt a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

A többváltozós Cox analízis alapján megállapítottuk, hogy a magas és közepes kockázatú genetikai csoportok szignifikáns hatást gyakorolnak a túlélési adatokra a FXIII-A bright csoportot összehasonlítva a FXIII-A dim csoporttal. Az egyváltozós Cox regressziós analízisben szignifikáns összefüggést találtunk a rossz EFS és OS adatok között a FXIII-A bright csoport és a BFM-HR kategória tekintetében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a kedvezőtlen genetikai változások felülírhatják a FXIII-A kifejeződés jótékony hatását BCP-ALL-es gyermekekben.

A prospektív vizsgálatainknak számos korlátja volt. A vizsgálatba csak a BCP-ALL-ben szenvedő gyermekeket vontuk be. Az FXIII-A jelölést és mérést az anti-FXIII-A monoklonális antitest elérhetősége alapján végeztük el. A lengyel csoportba tartozó betegeket nem randomizálták. Az elmúlt négy évben jelentős számú beteget vontak be az ALL BFM-IC 2009 tanulmányba, ami megváltoztathatja a végső eredményt az 5 éves EFS és OS adatok tekintetében. A követési idő azonban elegendő volt ahhoz, hogy statisztikailag szignifikáns különbségeket mutasson a különböző FXIII-A kifejeződési mintázatú csoportok között. A teljes genetikai háttér csak 214/317 betegről volt elérhető, és az MLPA kópiaszám-változásait a betegek egy kis részében vizsgáltuk csak.

Génexpressziós vizsgálataink során a *F13A1* gén kifejeződésének meglétét kívántuk alátámasztani, valamint megfigyelni a lehetséges összefüggéseket BCP-ALL betegmintákon, az ismert genetikai alcsoportok, a 'B-other' genetikai alcsoport és a FXIII-A fehérje szintű kifejeződésének tekintetében. A *F13A1* gén transzkripció szabályozásáról viszonylag keveset tudunk. Myeloid leukémia sejtvonalak molekuláris vizsgálata során feltártak kötőhelyeket (NF-1 és SP-1), valamint myeloidra jellemző (MZF-1-szerű fehérje, GATA-1 és Ets-1) transzkripció faktorok kötőhelyeinek jelenlétét a gén promoter régiójában. Az SP-1, a GATA-1 és az Ets-1 transzkripció faktorok kötőhelyeit az ENCODE ChIP-seq adatbázisban nem tudtuk azonosítani. Egy újabb tanulmány kimutatta, hogy a FXIII-A-t az IL-4 és a

dexamethasone szinergikus módon szabályozza, az alternatív módon aktivált makrofágokban, és ezek a szabályozó molekulák megfigyelhetők mind normál, mind BCP ALL-ben. [32] Leukémiás limfoblasztokban a *F13A1* gén transzkripciószabályozását még nem tanulmányozták.

Előzetes vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a FXIII-A dim kifejeződési mintázattal rendelkező betegek túlélési mutatói jobbnak bizonyultak, mint a FXIII-A negatív limfoblasztokkal rendelkező esetek. Mindhárom FXIII-A kifejeződési mintázatot mutató csoport esetében génexpressziós vizsgálatokat végeztünk, melynek eredményeként megállapítható volt, hogy mindhárom csoport jellemzően eltért egymástól. Az adatok GO elemzése számos biológiailag releváns funkcionális kategóriát eredményezett. Eredményeink klinikai jelentőségét támasztja alá, hogy sikeresen azonosítottuk a peptidil-lizin módosulást befolyásoló biológiai folyamatokat. A FXIII-A egyik jól ismert funkciója, hogy γ -glutamil- ϵ -lizil keresztkötéseken keresztül stabilizálja a fibrinhálót, mindemellett részt vesz olyan intracelluláris folyamatokban, amelyek a monocyta/makrofág, az osteoblaszt és az osteoclast differenciációt befolyásolják. [33] Így felvetődhet a kérdés, hogy BCP ALL limfoblasztok esetében is rendelkezhet a FXIII-A ilyen biológiai funkciókkal. Az általunk validált *EHMT1*, *ING5*, *MDM2*, és *NUP43* gének olyan sejtmagon belüli és intracelluláris metilációs és acetilációs lizil csoportokba tartozó fehérjék, melyek szabályozni képesek a neoplasztikus sejtek túlélését. [34]

