

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Gyurina Katalin**

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

**DEBRECENI EGYETEM**

**LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**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**

## Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS.....	2
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1	A XIII-as véralvadási faktor és biológiai funkciója .....	4
2.2	A FXIII-A kifejeződése leukémiában .....	7
2.3	Akut lymphoblastos leukémia (ALL) .....	8
2.4	A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia prognosztikai jellemzői .....	10
2.5	A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia genetikai jellemzői .....	12
2.6	A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kezelési sémái .....	13
3	CÉLKITÚZÉSEK.....	17
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
4.1	Retrospektív vizsgálatok.....	18
4.1.1	A tanulmányba bevont betegek, az adatok gyűjtése, kezelése .....	18
4.1.2	Immunfenotípus meghatározás .....	18
4.1.3	Kromoszóma analízis és fluorescent in situ hibridizációs eljárások (FISH).....	19
4.1.4	Statisztikai analízis.....	19
4.2	Prospektív vizsgálatok .....	20
4.2.1	A tanulmányba bevont betegek, az adatok gyűjtése, kezelése .....	20
4.2.2	Immunfenotípus meghatározás .....	23
4.2.3	Genetikai vizsgálatok.....	24
4.2.4	Statisztikai analízis.....	25
4.3	Génexpressziós vizsgálatok .....	25
4.3.1	A tanulmányba bevont betegek, a minták gyűjtése, kezelése génexpressziós vizsgálatokhoz .....	25
4.3.2	A betegminták feldolgozása MicroArray analízis elvégzéséhez .....	26
4.3.3	MicroArray és gén ontológiai analízis .....	27
4.3.4	Azonosított gének valós idejű minőségi polimeráz láncreakcióval (RT-Q-PCR) történő validálása, azok in silico vizsgálata .....	27
4.3.5	Statisztikai analízis.....	28
5	EREDMÉNYEK.....	28
5.1	Retrospektív vizsgálatok eredményei.....	28
5.2	Prospektív vizsgálatok eredményei .....	35
5.2.1	A FXIII-A klinikai jelentősége gyermekkori akut progenitor B-sejtes limfoblasztos leukémiában .....	35
5.2.2	A FXIII-A kifejeződés, a minimális maradék betegség (MRD) és a genetikai rizikó csoportok közötti összefüggések.....	43
5.3	Génexpressziós vizsgálatok eredményei.....	44

5.3.1	A BCP ALL-es minták karakterizálása.....	44
5.3.2	A BCP-ALL-es minták génexpressziós mintázata .....	46
5.3.3	A differenciálisan kifejeződött gének funkcionális karakterizálása BCP-ALL-es mintákon 49	
5.3.4	A globális transzkriptomikai adatok validálása.....	51
5.3.5	Az FXIII-A kifejeződést alapul véve az eredményeink.....	53
5.3.6	Eredmények a 'B-other' státuszt elemezve.....	57
6	MEGBESZÉLÉS.....	58
7	ÖSSZEFOGLALÁS .....	64
8	SUMMARY .....	65
9	IRODALOMJEGYZÉK .....	67
10	TÁRGYSZAVAK .....	74
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	75
12	FÜGGELÉK.....	76

## 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. [1]

A leukémia a gyermekkor leggyakoribb rosszindulatú megbetegedése. [2] 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%. [3] A dinamikus fejlődés háttérében 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 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. A betegség kezelési lehetőségei az azonosított prognosztikai tényezőktől függenek. [4, 5]

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 (FXIII) „fibrinstabilizáló faktorként” Lóránd László és Laki Kálmán azonosította elsőként. [6, 7] 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-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). 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 fejt ki. [8] Az A-alegység csontvelő eredetű, míg a B-alegységet a hepatocyták termelik, a két alegység a plazmában képez komplexet. A B-alegység a plazmában szabadon is előfordul, a teljes mennyiség mintegy 50%, ellentétben az A-alegységgel, amely csak komplex formában van jelen. A FXIII Ca<sup>2+</sup> jelenlétében alakul aktív transzglutaminázzá (FXIIIa), mely folyamathoz elengedhetetlen a trombin proteolitikus hatása. A trombin lehasítja az A-alegységről az aktivációs peptidet, majd Ca<sup>2+</sup> jelenlétében a B-alegység disszociál és kialakul az enzimatikusan aktív FXIII-A. Ez a folyamat jelentősen felgyorsul, amennyiben a fibrin jelen van. [9] A FXIII a véralvadási kaszkád utolsó fázisában játszik szerepet, a fibrin monomerek kötött kovalens kötések hoz létre, ezzel stabilizálva a fibrint. A FXIII a fibrinolízis szabályozásban proteineket kapcsol a fibrinháléhoz, így annak mechanikai stabilitása nő, valamint ellenállóbbá válik a fibrinolízissel szemben. [10]

A FXIII-hiány örökletes és szerzett formája is ismert, a legritkább véralvadási zavarok közé tartozik. A FXIII hiány egyik leggyakoribb bevezető klinikai tünete a köldökcsomk vérzés (80%) és a központi idegrendszeri vérzés (30%), mely a súlyos, 1% alatti eseteknél figyelhető meg. A közepsúlyos (FXIII: 2-5%) esetekben alig észrevehető vérzések jelentkeznek. A FXIII-

hiány diagnosztizálása kihívást jelent, hiszen a rutin szűrővizsgálatok eredményei rendszerint nem mutatnak kóros eltérést, így a diagnózis felállításához speciális FXIII szűrővizsgálatra van szükség. [11] Az örökletes FXIII-hiány kezelésére számos lehetőség nyílik, kezelhető plazma-eredetű (pd) vagy rekombináns (r) FXIII-koncentrátummal, FFP-vel vagy cryoprecipitátummal. [12]

A csontvelő eredetű sejtek, valamint a mesenchymalis sejtvonalak kifejezik az *F13A1* gént, amely a cellulárisan megjelenő, homodimer formában kifejeződő FXIII-A alegységet kódolja. Az FXIII-A intracellulárisan főleg thrombocitákban, megakaryocitákban, monocitákban, makrofágokban, chondocitákban, osteoblasztokban és oszteocitákban figyelhető meg. [13-16]

Az elmúlt évtizedekben egyre többet tudunk meg az FXIII-ról, a különösképpen az FXIII-A véralvadáson kívül betöltött szerepéről. Biológiai funkcióját tekintve a FXIII-A-nak szerepe van olyan folyamatokban, mint a sebgyógyulás, a fagocitózis, valamint a csont- és kötőszöveti mátrixállomány átalakítása. [14]

Sebgyógyulás esetén a véralvadási kaskád szerepe általában a seb kialakulását követően lép működésbe. A FXIII-A elősegíti a thrombociták adhézióját integrineken keresztül a sebfelszínhez, így stabilizálva egy idegilenes hálót még a sebképződés legelején. Ezen kívül a FXIII számos molekulával, köztük a fibronektinnel és a vitronectinnel, képez keresztkötéseket, elősegítve a gyulladós sejtek migrációját a sebhez. Ennek eredményeként a gyulladós sejtek adhéziója fokozódik, és az integrinnel kapcsolatos jelátviteli útvonalak aktiválódnak. [16]

A FXIII az osteoblasztok differenciálódását is elősegíti. A citoplazmatikus FXIII-A (cFXIII-A) elősegíti az I. típusú kollagén és a fibronektin szekrécióját úgy, hogy a GLU-tubulinon keresztkötéseket hoz létre, ezzel elősegítve az extracelluláris mátrixba való szekréciót. A megemelkedett FXIII-A szint elősegíti a pre-osteoblasztok osteoblasztokká történő érését az I.

típusú kollagén közreműködésével. Ezek a keresztkötések elősegítik a csontmátrix mineralizálódását. [17]

Monocitákban a cFXIII keresztkötéseket hoznak létre az AT1R receptor citoplazmatikus részén, melynek következtében az angiotenzin II molekula hozzá kötődik a receptorhoz. Ezt követően a monociták aktiválódnak és az endotheliumhoz kötődnek. [17] A FXIII-A monocitákban is citoplazmatikusan van jelen, azonban makrofágokká történő differenciálódás során megjelenik a sejtmagban is. [8]

A fibronectin FXIII-A által katalizált keresztkötéseinek sokféle szerepe van a trombusképzésben és a sebgyógyulásban, továbbá az extracelluláris mátrix összeállításában és a sejt-mátrix kölcsönhatásokban. Megakaryocitákban az FXIII-A stabilizálja a megakaryocita és az I. típusú kollagén interakcióját a fibronectin fibrillogenezise révén. A folyamat gátolja a vérlemezkék kialakulását. [17, 18]

A FXIII-A a szaruhátya alapszövetében is kifejeződik, még hozzá nem máshonnan szállítódik ide, hanem közvetlenül itt szintetizálódik. Az még nem teljesen tisztázott, hogy a cFXIII milyen mechanizmus révén jelenik meg a sejtek felszínén, ahol feltehetőleg keresztkötő molekulaként részt vesz a differenciált epithel sejtek kialakulásában. [19]

A döntően intracelluláris FXIII-A monociták és makrofágok felületén is kifejeződve immunmodulátorként funkcionál. A leukociták esetében egyéb intracelluláris és extracelluláris folyamatokban is részt vesz, melyek egyelőre még nincsenek megfelelően azonosítva. [20]

Makrofágokon [21], megakaryocitákon [22] és monocitákon [23] történt azonosítását követően normál perifériás vérben keringő leukocitákban is leírták kifejeződését. [24] A makrofágok esetében egy alternatív vagy egy klasszikus útvonalon keresztül aktiválódnak, függően attól, hogy milyen behatás éri a sejteket. A klasszikus útvonalon aktivált (M1) makrofágok esetében a stimulus valamilyen immunmediátor, interferon-gamma, lipopoliszacharid vagy tumor

nekrózis faktor. Ebben az esetben a FXIII-A alulexpresszáltan jelenik meg. Az alternatív aktiváció során (M2) az aktivációt kiváltó behatás egy anti-immflamatorikus mediátor, mint az interleukin-4, és interleukin-13. Ebben az esetben a FXIII-A szint felülexpresszált állapotban van. [14]

Ugyancsak az utóbbi két évtized felismerése, hogy a FXIII-A alegység malignusan transzformált sejtekben és szövetekben is kifejeződik. Így azonosították szájüregi nyálkahártya daganatokban [25], promyelocitás leukémiában [26], akut myeloid leukémiában [24], Hodgkin limfómában [27], leukémiás limfoblasztokon. [1] Jelen munka a FXIII A alegység akut lymphoblasztos leukémia (ALL) lymphoblastokban történő kifejeződésével foglalkozik.

## **2.2 A FXIII-A kifejeződése leukémiában**

A FXIII-A véralvadásban betöltött szerepével kapcsolatos kutatásokhoz képest viszonylag kevés irodalom áll rendelkezésünkre a FXIII-A kifejeződéséről, kifejeződésének szabályozásáról és biológiai szerepéről a leukémiásan transzformált sejtekben.

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. [28] 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 megakariocita típusok esetében, és jelenléte nagymértékben prediktív mono- és megakariocita AML-re, valamint CMML-re nézve. [24]

Megkönnyítette a FXIII-A meghatározást az áramlási citometriai (FC) eljárások során alkalmazott, fluorokrómmal konjugált monoklonális antitesttel történő FXIII-A jelölés.[24].

Az FC eljárással folytatott szisztematikus leukémia immunfenotipizálásnak köszönhető munkacsoportunk eredeti felismerése, miszerint, váratlan módon, a FXIII-A BCP-ALL blasztokban is kifejeződik. Az FC eljárással sikeresen azonosított FXIII-A kifejeződés Western-blot, ELISA és konfokális lézer scanning mikroszkóp vizsgálatokkal is alátámasztható volt. A vizsgálatban 47 újonnan diagnosztizált progenitor B-sejtes ALL mintát analizáltak 3-színű FC módszerrel. A leukémiás mintákon kívül 10 normál csontvelői és 10 normál perifériás vérmintát is analizáltak. A mintákat a FXIII-A kifejeződés tekintetében két csoportra osztották: amennyiben a FXIII-A kifejeződés 20% alatti, akkor a minta FXIII-A negatív, 20% feletti mért szint esetén FXIII-A pozitívnak tekinthető. A 47 mintából 19 (40%) bizonyult pozitívnak és 28 (60%) negatívnak. Összevetették a FXIII-A kifejeződést egyéb más immunfenotípus markerekkel és megállapították, hogy nem mutatott összefüggést egyéb B-sejt markerek megjelenésével. Feltehetőleg az alacsony esetszám miatt egyéb prognosztikai faktorokkal sem volt szignifikáns összefüggés. Figyelemreméltó módon FXIII-A pozitivitást nem lehetett sem élettani, sem leukémiás érett B-sejtekben kimutatni, valamint egészséges csontvelői eredetű B-sejt prekurzorok sem fezték ki a molekulát. Így elmondható, hogy ebben a sejtvonalban leukémia-specifikus markernek tekinthető. [1]

### **2.3 Akut lymphoblastos leukémia (ALL)**

A leukémia a vérközpőrendszer betegsége, mely a csontvelőből indul ki. Attól függően, hogy mely sejtvonalból alakul ki, megkülönböztetünk lymphoid és myeloid leukémiát. A kialakult betegség kezeletlen lefolyása alapján akut vagy krónikus fajtáját különítjük el. [29] Gyermekkorban a leggyakoribb daganatos megbetegedés. Az egyre nagyobb ütemben elterjedő kockázat-arányos terápiának köszönhetően gyógyulási aránya meghaladja a 80%-ot. [30]

A leukémia kialakulásában genetikai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak. A genetikai hajlamosító tényezők következtében jellegzetes, ismétlődő szerzett kromoszóma rendellenességek, molekuláris módszerekkel kimutatható génmutációk keletkeznek, amelyek

következtében megváltozik a vérképző sejtek működése, szaporodásuk, differenciálódásuk és apoptózisuk egyensúlya. Morfológiailag atípusos sejtekből álló, infiltratív tulajdonságú klón okoz betegséget. [31, 32] Az genetikai hajlam sejtelettani alapjait olyan örökletes betegségek molekuláris vizsgálata segíthet tisztázni, amelyekhez gyakran társul leukémia. [33] Igazoltan hozzájárulnak a leukémia kialakulásához olyan környezeti tényezők, mint az alkilálószeres, a benzol és származékai, ionizáló sugárzás. [34]

A gyermekkori ALL klinikai képe igen változatos. A láz, sápadtság, antibiotikumra nem reagáló visszatérő fertőzések, az izomfájdalom, lehangoltság mind alkothatja azt a tünetegyüttest, mely okot adhat a hematológusnak a gyanúra. A diagnózis felállításához elengedhetetlen a csontvelő vizsgálata. [34] A 2016-ban megjelent World Health Organization (WHO) által megállapított kritériumok alapján a leukémia három nagy csoportra osztható: kevert sejt akut leukémiák, B-sejt lymphoblasztos leukémia és T-sejt lymphoblasztos leukémia [31] (1. táblázat).

## A B-lymphoblasztos leukémia WHO szerinti besorolása

B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma, NOS (nem erythroid altípus)
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma ismert genetikai eltérésekkel
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> transzlokációval
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> átrendeződéssel
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> transzlokációval
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma hyperdiploiditással
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma hypodiploiditással
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i> transzlokációval
B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Ideiglenes változat: B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma, BCR-ABL1-like</i>
<i>Ideiglenes változat: B-lymphoblasztos leukémia/lymphoma, iAMP21</i>

1.táblázat. Akut lymphoblasztos leukémia WHO szerinti besorolása.

### 2.4 A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia prognosztikai jellemzői

A gyermekkori akut lymphoblasztos leukémia prognosztikai besorolását már az 1980-as évektől fogva pontosítják a kutatók. A megfigyelések alapját a kezdeti fehérvérsejt szám, a nemek közötti különbségek, az betegek életkora adta, melyek alapján csoportokat különítettek el a betegség kimenetelét tekintve. [35]

Az elmúlt mintegy 10 évben egyre nagyobb hangsúly fordítódik a gyermekkori ALL minél pontosabb genetikai feltérképezése. A betegség prognosztikai tényezői alapján három rizikócsoportba sorolhatjuk a diagnosztizált eseteket: standard (SR), közepes (IR) és magas (HR) kockázati csoport.

