

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**SEJTVONAL SPECIFIKUS MONOKLONALITÁS VIZSGÁLATOK
MIELODISZPLÁZIÁBAN ÉS MIELOPROLIFERATÍV
BETEGSÉGEKBEN**

Jáksó Pál

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok

Doktori Iskola vezetője: Dr. Komoly Sámuel

Program: Molekuláris patomorfológia

Programvezető, témavezető: Dr. Pajor László

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pathológiai Intézet

Pécs, 2009.

BEVEZETÉS

A neoplasztikus hematológiai betegségek patomechanizmusának megértéséhez, megfelelő diagnosztikájához, valamint prognosztikus és terápiás szempontból is fontos szempont, hogy az adott lézió a hemopoézis mely pontjáról indul ki. Vagyis, hasznos annak megállapítása, hogy a betegség pluripotens, vagy elkötelezett őssejt eredetű-e. A molekuláris patogenezisre vonatkozó ismereteket a WHO klasszifikációja is alapelveként használja a neoplasztikus hematológiai betegségek besorolásában. A tumor kiindulópontjának meghatározása segíthet annak a kérdésnek a megválaszolásában, hogy a tüneti kezeléson túli, valódi gyógyulási lehetőséget nyújtó, kuratív terápiaként alkalmazható-e kemoterápia, vagy csak az allogén csontvelő transzplantáció jelentheti-e az egyedüli megoldást. Elkötelezett őssejt eredetű betegség esetén a kemoterápia is eredményezhet teljes gyógyulást, mivel ha a terápiával sikerül elpusztítani a tumoros elkötelezett őssejteket, akkor a pluripotens őssejtekből még regenerálódhat a normális hemopoézis. Ezzel szemben, ha pluripotens őssejt szintről indul ki a betegség, akkor célzott terápia hiányában a teljes gyógyulás valószínűleg csak a összes hemopoetikus sejt elpusztításától várható, amit viszont a terápia utáni idegen donoros csontvelő transzplantációnak kell követnie a hemopoézis helyreállítása érdekében.

A különböző sejtvonalak érintettségének vizsgálatával, következtethetünk arra, hogy a tumor a hemopoézis mely pontjáról indulhatott ki. Az egyes sejtvonalak érintettségét igazolhatjuk többféle módszerrel. Egyrészt vizsgálhatunk betegségekre jellemző molekuláris eltéréseket (pl. pontmutációk, deléciók), másrészt használhatunk klonalitás vizsgálatokat.

A mielodiszpláziák (MDS) betegségcsoportja olyan klonális hematológiai betegségeket foglal magába, amelyeket klinikai és morfológiai szempontból ineffektív hemopoézis jellemez. Ezek a betegségek egy krónikus jellegű monoklonális proliferációval járó preneoplasztikus fázis után gyakran akut leukémiás fázisba kerülnek. A nemzetközi irodalom az MDS-t hemopoetikus őssejt eredetű betegségnek tartja. Egyértelmű az álláspont abban a tekintetben, hogy a hemopoézis mieloid vonala érintett és monoklonális proliferációval jellemezhető. Ezzel szemben ellentmondóak az adatok abban a tekintetben, hogy a limfoid vonal mennyire érintett a neoplasztikus folyamatban.

A mieloproliferatív neopláziák (MPN) a mieloid tumorok másik nagy csoportját képezik. Ezekre a betegségekre a csontvelői sejtek abnormális, fokozott proliferációja jellemző. Morfológiailag a különböző típusokban más-más sejtvonala dominál, de bizonyított, hogy több csontvelői sejtvonala is érintett az abnormális proliferációban kisebb-nagyobb mértékben. Az MPN-eket is elsősorban őssejtbetegségnek tartják, de az egyes sejtvonalakot érintő molekuláris klonalitási vizsgálatok az MDS-hez hasonlóan ebben a betegség csoportban sem egyértelműek a limfoid vonal érintettsége szempontjából.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink elsődleges célja az volt, hogy az egyes sejtvonalak érintettségének vizsgálatán keresztül megállapítsuk, hogy MDS-ben és MPN-ben a betegség a hemopoézis melyik stádiumából indulhat ki. Feltételeztük, hogy ha csak mieloid érintettséget találunk, akkor valószínűleg mieloid irányban elkötelezett őssejtből indul ki a betegség. Ha viszont limfoid érintettség is előfordul, akkor pluripotens őssejt eredet lehet a háttérben. A sejtvonala érintettség megállapításához három módszerrel vizsgáltunk áramlási citometrián

szortírozott limfoid és mieloid sejteket. Elsőként, genetikai markertől független, klonalitás vizsgálatára alkalmas HUMARA (*human androgen receptor assay*) X kromoszóma inaktivációs esszé alkalmaztunk. A második módszer a del(20q) és del(5q) vizsgálata volt mikroszatellita-PCR (MS-PCR) technika segítségével. A sejtvonal érintettségén túl az MS-PCR vizsgálatokkal arra is választ kerestünk, hogy a hagyományos metafázis citogenetikánál jóval kisebb deléciók kimutatására alkalmas MS-PCR technikával sikerül-e magasabb arányban kimutatni ezeket a deléciókat. Végül szintén sejtvonal specifikusan vizsgáltuk a JAK2V617F pontmutáció jelenlétét MPN-es betegekben mutáció-specifikus PCR technika segítségével.