A FXIII-A státusz alapján 14 gént validáltunk. Megállapítottuk, hogy a *F13A1* gén minden mintában kifejeződött és a kifejeződési szintje követte a FC módszerrel azonosított három csoport kifejeződési szintjeit. A 14 azonosított génből az *ANGPTL2*, az *EHMT1*, a *FOXO1*, a *HAP1*, a *NUCKS1*, a *PIK3CG*, a *RAPGEF5*, a *SEMA6A*, a *SPIN1*, a *TRH*, és a *WASF2* gének olyan biológiai és klinikai funkciókkal rendelkeznek, melyek szerepet játszanak leukémia és egyéb daganatos betegségek kialakulásában. Az általunk azonosított *NUP43* gén a *NUP*

géncsaláddal ellentétben nem társul semmilyen humán daganatban jellemzően bíró funkcióval. [35] A *PLAC8* gén, amely fiziológiásan egy trophoblaszt sejtvonal marker, a FXIII-A dim csoportban fejeződik ki intenzíven. Kimutatták, hogy ez a gén aberráns módon aktiválódik emlősökben és emlős daganatos sejtvonalakban, különféle daganattípusokban, azonban humán ALL egyik altípusában sem azonosították eddig. [34, 36] *In silico* vizsgálatok alapján nem tudtunk közvetlen kapcsolatot feltárni a DE gének és a három különböző FXIII-A kifejeződési szintet mutató csoport és az *F13A1* gén szabályozása között. A validált DE gének és az *F13A1* közös enhancer (fokozó) elemei azt valószínűsítik, hogy a közös transzkripciós faktorok hasonló módon szabályozhatják a gének kifejeződését.

A 'B-other' alcsoportban validált DE gének átfedést mutatnak a FXIII-A negatív alcsoporttal, mely feltehetően egy új alcsoport lehet a *BCP-ALL1-like/Ph-like B-ALL* alcsoporton belül. A microarray eredményeink alapján 14 DE gént (*ANXA5*, *ARL4C*, *CD34*, *IFNGR1*, *MAGT1*, *MAPKBP1*, *MAP3K2*, *ME3*, *OSBPL8*, *PAPOLA*, *PTPRC*, *SUZ12*, *TACC1*, *TEMPO*) azonosítottunk a 'B-other' genetikai alcsoporton belül, melyek átfedést mutatnak a Den Boer és munkatársai által publikált eredményekkel. [37] Minden validált gén, így a *CD3G*, *DFFA*, *GIGYF1*, *GIGYF2*, és *INTS3* neoplasztikus folyamatokban vesznek részt, úgy, mint a leukémiák kialakulásában. [38-42] Eddig még egyik gént sem azonosították/írták le gyermekkori BCP-ALL-es esetekben.

Génexpressziós vizsgálataink korlátja a kevés mintaszám, valamint a validált gének igen csekély száma. Ezeknek köszönhetően a klinikum szempontjából fontos túlélési mutatók nem állapíthatók meg, valamint szignifikancia sem volt meghatározható. Ennek ellenére lényegesen nagyobb arányban haltak meg betegségük miatt a FXIII-A negatív csoportba sorolt betegek: 5/14 (36%), mint a FXIII-A dim csoportban: 5/21 (24%) illetve a FXIII-A bright csoport: 1/7 (14%) esetében. Bár a kis esetszám alapján nem mondható szignifikánsnak, a prospektív vizsgálataink eredményeit alapul véve elmondhatjuk, hogy a FXIII-A negatív csoportba tartozó

beteg nagy valószínűséggel a 'B-other' genetikai alcsoportba sorolható, valamint a túlélési mutatók tekintetében rosszabb kimenetellel számolhatunk.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az intracelluláris FXIII-A biológiai funkciójának megismerése egyre szélesebb körben foglalkoztatja a kutatókat. Munkacsoportunk a FXIII-A gyermekkori BCP-ALL-es betegmintákon tanulmányozta kifejeződését, valamint az esetleges biológiai funkcióit és klinikai relevanciáját.

Retrospektív vizsgálataink során korrelációt találtunk a hosszú távú túlélés és a limfoblasztok FXIII-A pozitív fenotípusa között, ami azt bizonyítja, hogy a limfoblasztok FXIII-A kifejeződési karaktere nemcsak hasznos LAIP lehet, hanem erőteljes prognosztikai faktor is gyermekkori BCP-ALL-ben. Ezen túlmenően a FXIII-A kifejeződés a 'B-other' genetikai alcsoporttal is összefüggésbe hozható, így a FXIII-A segíthet azonosítani azokat az eseteket, amelyek további részletes genetikai vizsgálatot igényelhetnek.