Prognosztikai szempontból kedvező rizikójú csoportba sorolható a magas hyperdiploiditással (51-65 kromoszóma), valamint t(12;21)/*ETV6-RUNX1* transzlokációval rendelkező esetek,

rossz prognózisúak a  $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$ ,  $t(v;11q23)/KMT2A$  (*MLL*) átrendeződésű, közel haploid (<30 kromoszóma), alacsony hypodiploid/közel triploid (3-39/60-78 kromoszóma), a 21 kromoszóma intrakromozómális amplifikációval (iAMP21), valamint  $t(17;19)(q23;p13)/TCF-HLF$  genetikával rendelkező esetek [36] (2. táblázat).

<b>Genetikai eltérések szempontjából kedvező rizikójú csoport</b>
Citogenetikai eltérések szempontjából kedvező rizikójú
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>ETV6-RUNX1</i>/<math>t(12;21)(p13;q22)</math></li> <li>• Magasan hyperdiploid (51-65 kromoszóma)</li> </ul>
Kópiaszám eltérések szempontjából kedvező rizikójú
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nincs deléción az <i>IKZF1</i>, <i>CDKN2A/B</i>, <i>PARI</i>, <i>BTG1</i>, <i>EBF1</i>, <i>PAX5</i>, <i>ETV6</i> és <i>RBI</i> génekben</li> <li>• Izolált deléción figyelhető meg a <i>ETV6</i>, <i>PAX5</i> és <i>BTG1</i> gének esetében</li> <li>• <i>ETV6</i> deléción van jelen <i>BTG1</i>, <i>PAX5</i>, vagy <i>CDKN2A/B</i> gének deléciójával</li> </ul>
<b>Genetikai eltérések szempontjából kedvezőtlen rizikójú csoport</b>
Citogenetikai eltérések szempontjából magasan kedvezőtlen rizikójú alcsoport
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1</math> transzlokáció</li> <li>• <i>MLL</i>/11q23 transzlokáció</li> <li>• Közel haploid (&lt;30 kromoszóma)</li> <li>• Alacsonyan hypodiploid/közel triloid (30-39/60-78 kromoszóma)</li> <li>• a 21-es kromoszóma intrakromozómális amplifikációja (iAMP21)</li> <li>• <math>t(17;19)(q23;p13)/TCF3-HLF</math></li> </ul>
Kópiaszám eltérések szempontjából közepes vagy kedvezőtlen rizikójú
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Az <i>IKZF1</i>, <i>PARI</i>, <i>EBF1</i> vagy <i>RBI</i> deléciója</li> <li>• Bármilyen kópiaszám eltérés, ami fentebb nem lett megemlítve</li> </ul>

2.táblázat. Gyermekekori akut lymphoblasztos leukémia prognosztikai csoportjainak jellemzése

## 2.5 A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia genetikai jellemzői

Számos tanulmány vizsgálja az esetleges újabb genetikai változások meglétét és hatását a betegség kimenetelére vonatkozóan. A széles körben elérhető molekuláris genetikai eljárásoknak köszönhetően egyre több gén kerül azonosításra, melyek lehetőséget adnak a még nem azonosított genetikai alcsoportok elkülönítésére. [37-39]

A 2016-os WHO már új, különálló alcsoportként említi a *BCR-ABL1*-like (Philadelphia-like) és a 21-es kromoszóma intrakromoszómális amplifikációjának (iAMP21) átrendeződésével rendelkező eseteket. [31] Mind a *BCR-ABL1*-like, mind az iAMP21 esetekre jellemző a kemoterápiás kezelésekre adott rossz válasz, valamint a betegség visszaesésére való hajlam. [40]

A BCP-ALL-es betegesetek közel 30%-ában fordulnak elő még genetikailag nem azonosított eltérések. Ezeket az eseteket a közepes rizikójú (IR) csoportba sorolják és egységesen 'B-other' elnevezést kaptak. Ez a kategória igen változatos és az elmúlt néhány évben egyre nagyobb figyelmet fordítanak a feltérképezésére, hiszen az ebbe a csoportba sorolt betegek túlélési aránya igen változatos. A genetikai eltérések meghatározását megnehezíti, hogy nincsenek olyan citogenetikai eljárások, amelyekkel könnyen azonosíthatók lehetnének az esetleges változások, így bonyolult, idő- és költségigényes molekuláris genetikai vizsgálmódszerekkel próbálják minél szélesebben azonosítani ennek az alcsoportnak a lehetséges genetikai elváltozásait. [41, 42] A napi diagnosztika szempontjából igény mutatkozik olyan vizsgálatok, vizsgálati panelek kidolgozására, amelyekkel viszonylag egyszerűen és a klinikum számára elfogadható átfutási idejű eredményszolgáltatással („turn-around-time”-mal) válhatnak azonosíthatóvá a kedvezőtlen prognosztikával társuló, és esetleg további vizsgálatokat igénylő esetek.

## 2.6 A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia kezelési sémái

A gyermekkori ALL kezelésére fejlesztett számos protokoll alapját a kockázatbecslésen alapuló kombinált kemoterápia képviseli. A hazánkban is alkalmazott ALL IC-BFM 2002 tanulmány alapján a betegek kezelése indukciós fázisra, konszolidációs fázisra, késői intenzifikációs fázisra, fenntartó kezelésre és központi idegrendszeri profilaxis/kezelésre bontják. Az indukciós fázisban a rizikócsoporthoz megfelelően prednison, methotrexátot, daunorubicint, vincristint, L-aszparaginázt, cyclophosphamidot, 6-mercaptopurint, cytarabint kapnak a betegek. Konszolidációs fázisban a vezető szerep a magas, illetőleg közepesen magas dóziséű methotrexáté a „farmakológiai szentélyekben” megmaradt blastok elpusztítása érdekében. Ez a kezelés a magas kockázatú betegek esetében videssinnel, dexamethasonnal, és ifosfammiddal, nagy dóziséű cytarabinnal egészül ki. A késői intenzifikáció során a betegek dexamethason, vincristin, doxorubicin, L-aszparaginázt, cyclophosphamidot, methotrexátot, cytarabint és 6-thioguanint kapnak. A fenntartó kezelés során már csak két kemoterápiás készítményt kapnak a betegek, methotrexátot és 6-mercaptopurint. A központi idegrendszeri érintettség elkerülése érdekében intrathecalis metotrexát terápia alkalmaznak. [30]

A nemzetközi Berlin-Frankfurt-Münster Klinikai Munkacsoport (I-BFM-SG) által kidolgozott protokollok az évek folyamán egyre pontosabbá váltak. [43] Magyarország az ALL IC-BFM 2002 klinikai vizsgálathoz csatlakozott, mely tanulmány a betegeket három rizikócsoporthoz sorolja: 1) standard rizikójú (SR) csoportba tartoznak a prednison monoterápiára jól reagáló (PGR),  $\geq 1$  évnél idősebb, 6 évnél fiatalabb, kezdeti fehérvérsejtszáma (WBC) kevesebb, mint  $20 \times 10^9/L$ , a 15. napi csontvelői kép alapján M1 ( $<5\%$  blaszt arány) vagy M2 ( $\geq 5\% - <25\%$  blaszt arány) és a 33. napi csontvelői kép alapján M1 kategóriába tartozó esetek; 2) közepes rizikójú csoportba (IR) a PGR, az 1 év alatti, a 6 éves vagy annál idősebb,  $WBC \geq 20 \times 10^9/L$ , a 15. napi csontvelő alapján M1 vagy M2, a 33. napi csontvelői minta alapján M1, vagy SR kategóriába sorolt, de a 15. napi csontvelői adatok alapján M3 ( $\geq 25\%$  blaszt arány) és a 33. napi

csontvelői kenet alapján M1 besorolásba tartozó betegek; 3) magas rizikójú csoportba (HR) tartoznak azok az esetek, ahol az alábbi feltételek teljesülnek: prednisolon monoterápiára rosszul reagál (PPR), IR és a 15. napi csontvelői minta alapján M3, a 33. napi csontvelői kenet alapján M2 vagy M3, t(9;22) (BCR-ABL), vagy t(4;11) (MLL-AF4) átrendeződés igazolódott. [30], (3. táblázat)

Rizikó csoportok	Kritériumok
standard rizikójú csoport (SR)	prednisolon monoterápiára jól reagál (PGR)
	≥1 évnél idősebb, 6 évnél fiatalabb
	kezdeti fehérvérsejtszáma (WBC) kevesebb, mint $20 \times 10^9/L$
	a 15. napi csontvelői kép alapján M1 (<5% blaszt arány) vagy M2 (≥5% - <25% blaszt arány) és a 33. napi csontvelői kép alapján M1 kategóriába tartozó esetek
közepes rizikójú csoport (IR)	prednisolon monoterápiára jól reagál (PGR)
	1 év alatti, a 6 éves vagy annál idősebb
	$WBC \geq 20 \times 10^9/L$
	15. napi csontvelő alapján M1 vagy M2,
	a 33. napi csontvelői minta alapján M1,
	vagy SR kategóriába sorolt, de a 15. napi csontvelői adatok alapján M3 (≥25% blaszt arány) és a 33. napi csontvelői kenet alapján M1 besorolásba tartozó betegek

magas rizikójú csoport (HR)	prednisolon monoterápiára rosszul reagál (PPR)
	IR és a 15. napi csontvelői minta alapján M3, a 33. napi csontvelői kenet alapján M2 vagy M3
	t(9;22) (BCR-ABL), vagy t(4;11) (MLL-AF4) átrendeződés igazolódott

3.táblázat. BFM ALL-IC 2002 klinikai vizsgálati protokollja alapján történő rizikó besorolás

Az utóbbi két évtized szisztematikus vizsgálatainak eredménye, hogy a minimális maradék betegség (MRD) meghatározása prognosztikai tényezőnek számít a gyermekkori BCP-ALL-es esetekben. A PCR technikán vagy FC-n alapuló módszer segítségével pontosabban meghatározható a betegség rizikóbesorolása. [44, 45] Az FC-val meghatározott MRD (FC-MRD) szenzitivitása nagyban függ a leukémiával társult immunfenotípus (LAIP) megjelenésével. Bizonyos LAIP-ok a betegség kimenetélre nézve speciális jellemzőkkel látják el a lymphoblasztokat. [46] Áramlási citometriával történő MRD meghatározás előnye, hogy leukémia specifikus monoklonális antitestekkel történő jelölést követően könnyen azonosíthatók a LAIP-ok. A BCP ALL-es esetekben a CD10, CD20, CD34 kifejeződésbeli változásai, valamint a CD58 túlságos kifejeződésének gyakorisága figyelhető meg. [47] A LAIP meghatározást minden esetben a diagnózisakor kell elvégezni. A LAIP-ra jellemző immunfenotípus csak a leukémiás sejtekre jellemző, normál csontvelői sejteken a LAIP-ra jellemző fenotípus nem jelenik meg. [48]

Áramlási citometriával történő MRD meghatározás 0,01% nagyságrendű pontossággal történik. Az elemzéshez megfelelő sejtszám szükséges (minimum 100 000 mononukleáris sejt) minden egyes antitest kombinációhoz, hogy a szenzitivitás megfeleljen a kritériumoknak. Az MRD

státusz egy igen meghatározó prognosztikai tényező ALL-ben. A legtöbb gyermekkori ALL-es protokoll az MRD eredmények alapján rizikó csoportokat különítenek el, melyek alapul szolgálnak a kezelési sémák kiválasztásában. A csoportok alapjait a kezelések különböző, meghatározott időpontjaiban (15. nap, 33. nap, 29. nap, 35. nap, 71. nap, 78. nap, 10. hét, 16. hét, 30. hét vagy később) mért MRD eredmények adják. A különböző ALL-es protokollok más és más időpontokat tűznek ki MRD meghatározásra. [49]

### 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 kapcsolatosan 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, alkot-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.

A vizsgálat a Helsinki Nyilatkozatnak mindenben megfelelően lett elvégezve. A betegek, szüleik/törvényes képviselőjük a BFM ALL-IC 2002 vizsgálatához - melynek szerves részét képezi a FC-vel történő immunfenotípus meghatározás - kapcsolódó betegtájékoztatót és a betegbeleegyező nyilatkozatot megkapták, aláírásukkal a vizsgálatban való részvételt elfogadták.

#### **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: CD10-FITC, CD19-APC, CD20-FITC, CD34-FITC, CD34-PerCP, CD38-PE, CD45 PerCP,  $\kappa$ -FITC,  $\lambda$ -PE (Becton Dickinson, San Jose, CA); CD58-FITC, CD66c-PE (Beckman Coulter, Brea, CA); CD10-PE, CD79 $\alpha$ -PE, TdT-Fitc, IgM-PE (DAKO, Glostrup, Dánia). A FXIII-A kifejeződését fluorescens isothiocianáttal (FITC) konjugáltatott monoklonális antitesttel mértünk (Sigma, St. Louis Mo). [50] 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. [47] 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. [51] 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-diamidido-2phenylindole) lettek megfestve. A protokollnak megfelelően 200 interfázisos sejtet vettünk alapul minden beteg esetében. A képeket fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioplan2 (Carl Zeiss, Zaventem, Brüsszel) készítettük, majd az eredményeket ISIS szoftver (Metasystems, Altussheim, Németország) segítségével analizáltuk. A betegeket a WHO szerinti genetikai csoportokba soroltuk: LR csoportba a  $t(12;21)/TEL/AML1$  és magas hyperhiploiditással rendelkező esetek; IR csoportba a 'B-other', a  $t(1;19)/TCF3-PBX1$  eseteket; HR csoportba a  $t(9;22)/BCR-ABL1$ , és a *KMT2A (MLL)* átrendeződéssel járó eseteket soroltuk. A vizsgált gyermekbetegek között  $t(5;14)IL3-IGH$  és hypodipliditással rendelkező eset nem voltak.

#### **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 betegség kimenetelét tekintve a betegeket FXIII-A pozitív és FXIII-A negatív csoportokra bontottuk a diagnózis idei minta alapján. Az eseménymentes túlélést (EFS) a diagnózis felállítását követően az utolsó orvosi megjelenéséig vagy az első visszaesésig, illetőleg a beteg esetleges haláláig követtük. A teljes túlélést (OS) retrospektív módon számoltuk ki a diagnózis dátumától az utolsó orvosi megjelenéséig vagy a beteg esetleges halálának dátumáig. 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 mellet a 95%-os megbízhatósági határt is megadtuk. A statisztikai analízisek az SPSS 20.0 biostatistikai programmal végeztük.