VIZSGÁLATI MINTÁK ÉS ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Vizsgálati minták

A beteg minták MDS-sel és MPN-nel diagnosztizált betegek perifériás vér és csontvelő aspirátum mintái voltak. Az eseteket a WHO klasszifikáció alapján, a klinikai és patológiai diagnózis egybevetése után soroltuk be a megfelelő betegségcsoportba. Az MS-PCR vizsgálatokhoz kontroll mintaként szájnnyálkahártya kaparékot gyűjtöttünk a betegektől. A HUMARA kiértékelési kritériumainak meghatározásához 27 egészséges nő és 4 B-sejtes krónikus limfoid leukémiás (B-CLL) nő perifériás vérmintáját is felhasználtuk. MS-PCR és JAK2V617F mutációs vizsgálatokhoz a fenti női mintákon túl férfi betegekből is gyűjtöttünk mintát. A HUMARA-hoz 103 MPN-es és 40 MDS-es nőbetegtől gyűjtöttünk mintákat és végeztük el a vizsgálatokat. MS-PCR vizsgálatokat 12 MDS és 23 MPN betegnél végeztünk, amiből 20 esetben párhuzamos HUMARA vizsgálatok is készültek. JAK2V617F mutáció vizsgálat 27 MPN esetben készült, amiből 11-et párhuzamosan végeztünk a HUMARA-val. A betegek életkora 12 és 82 év közé esett.

Áramlási citometriás sejtszortírozás

A vér és csontvelő mintákból áramlási citométerrel szortíroztunk limfoid és mieloid sejteket. Az HES esetekben eozinofil, egy MDS-RAEB esetben blasztokat is szortíroztunk. A szortírozás alapja a sejtek CD45 expressziójának intenzitása és granularitása volt. A HUMARA módszer szenzitivitásának meghatározásához, B-CLL-es betegekből CD5/CD23, vagy CD5/CD19 kettős pozitív monoklonális limfóma sejtek és poliklonális mieloid sejtek meghatározott arányú keverékeit szortíroztuk egy lépésben. Az immunjelöléseket CD5-FITC, CD23-RPE, CD19-RPE-Cy5 és CD45-RPE-Cy5 (DAKO A/S, Denmark) antitestekkel, a szortírozást BD FACSort típusú áramlási citométerrel végeztük (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Betegenként általában 10^5 sejtet szortíroztunk sejtvonalanként. A szortírozott minták tisztasága a szortírozni kívánt sejtek tekintetében áramlási citometriás visszamérés alapján 95%-nál nagyobb volt. A szortírozott sejteket 500 μ l TE8 pufferben, ill. 200 μ l PBS-ben -20°C -on lefagyasztva tároltuk a DNS izolálásáig.

DNS izolálás

A szortírozott sejtekből proteináz-K-s emésztés és fenol-kloroformos extrahálás módszerével, illetve Qiagen Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével nyertünk DNS-t. A fenol-kloroformos izolálás után a DNS-t TE8 pufferben oldottuk fel úgy, hogy a szortírozott sejtszámot figyelembe véve kb. 3000 sejtnek megfelelő DNS legyen 1 µl-ben. A Qiagen Blood Mini kittel izolált DNS-t 50 µl AE pufferben tároltuk. A DNS mintákat +4°C-on tároltuk felhasználásig, majd -20°C-on archiváltuk.

Humán androgén receptor esszé – HUMARA

A nőkben bekövetkező X kromoszóma inaktiváció sejtenként véletlenszerűen érinti a két X kromoszóma egyikét. A későbbi mitózisok alkalmával az utódsejtekben az inaktivációs mintázat stabilan továbbadódik. Monoklonális proliferáció esetén, pl. tumorokban, az összes sejt a kiindulási klón inaktivációs mintázatát fogja hordozni. Ennek vizsgálatára alkalmas az ún. short tandem repeat polimorfizmusok (STRP) metilációs mintázatának vizsgálata. A leggyakrabban használt módszer a humán androgén receptor génre épülő HUMARA, amely közel 90%-ban polimorf és metilációja megbízhatóan tükrözi az X-inaktivációt.

A vizsgált szekvencia metilációs pontokat tartalmaz, amelyeket metilációs státusztól függően metiláció-szenzitív HhaI, ill. HpaII restriktív enzimekkel hasítani lehet, vagy sem. Heterozigóta nőkben, metiláció-szenzitív hasítás nélkül két eltérő hosszúságú androgén receptor szekvenciát (kb. 220 bp) amplifikálunk PCR-rel, míg a homozigóta nők mintái nem informatívak, mert nem különíthető el két allél egymástól. Monoklonális proliferáció esetén a metiláció-szenzitív enzimekkel történő hasítás után a PCR csak az egyik allélt tudja amplifikálni, ennek következtében csak egy sávot kapunk az elektroforézis után. A PCR reakciót az Allen és munkatársai által leírt protokoll alapján dolgoztuk ki, néhány ponton módosítva azt. Első lépésben kb. 10000 sejtnek megfelelő DNS-t emésztettünk 10U HhaI enzimmel Multi-Core pufferben (Promega, Madison, WI, USA) 0,1mg/ml BSA jelenlétében 20µl térfogatban. Az emésztést 37°C-on, éjszakán át történő inkubálással végeztük. Emésztés után a DNS-t 2,5-szeres térfogatú etanollal kicsaptuk és szárítás után 10 µl desztillált vízben feloldva vittük a PCR reakcióba. A 20 µl térfogatú PCR reakcióelegy 10 µl vízben oldott DNS-en túl tartalmazott 200 µM-t minden dNTP-ből (GibcoBRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 0,5 egységnyi RedTaq DNS polimerázt (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), RedTaq puffert és 10 pmol-t mindegyik primerből (5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT C 3', 5' AGA GGC CGC GAG CGC AGC ACC TC 3'). Az amplifikációt MJR Minicycler (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA), ill. BioRad iCycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) PCR készülékekkel végeztük a következő programot használva: elődenaturáció: 94°C 5 perc; 40 ciklus denaturáció: 94°C 40 másodperc., primer kapcsolódás: 68°C 40 másodperc, extenzió: 72°C 1 perc; végső elongáció: 72°C 5 perc.