Prospektív vizsgálataink során áramlási citometriai módszerrel három különálló csoportot különítettünk el (FXIII-A negatív, FXIII-A dim és FXIII-A bright), attól függően, hogy a BCP-ALL lymphoblasztok milyen mértékű FXIII-A kifejeződést mutatnak. Statisztikailag szignifikánsnak bizonyuló és klinikailag is jelentős különbségek voltak megfigyelhetők a FXIII-A kifejeződési mintázata BCP-ALL-es gyermekbetegek esetében, amely beépíthető egy új ALL BFM-IC klinikai vizsgálat kockázatbecslési stratégiájába. A FXIII-A negativitás egy prognosztikai faktor az elkeserítő túlélési adatokat tekintve, ezenkívül a FXIII-A negativitás korrelációban van a 'B-other' genetikai alcsoporttal, így ezekben az esetekben egy részletesebb, speciális molekuláris genetikai vizsgálatokra van szükség, ahhoz, hogy a megfelelő rizikó-terápiát kaphassa ebbe a csoportba tartozó beteg.

Génexpressziós vizsgálataink során elsőként sikerült azonosítanunk a *F13A1* gént BCP-ALL-es gyermekbeteg mintákban. A *F13A1* gén kifejeződésének intenzitás ugyanazt a tendenciát követi, mint az áramlási citometriai módszerrel megfigyelt kifejeződés. Ezen vizsgálataink során is megfigyelhető volt a FXIII-A negatív betegek 'B-other' genetikai alcsoportban való halmozódása. A validált gének nem csak biológiai funkcióval, de klinikai relevanciával is rendelkeznek. Olyan géneket sikerült azonosítanunk, melyeket eddig még nem írtak le BCP-ALL-es gyermekkori betegekben. Ezen gének fehérje szintű megjelenése és ezek azonosítása egy újabb terápiás lehetőségeket vetnek fel a gyermekkori BCP-ALL-es betegek esetében.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Kiss Csongor-nak, aki kimagasló szakmai tudásával, irányításával segített a mintagyűjtésben, a munka megtervezésében, kivitelezésében, az eredmények értékelésében és a disszertáció elkészítésében.

Köszönetem fejezem ki Dr. Kárai Bettina kolleganőnek, aki nélkül a FXIII-A áramlási citometriai csoportosítása nem valósulhatott volna meg.

Köszönettel tartozom az összes hazai és nemzetközi Gyermekhematológiai Központ vezetőjének és munkatársainak, valamint az összes hazai és nemzetközi Áramlási Citometriai Laboratórium vezetőinek és munkatársainak a minták és az adatok gyűjtésében való részvételét, valamint az adatok értékeléséért.

Köszönetem fejezem ki az UD Genomed Kft munkatársainak, akik a génexpressziós vizsgálatokhoz kapcsolódó folyamatokat véghezvitték.

Köszönetem fejezem ki Dr. Scholtz Beáta tanárnőnek a génexpressziós mintázatok elemzés módszertanának megtanításáért.

Hálával tartozom Édesanyámnak, Édesapámnak, Testvéremnek és mindenekelőtt Kisfiamnak, hogy hatalmas türelemmel végig vezettek, támogattak, segítettek a céлом elérésében.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. **373**(16): p. 1541-52.
2. Pui, C.H., et al., *Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?* Blood, 2012. **120**(6): p. 1165-74.
3. Laki, K., *The clotting of fibrinogen*. Blood, 1953. **8**(9): p. 845-56.
4. Laki, K. and L. Lorand, *On the inactivation of thrombin*. Experientia, 1946. **2**(10): p. 412.
5. Muszbek, L., et al., *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 931-72.
6. Mitchell, J.L. and N.J. Mutch, *Let's cross-link: diverse functions of the promiscuous cellular transglutaminase factor XIII-A*. J Thromb Haemost, 2019. **17**(1): p. 19-30.
7. Toida, M., et al., *Characterization of cells containing factor XIII subunit a in benign and malignant buccal lesions*. Histochem J, 1995. **27**(6): p. 449-56.
8. Simon, A., et al., *Expression of coagulation factor XIII subunit A in acute promyelocytic leukemia*. Cytometry B Clin Cytom, 2012. **82**(4): p. 209-16.
9. Kappelmayer, J., et al., *Coagulation factor XIII-A. A flow cytometric intracellular marker in the classification of acute myeloid leukemias*. Thromb Haemost, 2005. **94**(2): p. 454-9.
10. Adany, R., Z. Nemes, and L. Muszbek, *Characterization of factor XIII containing-macrophages in lymph nodes with Hodgkin's disease*. Br J Cancer, 1987. **55**(4): p. 421-6.
11. Kiss, F., et al., *Leukemic lymphoblasts, a novel expression site of coagulation factor XIII subunit A*. Thromb Haemost, 2006. **96**(2): p. 176-82.
12. Invernizzi, R., et al., *Immunocytochemical detection of factor XIII A--subunit in acute leukemia*. Leuk Res, 1992. **16**(8): p. 829-36.
13. Katona, E.E., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates*. J Immunol Methods, 2001. **258**(1-2): p. 127-35.
14. Mejstrikova, E., et al., *Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **54**(1): p. 62-70.
15. Simons, A., L.G. Shaffer, and R.J. Hastings, *Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition*. Cytogenet Genome Res, 2013. **141**(1): p. 1-6.
16. Henze, G., et al., *[The BFM 76/79 acute lymphoblastic leukemia therapy study (author's transl)]*. Klin Padiatr, 1981. **193**(3): p. 145-54.
17. Nachman, J.B., et al., *Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy*. N Engl J Med, 1998. **338**(23): p. 1663-71.
18. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
19. Maurer-Granofszky, M., et al., *An Extensive Quality Control and Quality Assurance (QC/QA) Program Significantly Improves Inter-Laboratory Concordance Rates of Flow-Cytometric Minimal Residual Disease Assessment in Acute Lymphoblastic Leukemia: An I-BFM-FLOW-Network Report*. Cancers (Basel), 2021. **13**(23).