## **4.2 Prospektív vizsgálatok**

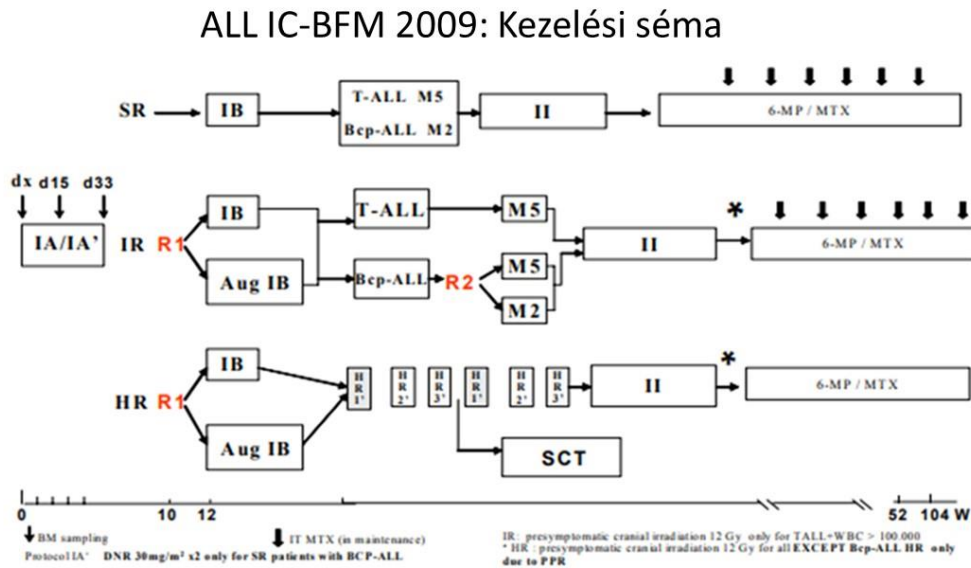
### **4.2.1 A tanulmányba bevont betegek, az adatok gyűjtése, kezelése**

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 csecsemőkorú 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 (lásd lentebb). 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 az 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 analizéséhez 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 abban az esetben, ha az FC-MRD <0,1% a beteg az áramlási citometriai rizikó csoport szerint az alacsony rizikójú csoportba (FLR); ha az FC-MRD 0,1% - <10% között volt, úgy a közepes rizikó csoportba (FMR); ha az FC-MRD  $\geq 10\%$ , úgy a magas rizikó csoportba (FHR) került a beteg. A standard rizikó csoportba (BFM-SR) azok az esetek kerültek, amelyek FLR státusszal és konvencionális rizikó faktorok szerinti SR besorolással rendelkeztek. Azok a betegek, aki a FMR, illetőleg FHR státusszal rendelkeztek, a betegség kórismézésekor, illetőleg a 8. napi prednisolon-válasz alapján, konvencionális módszerekkel meghatározott, esetleg kedvezőbb kockázati csoportból az intermedier rizikó csoportba (BFM-IR), illetőleg 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. [52, 53] Azok a betegek, aki IR BCP-ALL-lel lettek diagnosztizálva 2 g/m<sup>2</sup> methotretaxe (Mtx) kezelést kaptak az ALL IC-BFM 2002-es tanulmánynak megfelelően vagy 5 g/m<sup>2</sup> 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/m<sup>2</sup> methotretaxe (Mtx) kezelést kaptak. (1. ábra)



1.ábra. Az ALL IC-BFM 2009-es tanulmányban alkalmazott kezelési séma.

A vizsgálat a Helsinki Nyilatkozatnak, valamint az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (43033-1/2014/EUK(423/2014)) mindenben megfelelően lett elvégezve. Az betegek, szüleik / törvényes képviselőjük a kapcsolódó betegájékoztatót és a betegbeleegyező nyilatkozatot megkapták, aláírásukkal a vizsgálatban való részvételt elfogadták.

#### 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. [54] 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. 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: FXIII-A (FITC)–CD10(PE)–CD45 (PerCP-Cy5.5)–CD19(APC). Valamennyi immunfenotípus markert, így az FXIII-A jelölődést 20%, vagy azt meghaladó küszöbérték fölött tekintettük 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 ( $\geq$ 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) fluorescens mikrogönggyökkel történt. A vizsgálatban

részt vevő összes laboratórium részt vett az UK-NEQAS Leukocyte Immunophenotyping MRD programban, valamint sikeresen teljesítették az ALLIC Annual Ring Trials-t. [55]

### 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: *BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1*, *MLL* (MetaSystems, Altlussheim, Németország). 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, melyek a következő próbákat tartalmazták: *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* géneket és a PAR1 régió génjeit (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*). 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*, *PAR1*, *BTG1*, *EBF1*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1* 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*, *PAR1*, *EBF1*, *RBI* génekben jelent meg delécio, illetőleg minden olyan genetikai elváltozást, amely a fentebbi csoportokban nem illettek bele. [36, 56-58]

#### **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 tesztel 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. A betegek, szüleik/törvényes képviselőjük a

mintagyűjtés előtt megkapták a vizsgálatról szóló betegtájékoztató és beteg beleegyező nyilatkozatokat, melyeket áttanulmányozták, felmerülő kérdéseikre a válaszokat a kezelőorvostól megkapták, két példányban aláírták, melyből 1-1 példányt a beteg orvosi dokumentációjába lefűztünk.

A tanulmány folyamán a betegek adatait az ICH-GCP előírásainak, valamint az aktuális hazai jogszabályoknak megfelelően kezeltük. Minden beteg egyéni azonosítót kapott, a prognosztikai paramétereket a Magyar Tumorregiszterben elérhető adatokból gyűjtöttem ki a Magyar Gyermekonkológiai Hálózat – Magyar Gyermekhematológusok és Gyermekonkológusok Társaságának engedélyével. 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 halmozott 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. [59] 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.

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

### 4.3.3 MicroArray és gén ontológiai analízis

Affymetrix GeneChip Human Primeview array segítségével 28.869 jól definiált gén kifejeződési mintázatát elemeztünk. 3'IVT Expression kiset (Affymetrix) valamint GeneChip WT Terminal Labeling and Control kiset (Affymetrix) használtunk 250 ng RNS minta amplifikációjához és azonosításához. A mintákat 16 órán keresztül 45°C-on hibridizáltuk, majd a standard mosási protokollnak megfelelően készítettük elő GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) génchipre 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  $\kappa$  értéke <0.4 volt.

### 4.3.4 Azonosított gének valós idejű minőségi polimeráz lánreakcióval (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  $\Delta C_t$  értékek alapján normalizáltuk. A *F13a1* génnel egyidejűleg kifejeződő validált géneket a STRING v11. [60] és a GeneHancer [61] szoftver alkalmazásával vizsgáltuk.

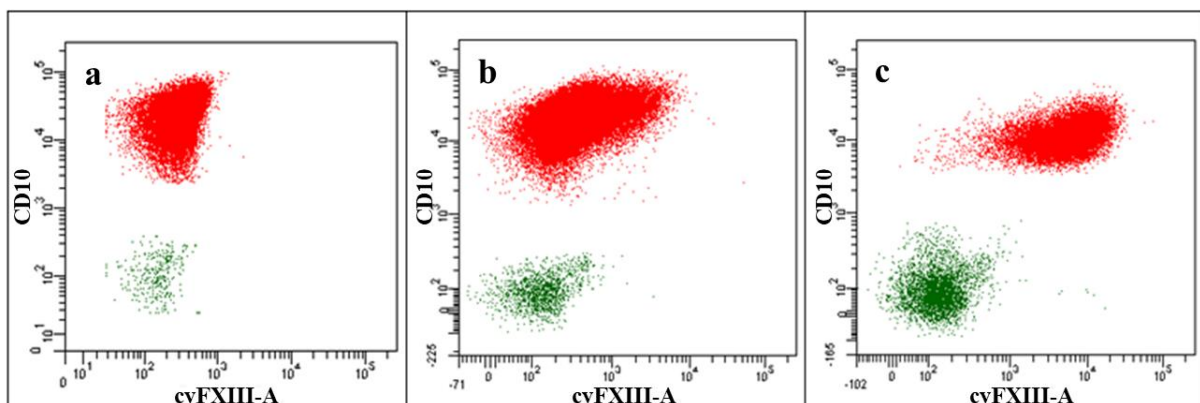
#### 4.3.5 Statisztikai analízis

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 [62], 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 (2. ábra).



2.ábra. A FXIII-A kifejeződés mintázata leukémiás limfoblasztokban. a) FXIII-A negatív mintázat (FXIII-A <20%), b) FXIII-A közepesen pozitív mintázat (FXIII-A 20%-80%), c) FXIII-A erősen pozitív mintázat (FXIII-A >80%). Piros dot: B-limfoblasztok, zöld dot: normál B sejt.

A FXIII-A pozitivitás cut-off-ját 20%-ra állítottuk be. A FXIII-A kifejeződés és az egyéb klinikobiológiai paraméterek közötti összefüggést a 4. táblázat mutatja.

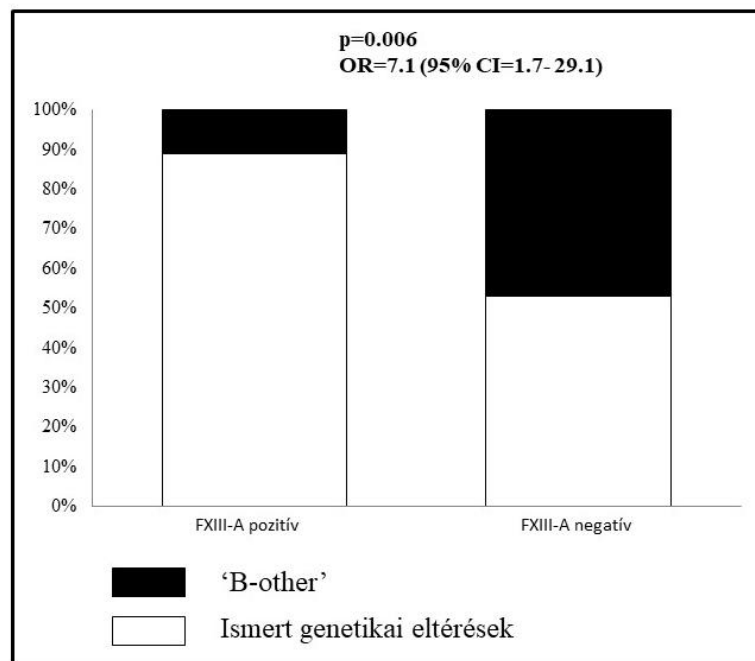
	<b>Összes</b>	<b>FXIII-A-pozitív</b>	<b>FXIII-A-negatív</b>
<b>Betegszám</b>	55	37	18
<b>Kor (évek)</b>	4.7 (1.3-17.9)	4.8 (1.3-17.9)	4.7(1.7-17.1)
<b>Nem (nő/férfi)</b>	32/23	21/16	11/7
<b>FVS (<math>\times 10^9</math> /L)</b>	8.5 (0.8-637.8)	8.9 (0.8-637.8)	8.1 (1.3-186.2)
<b>Rossz prednison válasz</b>	6 (12%)	2 (5.7%)	4 (29%)
<b>ALL IC BFM 2002 Szerinti rizikó csoport (SR/IR/HR/NA)</b>	18/24/9/4	14/16/3/4	4/8/6/-
<b>Genetikai rizikó csoport (jó/közepes/rossz)</b>	34/18/3	27/8/2	7/9/1
<b>Ismert genetikai eltérések</b>			
t(12;21)/ <i>TEL-AML1</i>	16 (30%)	13 (36%)	3 (18%)
magasan hyperdiploid	17 (32%)	13 (36%)	4 (24%)
t(1;19)/ <i>TCF3-PBX1</i>	5 (9%)	4 (11%)	1 (6%)
<i>MLL</i> átrendeződés	2 (4%)	1 (3%)	1 (6%)
t(9;22)/ <i>BCR-ABL1</i>	1 (2%)	1 (3%)	0 (0%)
<b>'B-other'</b>	12 (23%)	4 (11%)	8 (47%)
<b>FC rizikó csoportok (FLR/FMR/FHR/NA)</b>	17/19/6/13	12/16/2/7	5/3/4/6

4.táblázat. BCP-ALL betegek klinikai jellemzői. FVS: kezdeti fehérvérsejtszám, SR: standard rizikócsoport, IR: közepes rizikócsoport, HR: magas rizikócsoport, NA: egyik rizikócsoportba sem sorolható, FLR: MRD státusz alapján alacsony rizikócsoport, FMR: MRD státusz alapján közepes rizikócsoport, FHR: MRD státusz alapján magas rizikócsoport, NA: MRD státusz alapján egyik rizikócsoportba sem sorolható

A FXIII-A kifejeződés szempontjából a betegeket 2 csoportra, FXIII-A pozitív és FXIII-A negatív csoportra bontottuk (cut-off 20%). Az FC rizikócsoportokat a 15. napon FC-vel mért MRD státusz alapján különítettük el. Alacsony rizikó csoportba (FLR) a <0.1% lymphoblasttal rendelkező esetek, közepes rizikó csoportba (FMR) 0.1%-10% lymphoblasttal, míg a magas rizikó csoportba (FHR) >10% lymphoblasttal rendelkező esetek lettek csoportosítva. 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 az 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;  $p=0.006$ ) (3. ábra).



3.ábra. Genetikai alcsoportok és a FXIII-A kifejeződés közötti összefüggések. Ismert genetikai eltérések a következők: *BCR-ABL1*, *MLL* átrendeződés, *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)*, *E2A/PBX* és magas hyperdiploid.

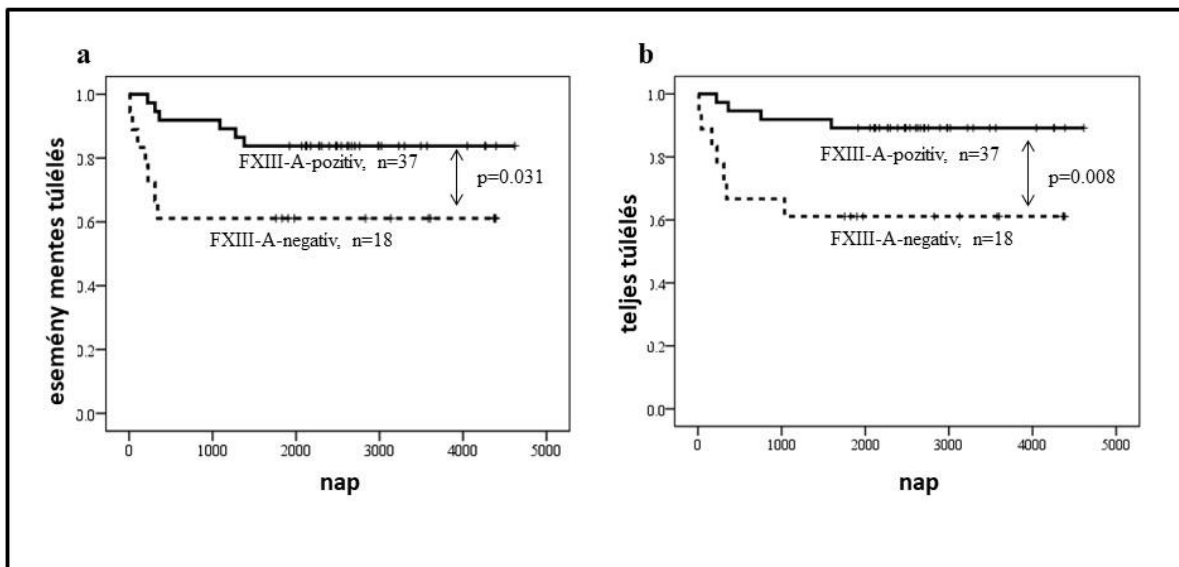
A FXIII-A és a 'B-other' genetikai alcsoport közötti összefüggést a multivariációs logisztikus regressziós analízis is alátámasztotta (OR: 7.1; 95%, CI: 1.7-29.1;  $p=0.006$ ). A két csoport

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;  $p=0.007$ ) (5.táblázat).

	P érték	Odds hányados	95% Megbízhatósági intervallum (CI)
FXIII -A és 'B-other'	0.006	7.1	1.7- 29.1
Kezdeti paraméterek, FXIII-A és 'B-other'	0.007	7.8	1.8-34.7

5.táblázat. Multivariációs logisztikus regressziós analízis a FXIII-A és egyéb klinikai paraméterek között.

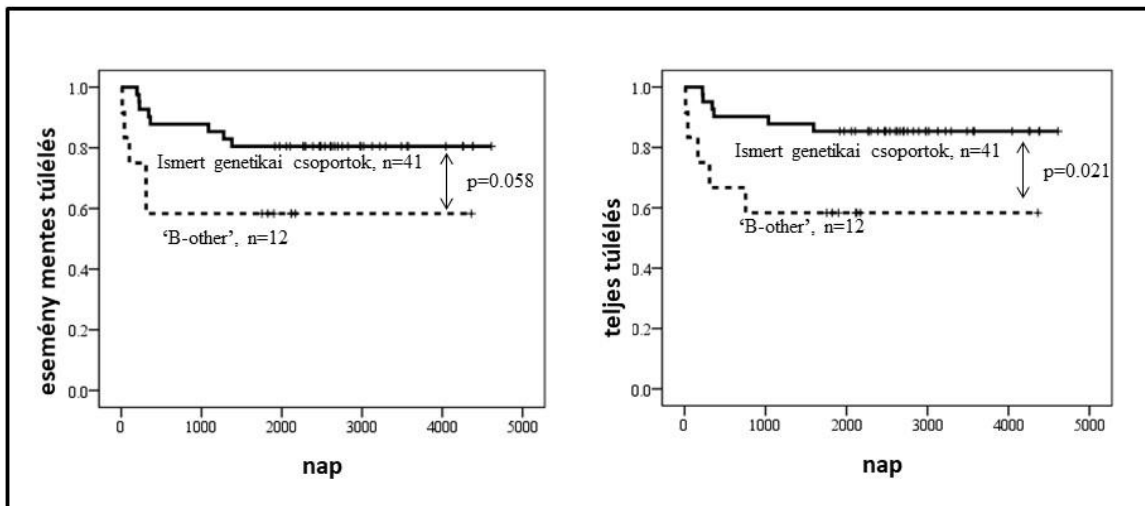
A Kaplan-Meier féle túlélési görbék szignifikáns különbséget mutattak a FXIII-A pozitív és a FXIII-A negatív csoportok között mind az eseménymentes túlélés (EFS) mind a túlélés (OS) tekintetében ( $p=0.031$  és  $p=0.008$ ; 4. ábra).