Amplifikáció után a teljes 20 µl PCR elegyet felvittük 8%-os, nem denaturáló poliakrilamid géltre és 120 V, 25 mA mellett éjszakán át futtatuk, addig amíg a jelzőfestékként használt xilén-cianol a 24 cm hosszú gél aljára nem ért. A gélt SYBR Gold DNS festékkel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) festettük a gyártó által előírt koncentrációban, végül UV transzilluminátort használva polaroid, vagy digitális kamerával lefényképeztük. Polaroid képek esetén a fotót szkennel segítségével digitalizáltuk.

Azokban az informatív esetekben, amelyekben a PCR 100%-ban csak az egyik allélt tudta amplifikálni és így a fotón csak az egyik allélnak megfelelő sáv volt jelen, monoklonálisnak fogadtuk el. A minták jelentős részében azonban nem egyértelmű az egyik allél arányának nagy mértékű csökkenése, ezért ezeket a mintákat csak denzitometriás analízis alapján tudtuk besorolni poliklonális, ill. monoklonális kategóriákba. A gélfotókat az ImageJ 1.4 program segítségével denzitometráltuk. A nemzetközi irodalomban gyakran alkalmazott kritérium szerint, ha a két allél aránya legalább 3:1, vagy ennél jobban eltérő, akkor a minta monoklonálisnak tekinthető. Viszont több tanulmányban is kimutatták, hogy egészséges nőkben is eltérhetnek az allélarányok az 1:1-től és a 3:1 arány sem mindig jelent megbízható kritériumot a monoklonalitás megállapítására. Annak érdekében, hogy megfelelően specifikus legyen a módszerünk, saját kritériumokat dolgoztunk ki a HUMARA eredmények kiértékelésére, amihez egészséges nők véréből szortírozott limfoid és mieloid sejteken is elvégeztük a HUMARA-t. A módszer szenzitivitásának megállapításához a HUMARA-t teszteltük B-CLL-es betegekből szortírozott monoklonális limfóma sejtek és poliklonális mieloid sejtek ismert arányú keverékein is.

Mikroszatellita-PCR vizsgálatok

Tumorok vizsgálata során, a genomban ismert helyzetű mikroszatellita régiók felhasználhatók az adott lókuszt deléciójának, ill. amplifikációjának vizsgálatára, ugyanis a mikroszatellita régiók PCR amplifikációját követően a termékek mennyiségének kvantitálásával következtetni lehet a két allél előfordulására. A tanulmányban az MPN-ben leírt, leggyakoribb genetikai aberrációnak tartott 20q deléciót, illetve MDS-ben szintén a leggyakoribb defektusok közé tartozó 5q deléciót vizsgáltuk limfoid és mieloid sejteken MS-PCR technikával. Mindkét deléciónál az irodalmi adatoknak megfelelően választottuk ki az alkalmazott mikroszatellita markereket, úgy hogy azok a leggyakrabban deletált szakaszokon (common deleted region - CDR) helyezkedjenek el. Vizsgálatainkban a 20q11.2-q13.2 régióban a D20S607, D20S170, D20S110, D20S96 és D20S119 lókuszon, valamint az 5q31 régióban a D5S476 és D5S414 lókuszon végeztünk MS-PCR vizsgálatokat.

A PCR amplifikációk MJR PTC-100 és PTC-200 típusú (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) PCR készülékeken történtek a következő programot használva: elődenaturáció: 94°C 2 perc; 35 ciklus denaturáció: 94°C 40 másodperc, primer kapcsolódás: 55°C 30 másodperc, extenzió: 72°C 40 másodperc; végső elongáció: 72°C 5 perc. A PCR reakcióelegy tartalmazott kb. 10000 sejtnek megfelelő DNS-t, 0,5 egységnyi Taq polymeraset (GibcoBRL, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 50mM KCl-ot, 10 mM TRIS-t (pH:8,3), 1,5mM MgCl₂-ot, 200 µM-t mindegyik dNTP-ből, és 5-5 pmol primert. Az egyik primer mindig jelölve volt Cy5 fluoreszcens festékkel (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany). A következő primereket használtuk: D20S607: AAA ATG TCC AGG CAA CAG AG és ATT GAC AAA TTT CTG GGC TG; D20S170: TTC TCA GGC TCC TGG C és GGG GGC TTC CAT GAG T; D20S96: CAC TGC AAC TCT AAC CTG GG és CCT GTA TGC TGC ATT TCC TG; D20S119: CTG ACA CAG TTT CAG TAT CTC TAT C és TTT CCA GAT TTA GGG GTG TAT G; D20S110: TTG ACA GCC AAA TGA ATT TA és CTA GAC TTA GGT TGA CAT TCT CG; D5S414: GGC CAG TTC AGT CAA GTG és TGG TTC CAG CAT ATA GCG; D5S479: GCA ATA GCA AGA CTC TGA CC és TTC CTG TGT GCC TTA CAG TT. A primer szekvenciákat a Whitehead Institute Center for Genome Research és