20. Clappier, E., et al., *IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951*. *Leukemia*, 2015. **29**(11): p. 2154-61.
21. Gupta, S.K., et al., *Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2017. **58**(2): p. 333-342.
22. Messina, M., et al., *Clinical significance of recurrent copy number aberrations in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia without recurrent fusion genes across age cohorts*. *Br J Haematol*, 2017. **178**(4): p. 583-587.
23. Moorman, A.V., et al., *A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2014. **124**(9): p. 1434-44.
24. Yamamoto, T., et al., *Examination of stability of bone marrow blood RNA in the PAXgene tube*. *Lab Hematol*, 2006. **12**(3): p. 143-7.
25. Szklarczyk, D., et al., *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D607-D613.
26. Fishilevich, S., et al., *GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards*. *Database (Oxford)*, 2017. **2017**.
27. Kim, H.Y., *Statistical notes for clinical researchers: A one-way repeated measures ANOVA for data with repeated observations*. *Restor Dent Endod*, 2015. **40**(1): p. 91-5.
28. Muszbek, L., V.C. Yee, and Z. Hevessy, *Blood coagulation factor XIII: structure and function*. *Thromb Res*, 1999. **94**(5): p. 271-305.
29. Kiss, F., et al., *A coagulation factor becomes useful in the study of acute leukemias: studies with blood coagulation factor XIII*. *Cytometry A*, 2008. **73**(3): p. 194-201.
30. Moorman, A.V., *New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2016. **101**(4): p. 407-16.
31. Wood, B., et al., *Measurable residual disease detection by high-throughput sequencing improves risk stratification for pediatric B-ALL*. *Blood*, 2018. **131**(12): p. 1350-1359.
32. Gratchev, A., et al., *Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages*. *Scand J Immunol*, 2005. **61**(1): p. 10-7.
33. Richardson, V.R., et al., *Substrates of Factor XIII-A: roles in thrombosis and wound healing*. *Clin Sci (Lond)*, 2013. **124**(3): p. 123-37.
34. Cabreira-Cagliari, C., et al., *Revising the PLAC8 gene family: from a central role in differentiation, proliferation, and apoptosis in mammals to a multifunctional role in plants*. *Genome*, 2018. **61**(12): p. 857-865.
35. Nofrini, V., D. Di Giacomo, and C. Mecucci, *Nucleoporin genes in human diseases*. *Eur J Hum Genet*, 2016. **24**(10): p. 1388-95.
36. Grate, L.R., *Many accurate small-discriminatory feature subsets exist in microarray transcript data: biomarker discovery*. *BMC Bioinformatics*, 2005. **6**: p. 97.
37. Den Boer, M.L., et al., *A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(2): p. 125-34.
38. Ajiro, M., et al., *Critical involvement of RQCD1 in the EGFR-Akt pathway in mammary carcinogenesis*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(5): p. 1085-93.
39. Christen, F., et al., *Genomic landscape and clonal evolution of acute myeloid leukemia with t(8;21): an international study on 331 patients*. *Blood*, 2019. **133**(10): p. 1140-1151.

40. Federico, A., et al., *Pan-Cancer Mutational and Transcriptional Analysis of the Integrator Complex*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(5).
41. Yi, B., et al., *Mechanisms of the apoptosis induced by CD176 antibody in human leukemic cells*. *Int J Oncol*, 2011. **38**(6): p. 1565-73.
42. Zamani-Ahmadm Mahmudi, M., A. Najafi, and S.M. Nassiri, *Detection of Critical Genes Associated with Overall Survival (OS) and Progression-Free Survival (PFS) in Reconstructed Canine B-Cell Lymphoma Gene Regulatory Network (GRN)*. *Cancer Invest*, 2016. **34**(2): p. 70-9.