4.ábra. Az FXIII-A kifejeződés prognosztikai jelentősége BCP-ALL gyermekek esetében, Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján. a) eseménymentes túlélés, b) teljes túlélés

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  $p=0.021$ ) (5.ábra).



5.ábra. A 'B-other' genetikai alcsoport és az ismert genetikai eltérések közötti összefüggés a Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján.

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;  $p=0.025$ ) (6. táblázat).

	EFS			OS		
	P érték	Hazard hányados (HR)	95% Megbízhatósági intervallum (CI)	P érték	Hazard hányados (HR)	95% Megbízhatósági intervallum (CI)
Univariációs analízis						
'B-other'	0.07	2.8	0.9-8.6	0.057	2.2	0.98-5.04
Multivariációs analízis (FXIII, kor és FVS)						
FXIII	0.058	3.3	0.96-11.1	<b>0.025</b>	<b>4.8</b>	<b>1.2-19.2</b>
'B-other'	0.39	1.7	0.5-5.9	0.35	1.9	0.5-7.1

6.táblázat. Túlélési eredmények multivariációs Cox regressziós analízissel.

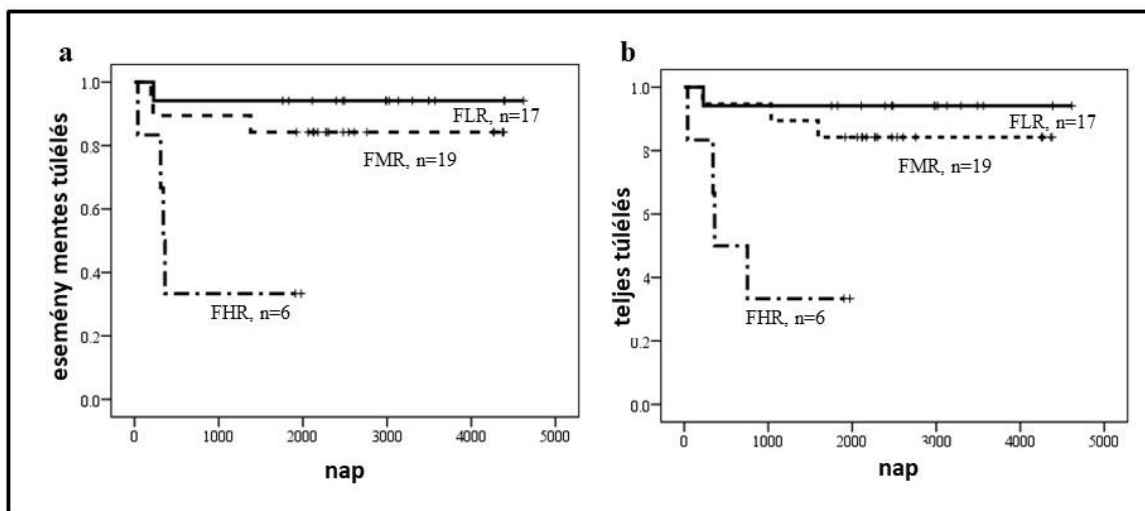
A fentebbi eredményt, miszerint a FXIII-A a vizsgált paraméterek között a legmeghatározóbb a túlélési adatok tekintetében egy másik uni- és multivariációs analízissel is sikerült alátámasztanunk. Ennél az elemzésnél az összes klinikai paraméter, belevéve az ismert genetikai alcsoportokat, a kezdeti paramétereket, mint a kor és a kezdeti FVS, a FXIII-A kifejeződést, vizsgáltuk az EFS és az OS tekintetében. Az eredmények mindkét esetben szignifikáns különbséget mutattak (7. táblázat).

	EFS			OS		
	P érték	Hazard hányados (HR)	95% Megbízhatósági intervallum (CI)	P érték	Hazard hányados	95% Megbízhatósági intervallum (CI)
Univariációs analízis						
FXIII-A	<b>0.041</b>	3.12	1.05-9.32	<b>0.016</b>	4.5	1.3-15.5
genetikai rizikó csoport	0.063	2.1	0.96-4.4	0.057	2.2	0.98-5.04
Multivariációs analízis (FXIII-A és genetikai rizikó csoport, kor, FVS)						
FXIII-A	<b>0.027</b>	3.6	1.2-11.3	<b>0.009</b>	5.6	1.5-20.12
genetikai rizikó csoport	0.24	1.7	0.7-4.1	0.23	1.8	0.7-4.9

7.táblázat. Uni- és multivariációs analízis.

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.

Az 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 (6.ábra).

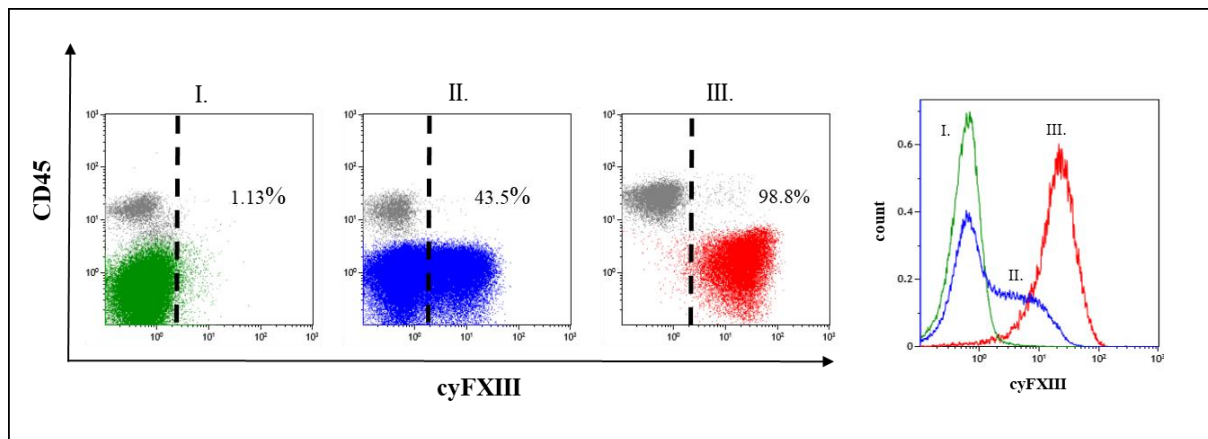


6.ábra. Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján kapott EFS és OS eredmények a 15. napi FC-MRD adatokat figyelembe véve. a) eseménymentes túlélés, b) tartós túlélés

## 5.2 Prospektív vizsgálatok eredményei

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

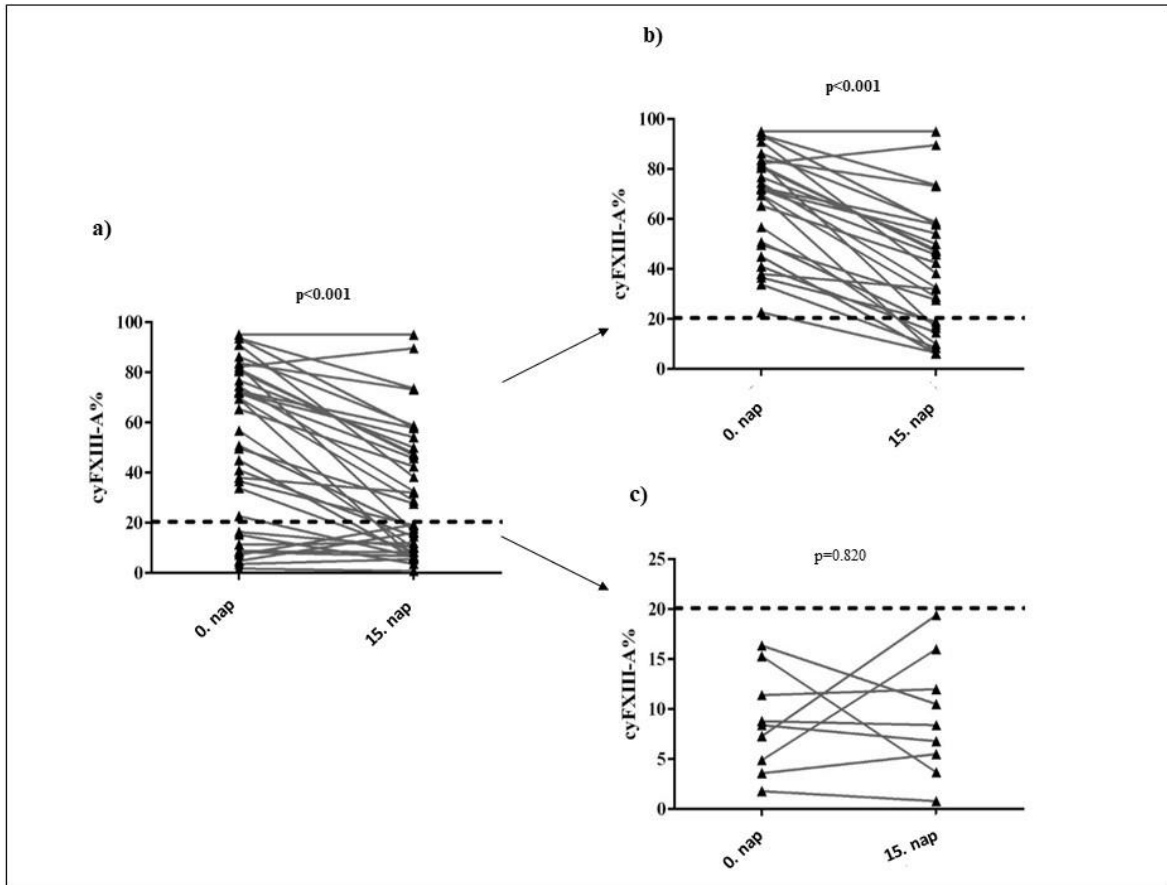
Prospektív vizsgálataink során a retrospektív vizsgálatainkkal szemben, három csoportot különítettünk el a FXIII-A kifejeződés szempontjából: a FXIII-A negatív (FXIII-A <20%), a FXIII-A dim (FXIII-A 20-79%) és a FXIII-A bright (FXIII-A 80%) csoportokat (7.ábra).



7.ábra. A citoplazmatikus FXIII-A három mintázatának dot plot és hisztogram képei. A három csoport: FXIII-A negatív (<20%; zöld), a FXIII-A dim (20-79%; kék) és a FXIII-A bright (>80%; piros). Kontrollként normál reziduális lymphoblastokat használtunk (szürke).

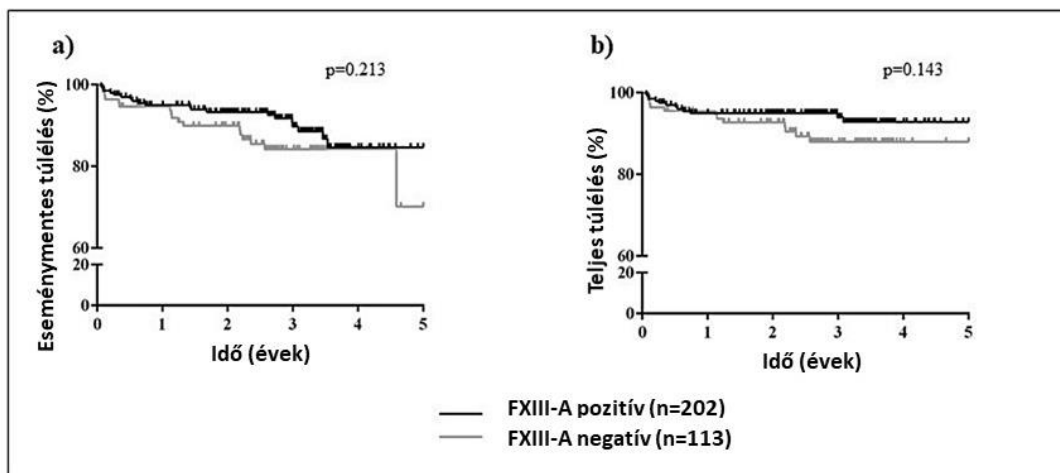
A hisztogram alapján elmondható, hogy a FXIII-A kifejeződés egy folyamatot ír le (kék vonal), melynek köszönhetően nehezen különíthető el élesen a FXIII-A negatív (zöld vonal) és a FXIII-A bright (piros vonal) csoporttól. A dot plot-okat elemezve elmondható, hogy a negatív kifejeződési mintázat esetén a leukémiás lymphoblastok átfedésben voltak a FXIII-A negatív normál limfocitákkal. A bright esetekben a leukémiás blast 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 (8. ábra).



8.ábra. A FXIII-A kifejeződés a diagnóziskor (0.nap) és a kezelés 15. napján (15.nap).

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. (9. ábra).

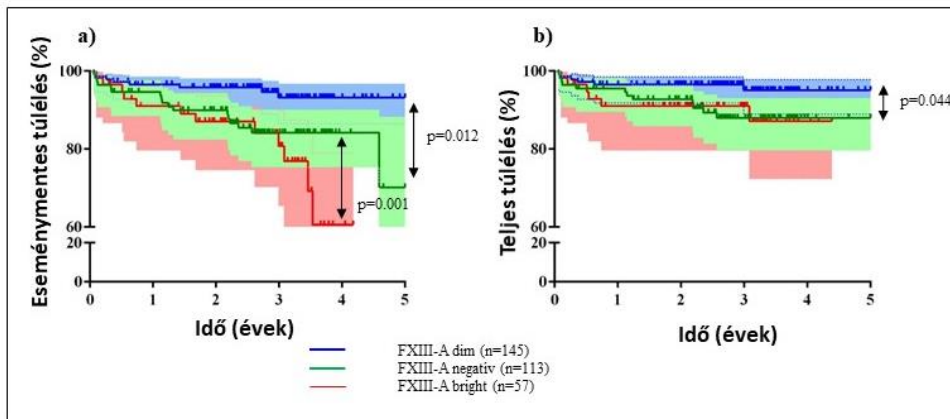


9.ábra. Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján meghatározott FXIII-A kifejeződés a két csoportban. a) eseménymentes túlélés, b) teljes túlélés

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% (10.ábra a)). 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 (10. ábra b)). 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.



10.ábra. Kaplan-Meier féle túlélési görbe alapján meghatározott FXIII-A kifejeződés a három csoport esetében. a) eseménymentes túlélés, b) tartós túlélés

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 esetén a szignifikancia megmaradt (8. táblázat).