a The Genome Database internetes adatbázisából választottuk. A fenti mikroszatelliták adatai jelenleg ellenőrizhetők a http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index címen. A PCR reakciók termékeinek detektálását és kvantitálását ALFexpress DNA Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) típusú automata DNS szekvenáló készülékkel végeztük 5%-os denaturáló poliakrilamid gélen futtatva a termékeket, 1500 V, 38 mA, 15W, 55°C paraméterek mellett. A kiértékelést a készülék szoftvere által készített denzitometriás görbék alapján végeztük. Az egyes alléleknek megfelelő csúcsok jelenléte, illetve területe alapján értékeltük a mintákat, majd megtartott (retained-R), deletált (D), és allélikus kiegyensúlyozatlanságot (allelic imbalance-AI) kategóriákba soroltuk. A kategóriákba soroláshoz egy 0-tól 4-ig terjedő skálát használtunk. Nulla értéket, vagyis R besorolást kaptak a kontroll szájnyalkahártyával megegyező minták. Négyes, vagyis D besorolást azok a minták, amelyekben az egyik allél teljesen elveszett. Az AI kategóriában kettes értéket kapott egy minta, ha a kontrollban látható csúcsokhoz képest a mintában a deletálódó allélnek megfelelő csúcs relatív aránya kb. 50%-ra csökkent a kontrolléhoz képest. Hármassal AI értéket adtunk egy mintának, ha 50%-nál jelentősen nagyobb volt a relatív allélarány eltolódás, de nem volt teljes deléción. Egyes AI értéket kapott a minta, ha 50%-nál jelentősen kevesebb volt az allélarány eltolódás. A PCR reakció és a fluoreszcens detektálás pontatlansága miatt az AI1-es besorolást, csak akkor tekintettük egy mintában elfogadhatónak, ha legalább 2 lókuszon is előfordult párhuzamosan. A fenti MS-PCR értékelési rendszert Langbein és munkatársai cikke nyomán alkalmaztuk.

JAK2V617F mutációs vizsgálatok

2005-ben több egymástól független publikációban írták le először a JAK2 gén V617F mutációját krónikus mieloproliferatív betegségekben. A JAK2 fehérje kulcsszerepet tölt be a sejtnövekedést és differenciációt szabályozó JAK-STAT jelátviteli folyamatokban. A mutált JAK2 fehérje konstitutív tirozin-kináz aktivitást, ill. hiperszenzitivitást mutat az őt aktiváló szignálokkal szemben. A JAK2V617F mutáció a szakirodalom szerint MPN-eken belül PV-ben 90-95%, PMF-ben 55-60% és ET-ben 50% gyakorisággal, illetve a mielodiszpláziák egy ritka szubtypusában RARS-T-ben, 50% körüli gyakorisággal fordul elő.

Áramlási citometriásan szortírozott MPN-es betegek mintáiban megvizsgáltuk a JAK2V617F mutáció jelenlétét sejtvonal specifikusan limfoid és mieloid sejtekben. A vizsgálatokat a JAK2V617F mutációra specifikus primert alkalmazó PCR segítségével végeztük. Baxter és munkatársai leírása alapján a következő PCR primereket használtuk: mutáns allélre specifikus forward primer (5'AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT3'), belső kontrollként alkalmazott forward primer (5'ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG3'), és egy közös reverz primer (5'CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA3'). A két forward és egy reverz primer két PCR termék egyidejű amplifikációját teszi lehetővé. A belső kontrollként szereplő primer és a reverz primer egy 364 bázispár hosszúságú terméket ad, amely kontrollként alkalmas a DNS templát minőségének megítélésére. Ha a vizsgált DNS mintában nincs jelen a mutáció, akkor csak a belső kontroll terméket kapjuk meg. Amennyiben a DNS templát tartalmazza a JAK2V617F mutációt, akkor a mutációra specifikus primer is PCR terméket eredményez és egy második, 203 bázispárnyi amplikont is kapunk a 364 bázispárnyi kontroll mellett. A PCR reakció komponensei 25 µl végtérfogatban a következők voltak: kb. 10000 sejtnek megfelelő DNS TE8, vagy AE

pufferben, 1 egységnyi Sigma Genomic RedTaq DNS polimeráz (Sigma, St. Louis, MO, USA), 3 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 12.5 pmol reverz primer, 6.25 pmol belső kontroll forward primer, 6.25 pmol mutáció-specifikus forward primer, valamint Sigma Redtaq puffer. A PCR reakció a következő program szerint futott: 95°C elődenaturálás 5 perc; 40 ciklus 95°C denaturálás 30 másodperc, 53°C primer kapcsolódás 30 másodperc, 72°C extenzió 1 perc; 72°C végső elongáció 5 perc. Néhány esetben, ahol kevés DNS maradt a HUMARA vizsgálatok elvégzése után és biztosak akartunk lenni a JAK2V617F mutáció vizsgálat sikerességében, teljes genom amplifikációt végeztünk a maradék DNS-ből Qiagen REPLI-g Kit-tel (Qiagen, Hilden, Germany) a gyártó által ajánlott protokoll szerint, majd 1 μl amplifikált DNS-t használtuk a JAK2V617F PCR-hez. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen szeparáltuk, SYBR Gold DNS festés után, UV megvilágítás mellett és digitális fénykép formájában dokumentáltuk. A kiértékelés során a fényképen szemmel látható termék megléte, ill. hiánya alapján soroltuk a mintákat JAK2V617F mutációra pozitív és negatív kategóriába.

EREDMÉNYEK

A HUMARA kiértékelési kritériumainak, specifitásának és szenzitivitásának meghatározása

A két androgén receptor allél inaktivációjának aránya a denzitometriás görbén látható csúcsok alatti területek arányával jellemezhető. Az arány kiszámításához az egyes csúcsok területét elosztottuk a két csúcs összterületével. Az X kromoszóma inaktiváció (XI) számszerű jellemzéséhez a kisebb molsúlyú allél százalékos arányát használtuk fel, amely értéket X inaktivációs számnak nevezünk el - XISZ. A XISZ értéke 0% és 100% között mozoghat. Teljesen véletlenszerű XI-t feltételezve a XISZ értékének 50%-nak kell lennie. Azonban nem véletlenszerű XI esetén a XISZ eltér az 50%-tól. Homogén monoklonális mintában a XISZ értéke 0%, vagy 100%.

Huszonhét egészséges nő mintáit megvizsgálva 21-et találtunk heterozigótának és így a vizsgálatra alkalmasnak. Gyenge eltolódás mutatkozott a kisebb molsúlyú allél javára a XISZ értékekben, ami nem véletlenszerű XI-re utalhat. A XISZ átlaga 65,2% és 64,1% volt a limfoid és mieloid sejtvonalakban, jelentős mértékű sztenderd deviáció (S.D.) mellett (20,0%, ill. 22.4%). Az 50%-nál magasabb XISZ-nek a nem véletlenszerű XI-n kívül lehet technikai jellegű magyarázata is, ugyanis a magas PCR ciklusszám (40) miatt a kisebb allél előnyre tehet szert az amplifikáció során. Ezt okozhatja, hogy az amplifikált szakasz magas GC tartalma miatt viszonylag stabil másodlagos struktúrák alakulhatnak ki, ami jobban érinti a nagyobb CAG ismétlődés számot tartalmazó allélt, így annak amplifikációjára negatív hatással lehet.

Annak érdekében, hogy megfelelően értékeljük a betegmintákat, amelyekben monoklonális sejtek okozhatják a nem véletlenszerű XI-t, olyan XISZ határértékeket kellett meghatározunk, amelyek még elfogadható álpozitivitást adnak a kontrollként vizsgált egészséges nők poliklonális mintáiban, vagyis elegendően specifikusak.

Megvizsgáltuk a XISZ átlag ± 1 S.D. és a XISZ átlag ± 2 S.D. határértékeket. A XISZ átlag ± 1 S.D. kritérium specifitását alacsonynak találtuk (80%, 76%). A XISZ átlag ± 2 S.D. kritérium túl szigorúnak bizonyult, mert az elvi 100%-os maximum XISZ értéket is meghaladó határértékeket adott. Az irodalmi adatok szerint gyakran alkalmazott 3:1-es

allélarány kritérium adta a legalacsonyabb specificitást, amely limfoid sejtekben 70%, mieloidokban 52% volt. Annak érdekében, hogy megfelelően specifikus kritériumokat kapjunk meghatároztuk egy olyan poliklonális XISZ tartományt alsó és felső határértékkel a limfoid és a mieloid sejtek esetében is, amely magában foglalta kontroll minták 90%-át, ami legalább 90%-os specificitást jelent. A tartomány határértékeit úgy határoztuk meg, hogy egyenlő arányban hagytuk el mind az alsó, mind a felső extrém XISZ értékeket a kontroll nőkben mért XISZ értékek közül. A limfoid sejtekben a poliklonális tartomány 34-90%-nak, a mieloid sejtekben 37-86%-nak adódott.

Különböző határértékeket használó klonalitás kritériumok specificitása.

Limfoid sejtek		Mieloid sejtek	
XISZ tartomány	specificitás	XISZ tartomány	specificitás
átlag $\pm 1S.D$ 45,2-85,2%	80%	átlag $\pm 1S.D$ 41,7-86,5%	76%
átlag $\pm 2S.D$ 25,2-105,2%	100%	átlag $\pm 2S.D$ 19,3-108,9%	95%
3:1 arány	70%	3:1 arány	52%
34-90%	90%	37-86%	90%

Mivel mérsékelten erős korrelációt (korrelációs koefficiens=0.646) találtunk a limfoid és a mieloid XISZ értékek között, megvizsgáltuk, hogy vajon lehet-e őket használni kölcsönösen, egymás kontrolljaként abban az esetben, ha csak az egyik sejtvonalban alakul ki monoklonális proliferáció. Amennyiben csak az egyik sejtvonal monoklonális, akkor annak XISZ értéke feltehetően jelentősen el fog térni a másik, poliklonális sejtvonal XISZ értékétől. Megkerestük azt a XISZ különbség értéket az egészséges, kontroll nők limfoid és a mieloid sejtei között, amelynél nagyobb érték nem fordult elő az esetek 90%-ában. Ez a különbség érték 26%-nak adódott. Ennél nagyobb különbség a limfoid és mieloid sejtek XISZ értékei között a kontroll nők kevesebb, mint 10%-ában fordult elő, ezért ezt a típusú kritériumot is legalább 90%-os specificitásúnak fogadtuk el. Meg kell azonban jegyezni, hogy csak ezt a kritériumot használva egyértelműen nem lehet megállapítani, hogy a két sejtvonal közül melyik a monoklonális.