Változók	Eseménymentes túlélés			Teljes túlélés		
	HR	95% CI	p-Érték	HR	95% CI	p-Érték
<b>Univariációs Analízis</b>						
FXIII-A kifejeződési mintázat						
FXIII-A negatív	2.91	1.17–7.21	<b>0.021</b>	2.63	0.88–7.84	0.084
FXIII-A dim	0.34	0.14–0.85		0.38	0.13–1.14	
Kor						
1–5 év	0.39	0.17–0.92	<b>0.032</b>	0.24	0.08–0.71	<b>0.010</b>
≥6 év	2.56	1.10–6.05		4.20	1.41–12.56	
FVS						
<20,000	0.69	0.29–1.66	0.407	0.60	0.21–1.71	0.334
≥20,000	1.45	0.60–3.51		1.69	0.58–4.86	
Nem						
Férfi	1.53	0.62–3.79	0.360	1.87	0.59–6.00	0.291
Nő	0.65	0.26–1.62		0.54	0.17–1.71	
prednizon válasz						
PGR	0.27	0.09–0.73	<b>0.010</b>	0.15	0.05–0.45	<b>0.001</b>
PPR	3.75	1.37–10.24		6.71	2.25–20.03	
FC rizikó csoportok						
FLR/FMR	1.43	0.40–5.13	0.581	1.18	0.25–5.54	0.838
FLR/FHR	3.37	0.78–14.58	0.104	3.40	0.62–18.56	0.158
ALLIC BFM 2009 csoportosítás						
BFM-HR/BFM-SR	0.12	0.01–0.95	<b>0.044</b>	0.00		
BFM-HR/BFM-IR	0.41	0.16–1.05	0.063	0.32	0.11–0.92	<b>0.035</b>
Genetikai rizikó csoportok						
jó/közepes	7.12	2.07–24.73	<b>0.002</b>	13.8	1.77–107.9	<b>0.012</b>
jó/magas	23.7	4.72–119.3	<b>&lt;0.001</b>	63.1	6.50–613.3	<b>&lt;0.001</b>
B-other						
Ismert genetikai eltérések	0.26	0.10–0.68	<b>0.006</b>	0.27	0.08–0.86	<b>0.027</b>
B-other	3.82	1.48–9.86		3.71	1.16–11.85	
<b>Multivariációs analízis</b>						
FXIII negatív	2.29	0.85–6.20	0.102	1.70	0.51–5.71	0.390
Genetikai rizikó csoportok						
jó/közepes	5.78	1.63–20.52	<b>0.007</b>	10.0	1.24–81.4	<b>0.031</b>
jó/magas	17.4	2.88–104.8	<b>0.002</b>	30.5	2.63–353.4	<b>0.006</b>

8.táblázat: A FXIII-A negatív és dim csoport, valamint a kategorikus változók összefüggései az eseménymentes (EFS) és a tartós (OS) túlélés tekintetében. FVS: kezdeti fehérvérsejtszám, PGR: prednisonra adott jó válasz, PPR: prednisonra adott rossz válasz, FLR: MRD státusz alapján alacsony rizikócsoport, FMR: MRD státusz alapján közepes rizikócsoport, FHR: MRD státusz alapján magas rizikócsoport, BFM-SR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján standard rizikócsoport, BFM-IR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján közepes rizikócsoport, BFM-HR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján magas rizikócsoport

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 (9. táblázat).

Változók	Eseménymentes túlélés			Teljes túlélés		
	HR	95% CI	p-Érték	HR	95% CI	p-Érték
<b>Univariációs analízis</b>						
FXIII-A kifejeződési mintázat						
FXIII-A dim	0.24	0.09–0.64	<b>0.004</b>	0.32	0.09–1.04	0.057
FXIII-A bright	4.10	1.56–10.78		3.17	0.97–10.38	
Kor						
1–5 év	0.52	0.19–1.37	0.186	0.32	0.10–1.05	0.060
≥6 év	1.92	0.73–5.06		3.13	0.96–10.28	
FVS						
<20,000	0.67	0.26–1.76	0.417	0.56	0.17–1.84	0.341
≥20,000	1.49	0.57–3.92		1.78	0.54–5.83	
Nem						
Férfi	1.43	0.53–3.86	0.483	2.08	0.55–7.86	0.278
Nő	0.70	0.26–1.90		0.48	0.18–1.81	
prednison válasz						
PGR	0.34	0.08–1.47	0.146	0.43	0.06–3.41	0.427
PPR	1.43	0.53–3.86		2.08	0.55–7.86	
FC rizikó csoportok						
FLR/FMR	0.90	0.27–2.83	0.857	1.33	0.24–5.54	0.863
FLR/FHR	1.25	0.23–6.81	0.801	2.59	0.36–18.43	0.342
ALLIC BFM 2009 klasszifikáció						
BFM-HR/BFM-SR	0.39	0.098–1.59	0.192	0.17	0.02–1.49	0.110
BFM-HR/BFM-IR	0.27	0.09–0.78	<b>0.015</b>	0.21	0.06–0.73	<b>0.014</b>
Genetikai rizikó csoportok						
jó/közepes	2.08	0.75–5.74	0.051	3.68	0.92–14.73	<b>0.065</b>
jó/magas	4.86	0.99–23.76	0.157	9.65	1.59–58.42	<b>0.014</b>
B-other						
Ismert genetikai elváltozások	0.55	0.21–1.44	0.225	0.41	0.12–1.33	0.137
B-other	1.80	0.70–4.78		2.46	0.75–8.07	
<b>Multivariációs analízis</b>						
FXIII-A bright	3.92	1.41–10.84	<b>0.009</b>	3.90	0.99–15.31	<b>0.051</b>
Genetikai rizikó csoportok						
jó/közepes	2.69	0.84–8.55	0.095	6.07	1.17–31.65	<b>0.032</b>
jó/magas	3.56	0.70–18.03	0.124	7.67	1.21–48.64	<b>0.031</b>

9.táblázat. A FXIII-A dim és bright csoport, valamint a kategorikus változók összefüggései az eseménymentes (EFS) és a tartós (OS) túlélés tekintetében. FVS: kezdeti fehérvérsejtszám, PGR: prednisonra adott jó válasz, PPR: prednisonra adott rossz válasz, FLR: MRD státusz alapján alacsony rizikócsoport, FMR: MRD státusz alapján közepes rizikócsoport, FHR: MRD státusz alapján magas rizikócsoport, BFM-SR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján standard rizikócsoport, BFM-IR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján közepes rizikócsoport, BFM-HR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján magas rizikócsoport

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 prednison 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 (10. táblázat).

Változók	Esemény mentes túlélés			Teljes túlélés		
	HR	95% CI	p-Érték	HR	95% CI	p-Érték
<b>Univariációs analízis</b>						
FXIII-A kifejeződési mintázat						
FXIII-A negatív	0.66	0.29–1.51	0.323	0.80	0.28–2.24	0.665
FXIII-A bright	1.52	0.66–3.47		1.26	0.45–3.54	
Kor						
1–5 év	0.52	0.24–1.17	0.116	0.36	0.13–1.02	0.056
≥6 év	1.90	0.85–4.24		2.75	0.98–7.72	
FVS						
<20,000	0.49	0.21–1.13	0.093	0.68	0.23–1.98	0.477
≥20,000	2.06	0.89–4.76		1.48	0.50–4.32	
Nem						
Férfi	1.21	0.53–2.78	0.647	1.43	0.49–4.17	0.518
Nő	0.82	0.36–1.89		0.70	0.24–2.05	
prednizon válasz						
PGR	0.36	0.13–0.96	<b>0.041</b>	0.28	0.09–0.87	<b>0.028</b>
PPR	2.81	1.04–7.58		3.61	1.15–11.35	
FC rizikó csoport						
FLR/FMR	2.48	0.72–8.56	0.150	1.90	0.41–8.80	0.411
FLR/FHR	3.29	0.77–13.9	0.106	3.53	0.65–19.28	0.145
ALLIC BFM 2009 klasszifikáció						
BFM-HR/BFM-SR	0.21	0.05–0.97	<b>0.045</b>	0.15	0.02–1.22	0.076
BFM-HR/BFM-IR	0.47	0.20–1.11	0.085	0.37	0.13–1.04	0.060
Genetikai rizikó csoport						
jó/közepes	2.14	0.89–5.17	0.091	2.50	0.75–8.30	0.135
jó/magas	6.48	1.69–24.84	<b>0.006</b>	10.5	2.33–47.2	<b>0.002</b>
B-other						
Ismert genetikai eltérések	0.61	0.27–1.36	0.228	0.66	0.24–1.81	0.413
B-other	1.64	0.73–3.67		1.53	0.55–4.21	
<b>Multivariációs analízis</b>						
FXIII-A bright	0.54	0.22–1.34	0.108	0.59	0.19–1.88	0.3751
Genetikai rizikó csoportok						
jó/közepes	2.33	0.87–6.22	0.091	2.63	0.68–10.25	0.164
jó/magas	4.55	1.14–18.15	<b>0.032</b>	7.44	1.54–36.00	<b>0.013</b>

10.táblázat. A FXIII-A negatív és bright csoport, valamint a kategorikus változók összefüggései az eseménymentes (EFS) és a tartós (OS) túlélés tekintetében. FVS: kezdeti fehérvérsejtszám, PGR: prednisonra adott jó válasz, PPR: prednisonra adott rossz válasz, FLR: MRD státusz alapján alacsony rizikócsoport, FMR: MRD státusz alapján közepes rizikócsoport, FHR: MRD státusz alapján magas rizikócsoport, BFM-SR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján standard rizikócsoport, BFM-IR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján közepes rizikócsoport, BFM-HR: ALL BFM-IC 2009 kockázati kategória alapján magas rizikócsoport

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 (11. táblázat). A különbségek azonban nem voltak szignifikánsak.

FXIII-A kifejeződési mintázat	CAN szerinti rizikó csoportok			
	Jó	Közepes	Rossz	Nincs CNA
Negatív	3	1	7	9
Dim	6	4	3	12
Bright	3	1	2	8

11.táblázat. A FXIII-A kifejeződés és a kópiaszám eltérések (CNA) közötti összefüggések vizsgálata.

### 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-négyszet 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 (12. táblázat).

FXIII-A kifejeződési mintázatok	<i>p</i> -Érték	OR	95% CI	
FXIII-A Negatív	Referencia csoport ("Alap kimenetel")			
FXIII-A dim				
"B-other" alcsoport	0.009	<b>0.49</b>	0.28	0.84
Nem	0.851	1.05	0.61	1.81
Kor	0.197	0.69	0.39	1.21
FVs	0.093	1.69	0.92	3.10
FXIII-A bright				
"B-other" alcsoport	0.004	<b>0.35</b>	0.18	0.71
Nem	0.726	0.89	0.46	1.72
Kor	0.581	0.82	0.41	1.64
FVS	0.393	1.38	0.66	2.92

12.táblázat. A FXIII-A kifejeződési mintázatok kapcsolata a konvencionális klinikai csoportokkal és a 'B-other' genetikai alcsoporttal, multinominális logisztikus regressziós analízist alkalmazva. FVS: kezdeti fehérvérsejtszám

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

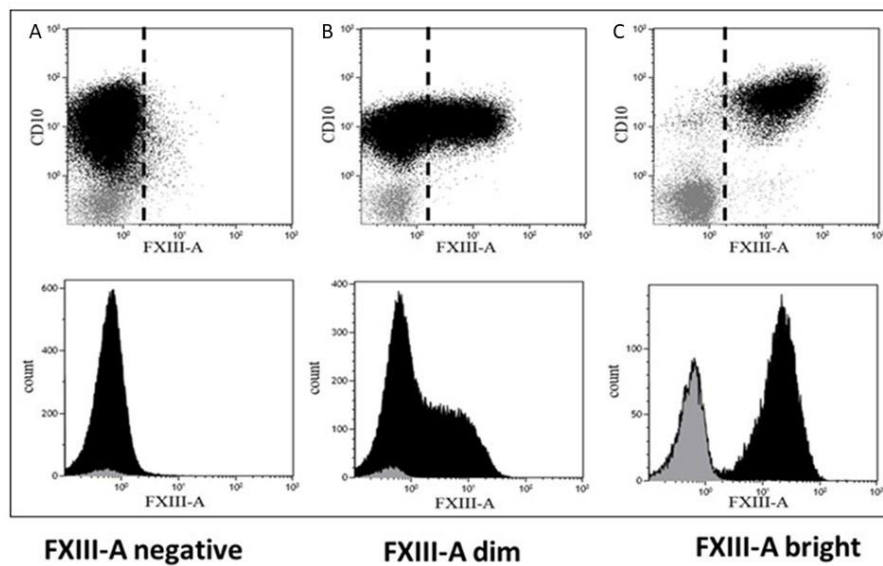
Vizsgálataink során 42 BCP ALL-es betegminta RNS-ét használtuk fel génexpressziós mintázat analízisére (13. táblázat).

Betegazonosító kód	Nem	Kor (évek)	Kezdeti FVS (G/L)	FXIII-A kifejeződés (%)	Genetikai csoportok	Kimenet (elhunyt/él)
cALL_RNS_13	M	8	3.9	10.9	iAMP21	elhunyt
cALL_RNS_14	M	11	19	1.4	B-other	elhunyt
cALL_RNS_15	M	3	5.9	5.1	B-other	Él
cALL_RNS_16	M	2	23.38	0.9	hyperdiploid	elhunyt
cALL_RNS_17	F	4	25.9	1.7	B-other	Él
cALL_RNS_26	M	0	8.33	2	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_33	F	12	22.6	5	B-other	Él
cALL_RNS_34	F	13	98.8	13	B-other	Él
cALL_RNS_35	M	2	10.45	1.8	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_36	F	1	11.03	4	TCF3/PBX1	Él
cALL_RNS_53	M	2	5.51	11.4	B-other	elhunyt
cALL_RNS_54	F	3	18.33	8.4	B-other	elhunyt

cALL_RNS_18	M	2	5.9	1,1	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_19	M	3	15.9	10.6	KMT2A	Él
cALL_RNS_45	F	1	11.37	28.8	B-other	elhunyt
cALL_RNS_46	F	1	5.71	32.6	ETV6/RUNX1	elhunyt
cALL_RNS_47	M	0	377	23	KMT2A	Él
cALL_RNS_58	F	4	12.14	41	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_59	F	3	4.4	48.9	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_60	M	6	3.31	34.6	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_61	M	4	8.9	52	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_62	F	2	21.91	71.9	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_63	M	3	3.62	45	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_64	F	2	5.3	71.9	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_44	M	8	19.73	76.8	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_50	M	3	7.28	59.6	B-other	Él
cALL_RNS_52	F	3	83.69	58	B-other	Él
cALL_RNS_55	F	2	12.34	56	hyperdiploid	elhunyt
cALL_RNS_56	M	12	10.5	24.9	B-other	elhunyt
cALL_RNS_57	F	7	1.33	35.6	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_51	F	16	12.38	25	B-other	Él
cALL_RNS_49	M	2	14.5	22.4	B-other	Él
cALL_RNS_02	F	10	6.51	95	B-other	elhunyt
cALL_RNS_03	F	15	5.64	72.5	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_04	F	5	5.1	69	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_01	F	1	222.8	85	B-other	elhunyt
cALL_RNS_05	F	12	19.54	95	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_06	F	16	48.55	94	KMT2A	Él
cALL_RNS_07	F	5	61.6	88	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_08	F	2	2.72	91	hyperdiploid	Él
cALL_RNS_09	F	4	8.12	82.3	ETV6/RUNX1	Él
cALL_RNS_37	M	16	20.1	98.9	hyperdiploid	Él

13.táblázat. Génexpressziós vizsgálatokba bevont BCP ALL-es minták klinikai jellemzői.

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 (11. ábra).



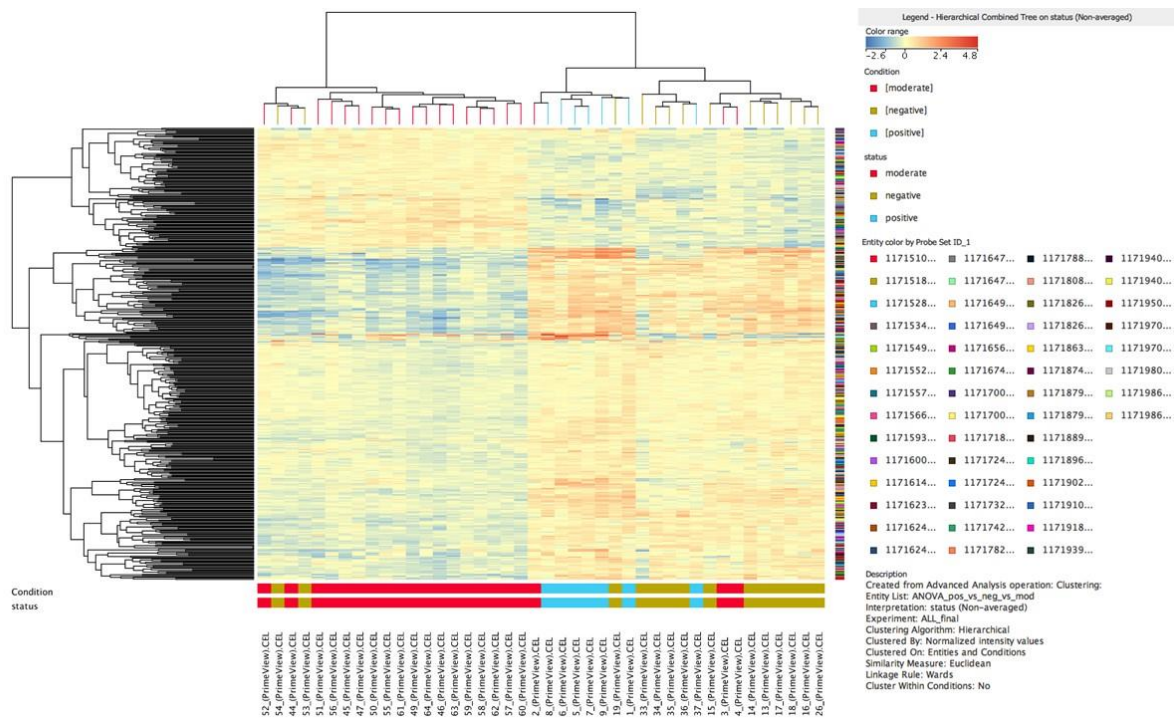
11.ábra. A FXIII-A három kifejeződési csoportja BCP-ALL-es betegek mintákon FC módszer segítségével. Kontrollként normál reziduális lymphoblastokat használtunk (szürke).

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

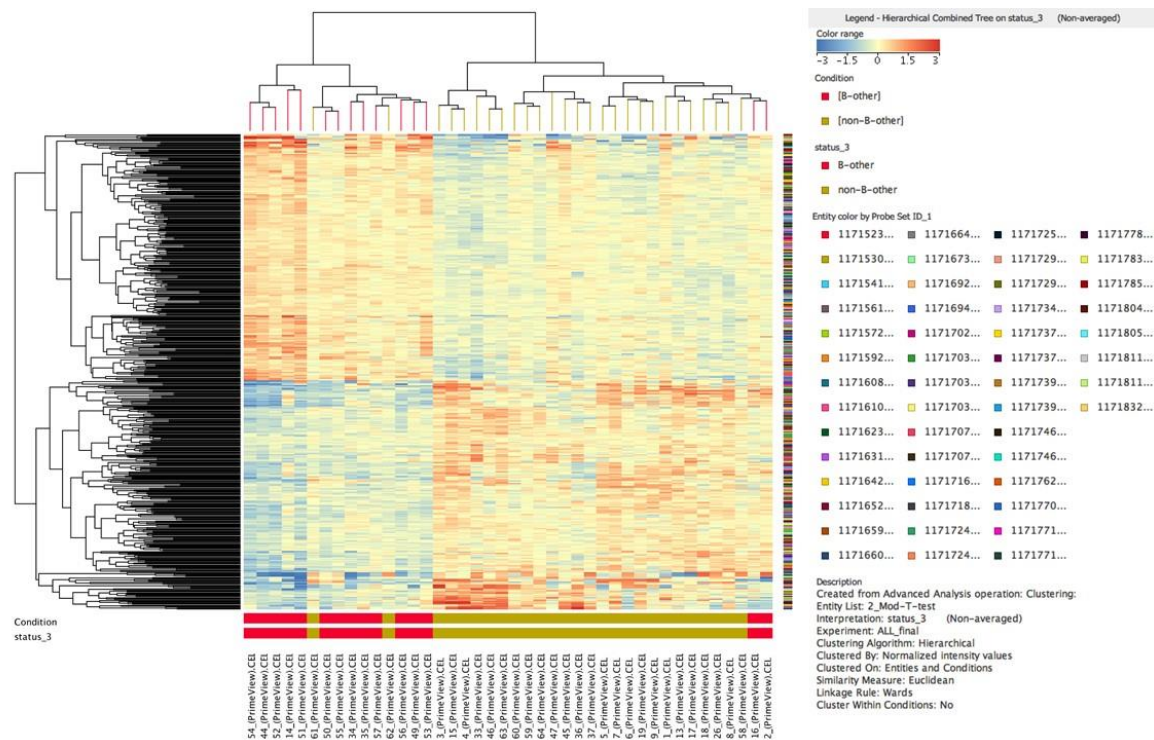
A differenciáltan kifejeződő géneket (DE) a FC módszer alapján megállapított FXIII-A kifejeződés és a 'B-other' genetikai alcsoport alapján határoztuk meg. A DE gének volcano plot módszer alkalmazásával voltak szűrve. A FXIII-A negatív és a FXIII-A bright csoportot összevetve 26 DE gént azonosítottunk. 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 elválnak 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 (12. ábra).



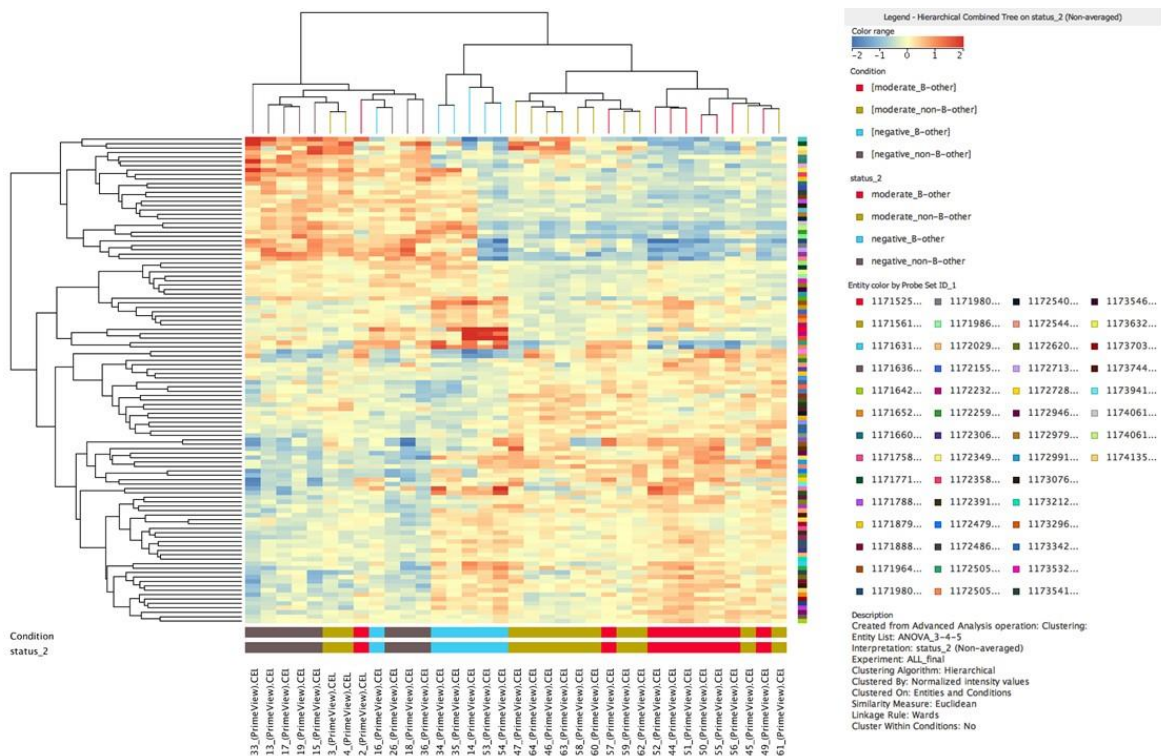
12.ábra. A FXIII-A géneexpressziós mintázatának heat map analízise. Piros: FXIII-A dim csoport, kék: FXIII-A bright csoport, barna: FXIII-A negatív csoport. Az oszlopok a betegeket, a sorok az azonosított géneket jelölik.

A 'B-other' genetikai alcsoport géneexpressziós 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 (13. ábra).



13.ábra. A 'B-other' genetikai alcsoport és a non-'B-other' genetikai alcsoport heat map analízise. Piros: 'B-other', barna: non-'B-other'. Az oszlopok a betegeket, a sorok az azonosított géneket jelölik.

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 (14. ábra).



14.ábra. A 'B-other' és a non-'B-other' genetikai alcsoportok, valamint az FXIII-A csoportok heat map analízise. Piros: FXIII-A dim és 'B-other', barna: FXIII-A dim és non-'B-other', kék: FXIII-A negatív és 'B-other', szürke: FXIII-A negatív és non-'B-other'. Az oszlopok a betegeket, a sorok az azonosított géneket jelölik.

### 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- $\epsilon$ -lizilamid keresztkötések képződését, és így oldhatatlan vérrög keletkezik (14. táblázat).

GO azonosító	GO annotációk	Korrigált p-érték
GO:0016569	kovalnes kromatin modifikáció	0,000032
GO:0016570	hiszton modifikáció	0,0000359
GO:0006325	kromatin szerveződés	0,000107
GO:0050779	RNS destabilizáció	0,000755
GO:1900118	apoptózis végső fázisának negatív regulációja	0,00114
GO:0034248	sejtes amidok anyagcsere folyamatának szabályozása	0,00129
GO:0010608	génexpresszió poszttranszkripciós szabályozása	0,00193
GO:0010608	génexpresszió poszttranszkripciós szabályozása	0,00193
GO:0006417	transzláció szabályozás	0,00197
GO:0097284	májsejtek apoptotikus folyamatai	0,00199
GO:0061038	uterus morfogenezis	0,00207
GO:0071478	sugárzásra adott sejtválasz	0,00210
GO:0061157	mRNS destabilizáció	0,00235
GO:0031330	sejtes katabolikus folyamat negatív szabályozása	0,00252
GO:0071482	fényingerekre adott sejtválasz	0,00276
GO:0016571	hiszton metiláció	0,00334
GO:0033169	hiszton H3-K9 demetiláció	0,00359
GO:0104004	környezeti ingerekre adott sejtválasz	0,00476
GO:0071214	abiotikus ingerekre adott sejtválasz	0,00476
GO:2000767	citoplazmatikus transzláció pozitív szabályozása	0,00563
GO:0048048	embrionális szem morfogenezise	0,00565
GO:0032074	nukleázaktivitás negatív szabályozása	0,00676
GO:0043487	RNS stabilitás szabályozása	0,00730
GO:0009895	katabolikus folyamatok negatív szabályozása	0,00749
GO:0048596	embrionális kamera-típusú szem morfogenezise	0,00913
GO:0018205	peptidyl-lizin modifikáció	0,00939

14.táblázat. Funkcionális jellemzőkkel rendelkező DE gének a FXIII-A státusz alapján

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*, *GPLY*, *PTPRC*, *STK4*, *TNFSF10*, *ATP2B1*, *DNAJC3*, *PLAC8*, *THRA*, *MAPKBP1*, *PER1*, *RORA*, *USP32*, *CCL5*, *GNG2*, *PLCB3*, *BCL10*, *CCL5*, *CD3G* (15. táblázat).

GO azonosító	GO annotáció	Korrigált p-érték
GO:0070228	limfocita apoptotikus folyamat szabályozása	0,000996
GO:0070229	limfocita apoptotikus folyamatok negatív szabályozása	0,00418
GO:0070232	T-sejt apoptotikus folyamatok szabályozása	0,00476
GO:2001238	extrinsic apoptotikus jelátviteli útvonal pozitív szabályozása	0,00346
GO:0009409	hidegre adott válasz	0,00191
GO:0043124	I-kappaB kináz/NF-kappaB jelátvitel negatív szabályozása	0,00343
GO:1905517	makrofág migráció	0,00215
GO:0048246	makrofág kemotaxis	0,00473
GO:1905521	makrofág migráció szabályozása	0,00313
GO:0007223	Wnt jelátviteli út, kalcium moduláló útvonal	0,00472
GO:0070227	limfocita apoptotikus folyamat	0,00221
GO:2000106	limfocita apoptotikus folyamat szabályozása	0,00306
GO:0070231	T-sejt apoptotikus folyamat	0,00287
GO:2000107	limfocita apoptotikus folyamatok negatív szabályozása	0,0101
GO:0006968	sejtes védekező válasz	0,0132

15.táblázat. A 'B-other' státusz alapján azonosított túlprezentált gének.

#### 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 (16. táblázat). Az RT-Q-PCR validálás során egyedül a *RORA* gént nem tudtuk detektálni, ami valószínűleg technikai hiba miatt történhetett.

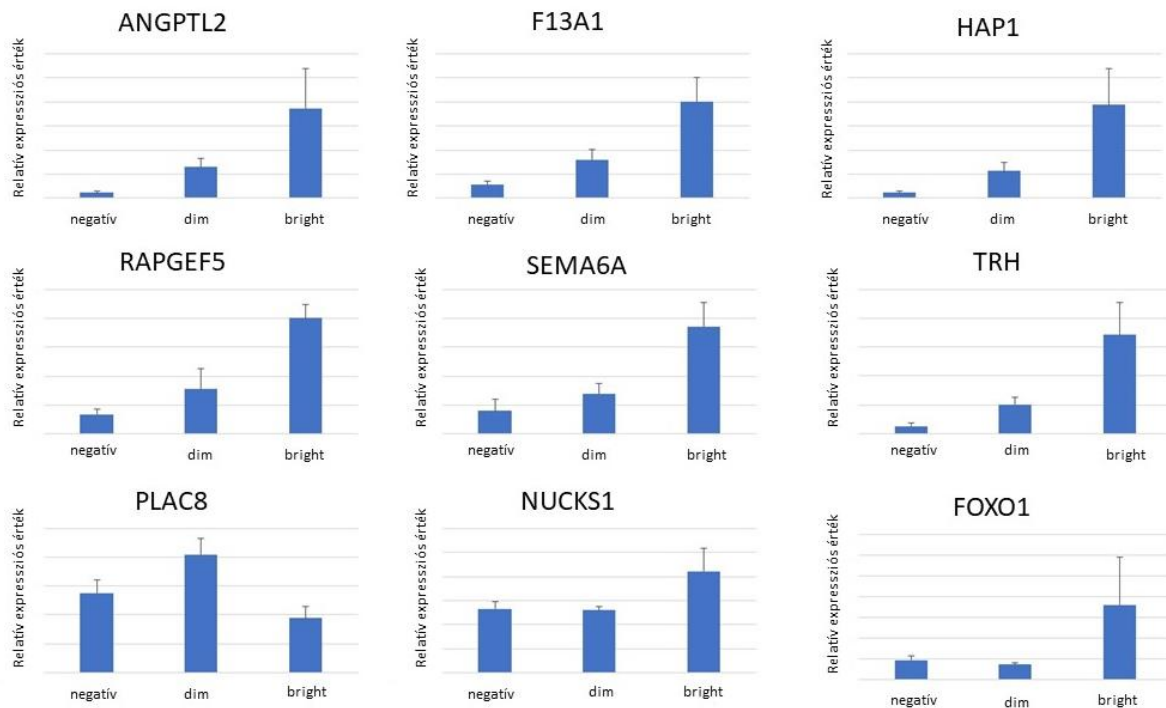
Validációra kiválasztott gének	Affymetrix MicroArray módszerrel azonosított fold change értékek			GO annotációk
	FXIII-A negatív/FXIII-A dim	FXIII-A negatív/FXIII-A bright	FXIII-A bright/FXIII-A dim	
WASF2	<b>0.94</b>	<b>0.50</b>	<b>0.53</b>	<b>Angiogenesis</b>
BCL2L1	0.79	0.60	0.75	apoptózis szabályozás
CASP2	0.90	0.79	0.88	apoptózis szabályozás
DFFA	0.33	0.39	1.19	apoptózis szabályozás
PAK2	1.91	1.07	0.56	apoptózis szabályozás
PIK3CG	1.58	1.62	1.03	apoptózis szabályozás
PKN2	1.43	1.26	0.88	apoptózis szabályozás
<b>SEMA6A</b>	<b>1.06</b>	<b>2.38</b>	<b>2.23</b>	apoptózis szabályozás
<b>CLSTN1</b>	<b>0.51</b>	<b>0.45</b>	<b>0.88</b>	<b>kalcium ion kötés</b>
IL7R	1.03	0.98	0.94	sejt differenciáció
PLAC8	1.30	1.33	1.02	sejt differenciáció
RORA	0.92	1.01	1.10	sejt differenciáció
<b>NUCKS1</b>	<b>1.56</b>	<b>1.41</b>	<b>0.90</b>	sejt differenciáció
<b>TRH</b>	<b>2.05</b>	<b>1.64</b>	<b>0.80</b>	<b>sejt-sejt jelátvitel</b>
FOXO1	1.53	1.28	0.84	glükokortikoid ingerekre adott sejtválasz
CX3CR1	0.83	1.63	1.97	kemokin receptor aktiváció
EHMT1*	1.18	1.22	1.03	kromatin modifikáció
ING5*	0.97	1.25	1.29	kromatin modifikáció
JMJD1C	0.97	0.67	0.69	kromatin modifikáció
WAC	1.24	1.50	1.21	kromatin modifikáció
SART3	5.90	2.55	0.43	kromatin modifikáció
<b>MDM2*</b>	<b>1.28</b>	<b>1.14</b>	<b>0.89</b>	<b>azonos fehérjekötés</b>
GIGYF1	3.84	5.07	1.32	inzulinszerű növekedési faktor receptor jelátviteli útvonal
GIGYF2	1.08	1.06	0.98	inzulinszerű növekedési faktor receptor jelátviteli útvonal
<b>TAOK1</b>	<b>4.60</b>	<b>2.67</b>	<b>0.58</b>	<b>kináz aktiváció</b>
<b>SPIN1</b>	<b>1.28</b>	<b>1.27</b>	<b>0.99</b>	<b>metilált hiszton kötés</b>
<b>MAP4</b>	<b>1.29</b>	<b>1.19</b>	<b>0.92</b>	<b>microtubulus kötés</b>
AKAP13	1.14	1.16	1.02	nukleáris export
KHDRBS1	1.66	1.21	0.73	nukleáris export
MAGOH	1.35	1.25	0.92	nukleáris export
NUP43*	1.12	1.00	0.89	nukleáris export
<b>ZC3H11A</b>	<b>12.64</b>	<b>3.37</b>	<b>0.27</b>	<b>nukleáris export</b>
POLDIP3	1.60	1.48	0.92	nukleáris export
SRSF5	1.14	1.28	1.12	nukleáris export
FGFR1OP	7.20	2.50	0.35	nukleáris export