A HUMARA szenzitivitásának meghatározásához monoklonális limfóma sejtek és poliklonális mieloid sejtek ismert arányú keverékeit vizsgáltuk meg 4 B-CLL-es beteg mintáiban. Ha a vizsgált mintában legalább 75% volt a monoklonális sejtek aránya, akkor a monoklonalitás egyértelműen meghatározható volt, mivel a XISZ értéke 0%, vagy 100% volt. Kevesebb mint 75% monoklonális sejt esetén alkalmazhatóak az általunk felállított kiértékelési kritériumok. Az 50-60% monoklonális sejtet tartalmazó minták mindegyikében legalább 1 kritérium alapján monoklonalitás volt igazolható. Ezzel szemben a csak 20-25% monoklonális sejtet tartalmazó mintákban a 4 esetből csupán az egyikben és ott is csak az egyik kritérium alapján merült fel a monoklonalitás lehetősége.

Végül megvizsgáltuk a korrelációt, az ismert arányú monoklonális sejtet tartalmazó keverékekben a valódi monoklonális sejtarányok és a mért XISZ értékekből számított monoklonális sejtarányok között. Az alábbi algoritmus alapján az tisztán monoklonális (XISZ_M) és tisztán poliklonális minták XISZ értéke (XISZ_P), valamint a keverék mintában

mért XISZ értéke ($XISZ_{mért}$), alapján számítható ki a mintában lévő monoklonális sejtek aránya (M%).

$$\frac{M\%}{100} \times XISZ_M + \frac{100 - M\%}{100} \times XISZ_P = XISZ_{mért}$$

A 20-60% monoklonális sejteket tartalmazó mintákban, a számított és a valódi monoklonális sejtarányok között erős korrelációt találtunk ($r=0.86$), ami alátámasztja a módszer kvantitatív jellegét és alkalmasságát keverék minták vizsgálatára

HUMARA – klonalitás eredmények

A vizsgálatok sikerességét tekintve a következő eredményeket kaptuk. A 143-ból 98 (69%) eset volt heterozigóta és informatív. Negyvenöt eset (31%) a két androgén receptor allél homozigotizása, vagy a gél feloldóképességénél kisebb méretkülönbsége miatt, ill. gyenge PCR reakció miatt nem volt informatív.

HUMARA klonalitás eredmények.

	Eset szám	Klonalitás a sejtvonalakban				
		L+ M+	L- M+	L+ M-	L- M-	Lnk M+
MDS-RA	6	2	4			
MDS-RAEB	3	2			B+:1	
MDS-u	17	4	6	3	2	2
MDS-AML	3	1	1		1	
MDS összes	29	9	11	3	4	2
MPN-ET	34	10	13		6	5
MPN-PV	10	5	4			1
MPN-PMF	2	1		1		
MPN-u	15	5	6	1	1	2
MPN-HES	8	Eo+: 2	Eo-: 1	Eo+:1	Eo-: 2	Eo-: 2
MPN összes	69	24	26	2	9	8

L+: limfoid monoklonális, L-: limfoid poliklonális, Lnk: limfoidokból nem készült vizsgálat, M+: mieloid monoklonális, M-: mieloid poliklonális, B+: blaszt monoklonális, Eo+: eozinofil monoklonális, Eo-: eozinofil poliklonális

Összességében MDS-ben és MPN-ben hasonló arányokat kaptunk monoklonalitás tekintetében. A kettős limfoid-mieloid monoklonális esetek aránya 31% volt MDS-ben és 35% MPN-ben. A csak mieloid monoklonalitást mutató esetek aránya mindkét betegség csoportban 38% volt. Kizárólagos limfoid monoklonalitás 10%-ban fordult elő MDS-ben és 3%-ban MPN-ben. Az MDS-ek 18%-a, az MPN-ek 13%-a volt poliklonális. Mieloid monoklonalitás 76%-ban fordult elő MDS-ben és 85%-ban MPN-ben. A limfoid monoklonalitás aránya 41% volt MDS-ben és 38% MPN-ben. Bármilyen sejtvonalban jelentkező monoklonalitás az MDS-ek 82%-ára, az MPN-ek 87%-ára volt jellemző.

Az MDS átlag értékektől valamelyest eltértek az MDS-RA esetek arányai, ahol 8%-kal kisebb arányú limfoid (33%) és jelentősen, 24%-kal magasabb arányú mieloid (100%)

monoklonalitást találtunk. Azonban az MDS-RA eredmények mindössze 6 esetből származnak, így ezek az eltérések nem tekinthetők statisztikailag megbízhatónak. Az átlagos MPN értékektől szintén eltértek az ET-s és PV-s esetek. ET-ben 9%-kal volt alacsonyabb (29%), PV-ben 12%-kal volt magasabb (50%) a limfoid monoklonális arány az MPN átlaghoz képest. A mieloid sejtek monoklonalitása tekintetében csak a PV mutatott jelentősebb eltérést az átlagtól, ugyanis 100%-ban monoklonálisak voltak mieloid sejtek. PMF-ben csak 2 esetet vizsgáltunk, így ezek jelentős eltérését az átlagtól nem tartjuk megbízhatónak.