HAP1	1.07	0.86	0.80	génexpresszió poszttranszkripció szabályozása
<b>F13A1</b>	<b>1.86</b>	<b>1.60</b>	<b>0.86</b>	<b>protein-glutamin gamma- glutamiltranszferáz aktivitás</b>
CCL5	1.16	1.12	0.97	fehérje homodimerizáció
CD3G	0.80	0.65	0.81	fehérje heterodimerizáció
<b>RAPGEF5</b>	<b>1.35</b>	<b>1.22</b>	<b>0.90</b>	<b>Ras jelátviteli útvonal</b>
<b>ANGPTL2</b>	<b>16.94</b>	<b>2.89</b>	<b>0.17</b>	<b>jelátviteli receptor kötés</b>
DHX36	0.83	0.80	0.96	transzláció szabályozás
INTS3	17.71	3.41	0.19	transzláció szabályozás
RC3H1	0.69	0.46	0.67	transzláció szabályozás
SECISBP2L	1.45	1.54	1.06	transzláció szabályozás

16.táblázat. Az RT-Q-PCR validálásra kiválasztott gének Affymetrix MicroArray módszerrel azonosított fold change értékek (félkövér karakterekkel szedve), valamint a GO annotációk alapján. A \*-gal jelölt gének a GO annotáció alapján azonosított peptidil-lizin módosulást eredményező biológiai folyamatokban vesznek részt (GO:0018205).

### 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 az *ANGPTL2*, *RAPGEF5*, *SEMA6A*, *HAP1*, *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 (15. ábra).



15.ábra. Az RT-Q-PCR módszerrel validált gének FXIII-A státusz szerinti intenzitás megoszlása.

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 enhancer (fokozó) folyamatokat, amelyek szerepet játszhatnak a *F13A1* gén és a validált gének közötti párhuzamos felszabályozásban. Az *ATF7*, *POLR2A*, *RAD21* és a *SMARCA5* gének transzkripciós faktor kötőhelyeit sikerült azonosítanunk 14 gén esetében (17. táblázat).

Gén	RT-Q-PCR normalizált fold-change értékei			GO annotációk	Klinikai vonatkozások leukémia és tumorok esetén	Hivatkozások	
	P-érték	FXIII-A negatív	FXIII-A dim				FXIII-A bright
<i>ANGPTL2</i>	0.0061	1.10E-03	6.47E-03	1.87E-02	jelátviteli receptor kötés	<i>ETV6</i> cél gén gyerekkori ALL-ben	[63]
<i>EHMT1</i>	0.0401	4.79E-02	5.55E-02	8.89E-02	kromatin modifikáció	Transzkripció koaktivátor, amely részt vesz a glükokortikoidok által kiváltott sejthalálban	[64]
<i>F13A1</i>	0.0013	5.58E-03	1.61E-02	4.02E-02	fehérje-glutamin gamma-glutamáztranszferáz aktivitás	katalizátor a fibrin monomerek közötti g-glutamil-ε-lizilamid keresztkötések képződésében	
<i>FOXO1</i>	0.0371	4.69E-02	3.56E-02	1.80E-01	transzlációs szabályozás	az AKT/FOXO1 útvonal kulcsgéne, ALL blasztok apoptotikus szabályozásában vesz részt	[65-67]
<i>HAP1</i>	0.0016	1.10E-03	5.69E-03	1.94E-02	transzlációs szabályozás	Negatív aszparagináz-rezistens biomarker ALL-ben	[68]
<i>NUCKS1</i>	0.0182	2.67E-01	2.59E-01	4.21E-01	sejt differenciáció	Alulregulált VCR-rezistent ALL blasztokban	[69]
<i>NUP43</i>	0.0424	1.03E-02	1.17E-02	1.47E-02	nucleár export	igazoltnan hatásos a dagantok ellen	
<i>PIK3CG</i>	0.0037	1.15E-01	1.24E-01	1.84E-01	apoptózis szabályozás	PIK3/AKT útvonal kulcsfontosságú szabályozó szerep BCP-ALL-ben	[70, 71]

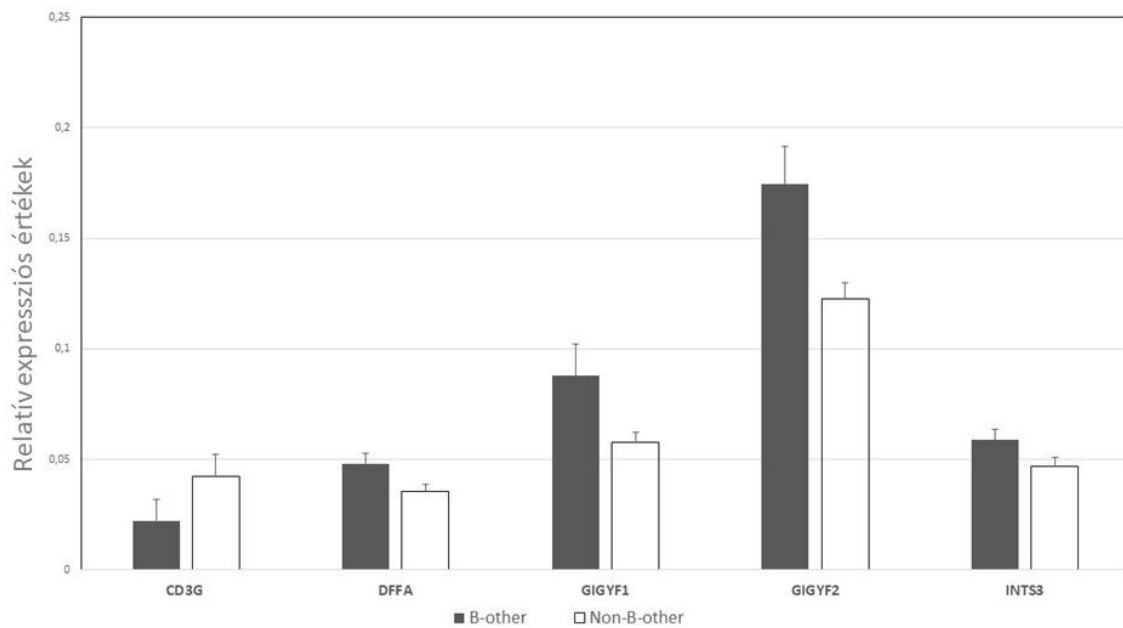
<i>PLAC8</i>	0.0362	5.51E-03	8.20E-03	3.79E-03	sejt differenciáció	a gén eddig még ismeretlen funkciója számos módon aktiválja az állati és a humán dagantok kialakulását	[72, 73]
<i>RAPGEF5</i>	0.0192	1.36E-03	3.14E-03	8.01E-03	RAS jelátviteli útvonal	Abnormális kifejeződése figyelhető meg papilláris pajzsmirigy daganatban	[74]
<i>SEMA6A</i>	0.0019	1.61E-02	2.78E-02	7.43E-02	apoptotikus folyamatok	túlexpresszáltan jelenik meg <i>ETV6/RUNX1</i> ALL-ben	[75]
<i>SPIN1</i>	0.0077	1.35E-01	1.68E-01	2.76E-01	kromatin szerveződés	Alulregulált formában indukálja a p53 aktivációját humán daganat sejtekben	[76]
TRH	0.0002	1.36E-03	5.09E-03	1.72E-02	sejt-sejt jelátvitel	Dereguláció az emlőrákban	[77]
WASF2	0.0002	1.11E-01	1.55E-01	2.95E-01	angiogenezis	Ismert <i>WASF2/FGR</i> fúzió laphámsejtes karcinómában, cisztadenokarcinómában és melanómában	[78]

17.táblázat. A validált gének klinikai relevanciája az FXIII-A fehérje kifejeződés mintázatai szerint.

### 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 (14. táblázat).

Öt gén esetében tudtunk különböző kifejeződési intenzitásokat validálni RT-Q-PCR technikával (16. ábra). A *DFFA*, *GIGYF1*, *GIGYF2* és az *INTS3* gének túlexpresszáltak a 'B-other' csoportban, míg a *CD3G* a non-'B-other' csoportban jelenik meg overexpresszált állapotban (16. ábra). A microarray analízis során, valamint a biológiai funkciók alapján kiválasztott *RORA*, *IL7R*, *CCL5*, *PLAC8* és *CX3CR* géneket nem sikerült validálnunk.



16.ábra. RT-Q-PCR módszerrel validált gének 'B-other' státusz szerinti intenzitás megoszlása

## 6 MEGBESZÉLÉS

A XIII-as véralvadási faktor A alegységének normál kifejeződési helyei a monociták, a megakariociták és a thrombociták. [9] Munkacsoportunk azonosította a FXIII-A kifejeződését BCP-ALL-es mintákon áramlási citometriai, immunoblotting és lézer scanning mikroszkópiával. [26, 79] A BCP-ALL-es limfoblasztokban megfigyelhető FXIII-A kifejeződés alapján új alcsoportot, illetőleg 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.

A FXIII-A szerepe a sebgyógyulásban és a vérképzésben alaposan ismert, azonban az intracelluláris enzim pontos funkciója még sok tekintetben tisztázatlan. A FXIII-A leukémiás limfoblasztokban való kifejeződési mintázatának prognosztikai szerepét magyarázhatják azonban a legújabb tanulmányoknak az eredményei, amelyek szerint a FXIII-A szerepet játszhat intracelluláris FXIII-A kifejeződéssel bíró sejtek és a csontvelői sztrómasejtek összekapcsolásában. [18, 80-83] A kísérleti eredmények FXIII-A-pozitív limfoblasztokra is extrapolálhatók. Normál fiziológiás körülmények között a hematopoietikus őssejtek az oszteoblasztos vagy vaszkuláris részben találhatóak. Az oszteoblasztos rész nyugodt mikrokörnyezetet biztosíthat a hematopoietikus őssejtek fenntartásához. Ezzel szemben a vaszkuláris rész elősegíti a hematopoietikus őssejtek transzendentáliális migrációját, és elősegítheti a hematopoietikus őssejtek proliferációját és további differenciálódását. [84] Feltételezhető, hogy FXIII-A kifejeződés hiányában a limfoblaszt migrációja az oszteoblaszt részből az erek szinuszos endothel sejtrétegéből álló vaszkuláris részbe akadályoztatva van. [85] Ennek köszönhetően a FXIII-A negatív limfoblasztok az oszteoblasztos részben maradhatnak, ilyen módon védve maradnak az immun- és/vagy kemoterápiás gyógyszer által kiváltott sejthaláltól, ami a vaszkuláris részben jóval kifejezettebb mértékben következik be.

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 kórlefelgyással 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. Manapság egyre több vizsgálat fókuszál a 'B-other' genetikai alcsoport minél pontosabb meghatározására. Ehhez számos olyan módszerre van szükség, melyek idő- és költségigényesek. Ezekkel ellentétben 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 tudtunk 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 tagok minőség-ellenőrzött többparaméteres FC-vel vizsgálták a FXIII-A kifejeződést, és klinikailag releváns adatokat szolgáltatottak a kezelésben résztvevő betegekről. 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. [41] 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.

Egy korábbi tanulmányban az eredmények azt sugallták, hogy még a lehető legalacsonyabb MRD határérték sem társult a legjobb teljes túléléshez minden beteg esetében. [86] Emiatt az új markerek, mint például a FXIII-A kifejeződési mintázat, fontos szerepet kaphatnak a betegek optimális csoportosítása elérésében. A kockázati csoportok javításával az új biomarkerek

hozzájárulhatnak egy kifinomultabb, kockázat-arányos vagy akár személyre szabott kezelési sémák kidolgozásához.

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 transzkripciós 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) transzkripciós faktorok kötőhelyeinek jelenlétét a gén promoter régiójában. Az SP-1, a GATA-1 és az Ets-1 transzkripciós 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. [87] Leukémiás limfoblasztokban a *F13A1* gén transzkripciós szabályozását 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 végeztük, 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  $\gamma$ -glutamil- $\epsilon$ -lizil keresztkötéseken keresztül stabilizálja a fibrinhálót, mindemellett részt vesz olyan intracelluláris folyamatokban, amelyek a monocyta/makrofág, az osteoblaszt és az osteoclast differenciációt befolyásolják. [17] 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. [72]

A FXIII-A státusz alapján 14 gént validáltunk. Megállapítottuk, hogy a *F13A1* gén minden mintában kifejeződött és a kifejeződési szintje követte a FC módszerrel szonositott 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. [88] 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. [72, 73] In silico vizsgálatok alapján nem tudunk 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 transzkripció faktorok hasonló módon szabályozhatják e 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. [89] Minden validált gén, így a *CD3G, DFFA, GIGYF1, GIGYF2, és INTS3* neoplasztikus folyamatokban vesznek részt, úgy, mint a leukémiák kialakulásában. [90-94] 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 betegek nagy valószínűséggel a 'B-other' genetikai alcsoportba sorolhatók, 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 erőteljes prognosztikai faktor lehet 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, 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 klinikai vizsgálat kockázatbecslési stratégiájába. 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. A FXIII-A negatív betegek 'B-other' genetikai alcsoportban való halmozódása megfigyelhető. 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 SUMMARY

Understanding the biological functions of intracellular FXIII-A is increasing concern to researchers. Our research group investigated the FXIII-A expression in pediatric BCP-ALL samples. The expression pattern of FXIII-A may define new subgroups in pediatric BCP-ALL.

Retrospectively, we found correlation between event-free and overall survival and the FXIII-A positive phenotype of lymphoblasts as investigated by flow cytometry (FC). FXIII-A expression was shown to be an useful LAIP marker and also a powerful prognostic factor in childhood BCP-ALL. FXIII-A expression was associated with the 'B-other' characteristics, which can help to identify those cases that may require further detailed genetic examination using expensive methods.