Mikroszatellita-PCR eredmények

Harmincöt esetben készültek MS-PCR vizsgálatok. Tizenkettő MDS-ből 1 MDS-RA esetében (8%) mutattunk ki teljes 5q deléciót az D5S476 lókuszon, amely csak a mieloid sejteket érintette. Egy MDS-u-ban (8%) 20q deléciót találtunk a D20S96 és AI1-et a D20S110 lókuszon a mieloid sejtekben. Huszonhárom MPN-es esetet vizsgáltunk MS-PCR-rel az 5q és 20q deléció szempontjából. Hat MPN-ben (26%) mutattunk ki 20q deléciót, vagy allélikus kiegyensúlyozatlanságot. Ezek közül 3 esetben (13%) a limfoid és mieloid sejt vonal egyaránt érintett volt, míg a másik 3 MPN-ben (13%) csak a limfoid sejtek voltak érintettek. Huszonkét MPN-ből 3 esetben (13%) találtunk 5q érintettséget. Mindhárom esetben érintett volt a mieloid vonal, míg a limfoidok csak egy esetben. Egy esetben (4%) fordult elő egyszerre 20q és 5q érintettség egy HES-es betegben, azonban a 20q deléció csak limfoidokban, az 5q AI csak mieloidokban volt kimutatható.

Párhuzamos HUMARA és mikroszatellita-PCR eredmények

Húsz esetben készült párhuzamos HUMARA és MS-PCR vizsgálat. Tizenkét MPN-ből 4 esetben (33%), 1 ET-ben, 2 MPN-u-ban és 1 HES-ben fordult elő MS-PCR-rel kimutatható deléció, vagy allélikus kiegyensúlyozatlanság és HUMARA-val kimutatható monoklonalitás párhuzamosan. MS-PCR-rel kimutatható érintettség csak olyan esetekben fordult elő, amelyek HUMARA-val monoklonálisak voltak, fordítva soha. A 8 MDS-ből csak 1 MDS-RA esetben tudtunk kimutatni párhuzamosan 5q érintettséget MS-PCR-rel és monoklonalitást HUMARA-val a mieloid sejt vonalban. A többi esetben nem találtunk MS-PCR-rel eltérést a normál kariotípustól.

Párhuzamos JAK2V617F mutáció és HUMARA eredmények

Összesen 28 MPN esetben végeztünk sejt vonal specifikusan JAK2V617F allélspecifikus PCR-t és ezek közül 11-ben párhuzamosan HUMARA is készült. Olyan eseteket vizsgáltunk, amelyekről a rutin patológiai diagnosztikai eljárás során, teljes vérből végzett vizsgálattal kiderült, hogy hordozzák a JAK2V617F mutációt. A JAK2V617F mutáció az összes esetben kimutatható volt a mieloid sejtekben. Hat PMF-ből 5 (83%), 9 PV-ből 8 (89%), 12 ET-ből 8 (67%) és 1 MPN-u esetben a limfoid sejtek is hordozták a mutációt. Összehasonlítottuk, hogy sejt vonal specifikusan végezve a két vizsgálatot, mennyire fedik át egymást a JAK2V617F mutációs és klonalitás eredmények. A 11 esetből 7-ben (64%) egyezést mutatott a két vizsgálat sejt vonal szinten. Négy esetben (36%) fordult elő, hogy a JAK2V617F mutációt mutató sejt vonalban a HUMARA vizsgálat nem tudott monoklonalitást igazolni.

MEGBESZÉLÉS

HUMARA módszer beállítása

Új klonalitätsi kritériumokat állítottunk fel a HUMARA X-inaktivációs vizsgálathoz. Meghatároztunk egy olyan poliklonális XISZ tartományt a limfoid és a mieloid sejtek esetében is, amelytől legalább 90%-os specificitást vártunk el. Ez alapján monoklonálisnak tekintettük azokat a mintákat, amelyek XISZ értéke limfoid sejtek esetében 34-90%, míg a mieloidoknál 37-86% XISZ tartományon kívül esett. Felállítottunk még egy monoklonalitást igazoló kritériumot. Ehhez abból indultunk ki, hogy ha csak az egyik sejtvonal monoklonális a kettő közül, akkor a két sejtvonal XISZ értéke jelentősen el fog térni egymástól. Eszerint, ha a XISZ különbség nagyobb 26%-nál, akkor a vizsgált limfoid és mieloid vonal közül valamelyik 90%-os valószínűséggel monoklonálisnak tekinthető. Fontos megjegyezni, hogy ez alapján nem lehet megmondani, hogy melyik sejtvonal a monoklonális, így ez a kritérium inkább kiegészítő jellegű lehet.

Teszteltük HUMARA módszer érzékenységét is. Ehhez 4 B-CLL-es beteg leukémiás sejteinek és poliklonális mieloid sejteinek áramlási citométerrel szortírozott, meghatározott arányú keverékeit vizsgáltuk. A HUMARA a legalább 50-60% monoklonális sejtet tartalmazó minták mindegyikében legalább az egyik kritérium alapján képes volt kimutatni a monoklonalitást.