In the prospective study, we defined three different FXIII-A expression patterns in leukemic BCP lymphoblasts by FC, i.e., FXIII-A bright positive, dim positive and FXIII-A negative expression. We demonstrated statistically significant and clinically meaningful differences in children with BCP-ALL according to FXIII-A expression pattern by FC which can be incorporated in the risk estimation strategy of a new ALL BFM-IC clinical trial. FXIII-A negative expression pattern was a prognostic indicator of dismal survival in children with BCP-ALL. We identified significant association between the FXIII-A negative expression pattern and the 'B-other' genetic subgroup. Patients with FXIII-A negative BCP lymphoblasts should be extensively investigated with sophisticated genetic and molecular methods so as to provide these patients an optimal risk-adjusted treatment.

We used affimetrix microarray methods to determine of *F13A1* gene expression levels in leukemic BCP lymphoblasts. Using this method, we were the first to demonstrate the general expression of *F13A1* gene in pediatric BCP-ALL samples. The intensity of *F13A1* expression corresponded to the expression of FXIII-A protein, determined by FC in these samples. Gene expression signature of the FXIII-A negative subgroup showed an overlap with 'B-other'

genetic subgroup. Validated genes proved biologically and clinically relevant. We described differential expression of genes not shown previously to be associated with pediatric BCP-ALL. Protein products of the newly identified genes may offer therapeutic targets for precision treatment of BCP-ALL. Multiparameter FC appears to be an easy-to-use and affordable method to assist in selecting pediatric patients with FXIII-A negative BCP-ALL who require a more elaborate and expensive molecular genetic investigation to design individualized therapeutic protocols.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Kiss, F., et al., *Leukemic lymphoblasts, a novel expression site of coagulation factor XIII subunit A*. Thromb Haemost, 2006. 96(2): p. 176-82.
2. Hunger, S.P. and C.G. Mullighan, *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children*. N Engl J Med, 2015. 373(16): p. 1541-52.
3. 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.
4. Kato, M. and A. Manabe, *Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Pediatr Int, 2018. 60(1): p. 4-12.
5. Vrooman, L.M. and L.B. Silverman, *Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances*. Curr Hematol Malig Rep, 2016. 11(5): p. 385-94.
6. Laki, K., *The clotting of fibrinogen*. Blood, 1953. 8(9): p. 845-56.
7. Laki, K. and L. Lorand, *On the inactivation of thrombin*. Experientia, 1946. 2(10): p. 412.
8. Muszbek, L., et al., *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. Physiol Rev, 2011. 91(3): p. 931-72.
9. Muszbek, L., V.C. Yee, and Z. Hevessy, *Blood coagulation factor XIII: structure and function*. Thromb Res, 1999. 94(5): p. 271-305.
10. Bereczky, Z., E. Katona, and L. Muszbek, *Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. 33(5-6): p. 430-7.
11. Karimi, M., et al., *Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools*. Int J Lab Hematol, 2018. 40(1): p. 3-11.
12. Menegatti, M. and F. Peyvandi, *Treatment of rare factor deficiencies other than hemophilia*. Blood, 2019. 133(5): p. 415-424.
13. Adany, R. and H. Bardos, *Factor XIII subunit A as an intracellular transglutaminase*. Cell Mol Life Sci, 2003. 60(6): p. 1049-60.
14. 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.
15. Muszbek, L., et al., *Monocytes of patients congenitally deficient in plasma factor XIII lack factor XIII subunit a antigen and transglutaminase activity*. Thromb Haemost, 1988. 59(2): p. 231-5.
16. Shi, D.Y. and S.J. Wang, *Advances of Coagulation Factor XIII*. Chin Med J (Engl), 2017. 130(2): p. 219-223.

17. 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.
18. Malara, A., et al., *Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A*. Blood, 2011. 117(8): p. 2476-83.
19. Orosz, Z.Z., et al., *Cellular Factor XIII, a Transglutaminase in Human Corneal Keratocytes*. Int J Mol Sci, 2019. 20(23).
20. Torocsik, D., et al., *Factor XIII-A is involved in the regulation of gene expression in alternatively activated human macrophages*. Thromb Haemost, 2010. 104(4): p. 709-17.
21. Henriksson, P., et al., *Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages*. J Clin Invest, 1985. 76(2): p. 528-34.
22. Kiesselbach, T.H. and R.H. Wagner, *Demonstration of factor XIII in human megakaryocytes by a fluorescent antibody technique*. Ann N Y Acad Sci, 1972. 202: p. 318-28.
23. Muszbek, L., et al., *Factor XIII of blood coagulation in human monocytes*. Thromb Res, 1985. 37(3): p. 401-10.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Invernizzi, R., et al., *Immunocytochemical detection of factor XIII A--subunit in acute leukemia*. Leuk Res, 1992. 16(8): p. 829-36.
29. Chessells, J.M., et al., *Acute lymphoblastic leukaemia in children: Classification and prognosis*. Lancet, 1977. 2(8052-8053): p. 1307-9.
30. Stary, J., et al., *Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002*. J Clin Oncol, 2014. 32(3): p. 174-84.

31. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2391-405.
32. Ochoa-Montiel, R., G. Olague, and H. Sossa, *Expert knowledge for the recognition of leukemic cells*. *Appl Opt*, 2020. 59(14): p. 4448-4460.
33. Ortizmanchado, O. and B. Herrerosfernandez, [*Cytogenetic Studies in Different Constitutional Diseases and Human Hematologic Processes*]. *Rev Clin Esp*, 1963. 90: p. 295-307.
34. Davis, A.S., A.J. Viera, and M.D. Mead, *Leukemia: an overview for primary care*. *Am Fam Physician*, 2014. 89(9): p. 731-8.
35. Stockley, R.J., P.Y. Ahlquist, and M.G. Mott, *A good prognosis group in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 1983. 55(2): p. 257-61.
36. 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.
37. Mullighan, C.G., *Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. 24(4): p. 489-503.
38. Mullighan, C.G., *Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Semin Hematol*, 2013. 50(4): p. 314-24.
39. Roberts, K.G., et al., *Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Cell*, 2012. 22(2): p. 153-66.
40. Iacobucci, I. and C.G. Mullighan, *Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia*. *J Clin Oncol*, 2017. 35(9): p. 975-983.
41. 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.
42. Schwab, C. and C.J. Harrison, *Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics*. *Hemasphere*, 2018. 2(4): p. e53.
43. Moricke, A., et al., *Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000*. *Leukemia*, 2010. 24(2): p. 265-84.
44. Cave, H., et al., *Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group*. *N Engl J Med*, 1998. 339(9): p. 591-8.

45. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2000. 96(8): p. 2691-6.
46. Boldt, D.H., et al., *Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group experience*. *Leukemia*, 1994. 8(12): p. 2118-26.
47. 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.
48. Coustan-Smith, E. and D. Campana, *Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010. 23(3): p. 347-58.
49. Campana, D., *Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010. 2010: p. 7-12.
50. 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.
51. 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.
52. Henze, G., et al., *[The BFM 76/79 acute lymphoblastic leukemia therapy study (author's transl)]*. *Klin Padiatr*, 1981. 193(3): p. 145-54.
53. 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.
54. 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.
55. 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).
56. 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.

57. 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.
58. 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.
59. Yamamoto, T., et al., *Examination of stability of bone marrow blood RNA in the PAXgene tube*. *Lab Hematol*, 2006. 12(3): p. 143-7.
60. 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.
61. Fishilevich, S., et al., *GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards*. Database (Oxford), 2017. 2017.
62. 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.
63. Neveu, B., et al., *CLIC5: a novel ETV6 target gene in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2016. 101(12): p. 1534-1543.
64. Poulard, C., et al., *Relapse-associated AURKB blunts the glucocorticoid sensitivity of B cell acute lymphoblastic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. 116(8): p. 3052-3061.
65. Han, J., et al., *Ikaros 6 protects acute lymphoblastic leukemia cells against daunorubicin-induced apoptosis by activating the Akt-FoxO1 pathway*. *J Leukoc Biol*, 2017. 101(3): p. 675-681.
66. Kohrer, S., et al., *Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition*. *Leukemia*, 2016. 30(6): p. 1246-54.
67. Wang, F., et al., *Tight regulation of FOXO1 is essential for maintenance of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2018. 131(26): p. 2929-2942.
68. Lee, J.K., et al., *HAP1 loss confers l-asparaginase resistance in ALL by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway*. *Blood*, 2019. 133(20): p. 2222-2232.
69. Akbari Moqadam, F., et al., *MiR-125b, miR-100 and miR-99a co-regulate vincristine resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leuk Res*, 2013. 37(10): p. 1315-21.
70. Archer, M.C., *Role of sp transcription factors in the regulation of cancer cell metabolism*. *Genes Cancer*, 2011. 2(7): p. 712-9.

71. Sanchez, V.E., et al., *Targeting PI3K Signaling in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Int J Mol Sci, 2019. 20(2).
72. 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.
73. Grate, L.R., *Many accurate small-discriminatory feature subsets exist in microarray transcript data: biomarker discovery*. BMC Bioinformatics, 2005. 6: p. 97.
74. Liu, W., et al., *circRAPGEF5 Contributes to Papillary Thyroid Proliferation and Metastasis by Regulation miR-198/FGFR1*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. 14: p. 609-616.
75. Gandemer, V., et al., *Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia*. BMC Genomics, 2007. 8: p. 385.
76. Fang, Z., et al., *SPIN1 promotes tumorigenesis by blocking the uL18 (universal large ribosomal subunit protein 18)-MDM2-p53 pathway in human cancer*. Elife, 2018. 7.
77. Frohlich, E. and R. Wahl, *The forgotten effects of thyrotropin-releasing hormone: Metabolic functions and medical applications*. Front Neuroendocrinol, 2019. 52: p. 29-43.
78. Stransky, N., et al., *The landscape of kinase fusions in cancer*. Nat Commun, 2014. 5: p. 4846.
79. 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.
80. Bagoly, Z., E. Katona, and L. Muszbek, *Factor XIII and inflammatory cells*. Thromb Res, 2012. 129 Suppl 2: p. S77-81.
81. Jayo, A., et al., *New insights into the expression and role of platelet factor XIII-A*. J Thromb Haemost, 2009. 7(7): p. 1184-91.
82. Kulkarni, S. and S.P. Jackson, *Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth*. J Biol Chem, 2004. 279(29): p. 30697-706.
83. Serrano, K. and D.V. Devine, *Intracellular factor XIII crosslinks platelet cytoskeletal elements upon platelet activation*. Thromb Haemost, 2002. 88(2): p. 315-20.
84. Buijs, J.T. and G. van der Pluijm, *Osteotropic cancers: from primary tumor to bone*. Cancer Lett, 2009. 273(2): p. 177-93.

85. Guerrouahen, B.S., I. Al-Hijji, and A.R. Tabrizi, *Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia*. *Stem Cells Int*, 2011. 2011: p. 375857.
86. 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.
87. 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.
88. Nofrini, V., D. Di Giacomo, and C. Mecucci, *Nucleoporin genes in human diseases*. *Eur J Hum Genet*, 2016. 24(10): p. 1388-95.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. Federico, A., et al., *Pan-Cancer Mutational and Transcriptional Analysis of the Integrator Complex*. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(5).
93. 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.
94. 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.

## **10 TÁRGYSZAVAK**

XIII-as véralvadási faktor A alegysége, leukémia, akut lymphoblastos leukémia, gyermekkori B-sejt progenitor akut lymphoblasztos leukémia, áramlási citometria, túlélési mutatók, génexpresszió

## **11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönetemet szeretném kifejezni támavezetőmnak 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 vezetettek, támogattak, segítettek a céloom elérésében.

## 12 FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló, impakt faktorral rendelkező saját publikációk:

1. Kárai, B., **Gyurina, K.**, Ujfalusi, A., Sędek, Ł., Barna, G., Jáksó, P., Svec, P., Szánthó, E., Nagy, A., Müller, J., Simon, R., Wojczek, Á., Szegedi, I., Tiszlavicz, L., Kowalczyk, J., Kolenova, A., Kovács, G., Szczepański, T., Dworzak, M., Schumich, A., Attarbaschi, A., Nebral, K., Haas, O., Kappelmayer, J., Hevessy, Z., Kiss, C.: Expression Patterns of Coagulation Factor XIII Subunit A on Leukemic Lymphoblasts Correlate with Clinical Outcome and Genetic Subtypes in Childhood B-cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 12 (8), 1-17, 2020.
2. **Gyurina, K.**, Kárai, B., Ujfalusi, A., Hevessy, Z., Barna, G., Jáksó, P., Pálfi-Mészáros, G., Póliska, S., Scholtz, B., Kappelmayer, J., Zahuczky, G., Kiss, C.: Coagulation FXIII-A protein expression defines three novel sub-populations in pediatric B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia characterized by distinct gene expression signatures. *Front Oncol*. 9 1-14, 2019.
3. Kárai, B., Hevessy, Z., Szánthó, E., Csáthy, L., Ujfalusi, A., **Gyurina, K.**, Szegedi, I., Kappelmayer, J., Kiss, C.: Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A Correlates with Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 24 (2), 345-352, 2018.



Nyilvántartási szám: DEENK/475/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyurina Katalin

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kárai, B., **Gyurina, K.**, Ujfalusi, A., Sędek, Ł., Barna, G., Jáksó, P., Svec, P., Szánthó, E., Nagy, A. C., Müller, J., Simon, R., Wojczek, Á., Szegedi, I., Tiszlavicz, L. G., Kowalczyk, J. R., Kolenova, A., Kovács, G. T., Szczepański, T., Dworzak, M., Schumich, A., Attarbaschi, A., Nebral, K., Haas, O. A., Kappelmayer, J., Hevessy, Z., Kiss, C.: Expression Patterns of Coagulation Factor XIII Subunit A on Leukemic Lymphoblasts Correlate with Clinical Outcome and Genetic Subtypes in Childhood B-cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia.  
*Cancers (Basel)*. 12 (8), 1-17, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12082264>  
IF: 6.639
2. **Gyurina, K.**, Kárai, B., Ujfalusi, A., Hevessy, Z., Barna, G., Jáksó, P., Pálfi-Mészáros, G., Póliska, S., Scholtz, B., Kappelmayer, J., Zahuczky, G., Kiss, C.: Coagulation FXIII-A protein expression defines three novel sub-populations in pediatric B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia characterized by distinct gene expression signatures.  
*Front Oncol.* 9, 1-14, 2019.  
IF: 4.848
3. Kárai, B., Hevessy, Z., Szánthó, E., Csáthy, L., Ujfalusi, A., **Gyurina, K.**, Szegedi, I., Kappelmayer, J., Kiss, C.: Expression of Coagulation Factor XIII Subunit A Correlates with Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.  
*Pathol. Oncol. Res.* 24 (2), 345-352, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-017-0236-0>  
IF: 2.433





### További közlemények

4. Szegedi, I., Gáspár, I. L., **Gyurina, K.**, Zele, Z., Kiss, C.: Újdonságok a gyermekkori non-Hodgkinlimfóma kezelésében és kivizsgálásában: szakirodalmi áttekintés és a debreceni gyermekhematológiai központ adatai.  
*Magyar Onkol.* 62 (4), 204-213, 2018.
5. Sarang, Z., **Gyurina, K.**, Scholtz, B., Kiss, C., Szegedi, I.: Altered expression of autophagy-related genes might contribute to glucocorticoid resistance in precursor B-cell-type acute lymphoblastic leukemia.  
*Eur. J. Haematol.* 97 (5), 453-460, 2016.  
IF: 2.653
6. Jenei, Á., Sándor, J., **Gyurina, K.**, Nemes, J., Kiss, C., Márton, I.: Patient-reported Measurements of Oral Mucositis in Pediatric Patients with Cancer.  
*Oral Health Dent. Manag.* 15 (6), 1-10, 2016.
7. Horváth, K., Miszti-Blasius, K., **Gyurina, K.**, Szegedi, I., Kiss, C.: Herediter sphaerocytosis - A széles spektrumú betegség.  
*Gyermekgyógyászat.* 64 (5), 217-220, 2013.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,573**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
13,92**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.10.25.