Kimutattuk, hogy a módszer monoklonális sejteket tartalmazó keverékekben kvantitatív jellegű. Ezt a keverékek ismert monoklonális sejtaránya és a keverékekben mért XISZ értékekből számított monoklonális sejtarányok erős korrelációja igazolta ($r=0,86$).

Sejtvonal specifikus vizsgálatok HUMARA-val

A HUMARA vizsgálataink eredményei MDS esetében az irodalomnak megfelelő adatokat mutatták, ill. a két szélsőséges álláspont közé sorolhatók. Az egyik véglet szerint a limfoid vonal nem érintett, vagy csak nagyon ritka esetekben, ami a mieloid irányban elkötelezett őssejt eredetet támogatja. A másik álláspont szerint az MDS esetek jóval nagyobb részében fordul elő a limfoidok érintettsége, ami pluripotens kiindulási klónt feltételez. Eseteink 38 %-ában csak a mieloid sejtek bizonyultak monoklonálisnak, ami mieloid irányban elkötelezett folyamatot valószínűsít. Viszont az esetek további 31%-ában fordult elő monoklonális HUMARA eredmény mindkét sejtvonalban, ami a betegség egyértelműen pluripotens őssejt eredetére utal. Szintén pluripotens őssejt eredetre utal az is, hogy az MDS-ek 10%-ában csak limfoid monoklonalitás igazolódott, poliklonális mieloidok mellett. Ez utóbbi eredmény magyarázható azzal, hogy a mieloid vonalban a monoklonális sejtek aránya nem érte el a módszer szenzitivitását (50-60%).

MPN-ben az irodalmi adatok szerint nagyobb arányban fordul elő limfoid érintettség, mint MDS-ben. Saját vizsgálatainkban 69 informatív MPN esetet vizsgáltunk HUMARA módszerrel. Eredményeink szerint az MDS-hez hasonló gyakorisággal fordult elő MPN-ben pluripotens őssejt eredetre utaló együttes limfoid-mieloid monoklonalitás. Az összes MPN eset 35%-ban találtunk kettős és 38%-ban kizárólagos mieloid monoklonalitást. Egyedül a PV altípus mutatott az átlagnál magasabb arányú (50%) kettős limfoid-mieloid monoklonalitást.

Összegezve saját HUMARA klonalitási vizsgálataink eredményeit, feltételezhető, hogy MDS-ben és MPN-ben, több mint az esetek egyharmadában pluripotens hemopoetikus őssejtből indul ki a tumor. Az eredmények és a módszer megbízhatóságát alátámasztja, hogy a klonalitás eredményeink jól megfeleltethetők a két nagy betegségcsoportban felállított patológiai diagnózisnak, MDS-ben 82%-ban, MPN-ben 87%-ban tudtunk igazolni monoklonalitást valamelyik sejtvonalban. Következésképpen az olyan MDS és MPN esetekben, amelyekben egyéb patognomikus marker nem mutatható ki, a HUMARA diagnosztikus szerepű lehet női betegekben.

Sejtvonal specifikus vizsgálatok MS-PCR-rel

A sejtvonal érintettséget vizsgáltuk szortírozott limfoid és mieloid sejteken 20q és 5q deléció tekintetében mikroszatellita-PCR technikával 35 beteg esetében.

A vizsgált minták közül del(5q)-t, vagy del(20q)-t egy beteg kivételével, csak a mieloid sejtekben mutattuk ki MDS-ben, ami egyrészt utalhat arra, hogy a betegség mieloid irányban elkötelezett őssejtből indulhatott ki, másrészt nem zárható ki a pluripotens őssejt eredet sem, mert a deléciók létrejöhetnek a tumorfejlődésnek egy későbbi pontján is egy mieloid irányban elkötelezett őssejtben és csak a malignizációban, ill. a betegség manifesztációjában fontosak.

Az MPN-ben kapott MS-PCR eredményeink a del(5q) sejtvonal érintettségének tekintetében hasonlóak az MDS-hez, vagyis a del(5q) csak mieloid sejtekben fordult elő, ami ezekben a betegekben szintén mieloid irányban elkötelezett őssejt kiindulású betegségekre utalhat. Viszont a del(20q) sejtvonalbeli előfordulása más képet mutatott. A del(20q)-t hordozó esetek fele kettős limfoid-mieloid, másik fele csak limfoid érintettséget mutatott. A kettős érintettség egyértelműen a pluripotens őssejt eredet lehetőségét támogatja. A kizárólagos limfoid érintettség magyarázható az MS-PCR módszer alacsony érzékenységevel amely hasonló, mint a HUMARA-é, hiszen ugyanúgy két allél mennyiségi viszonyaiban beálló változást kell kimutatni. Így lehetséges, hogy a mieloid vonalban előforduló, deléciót hordozó sejtek gyakorisága ezen esetekben a módszer érzékenysége alá esett.

A HUMARA és MS-PCR vizsgálatok informatív esetei közül 20-ból készültek párhuzamos vizsgálatok. Nyolc MDS-ből 1-ben találtunk párhuzamos del(5q)-t és HUMARA monoklonalitást, további 6 esetben csak a HUMARA mutatott monoklonalitást. Tizenkét MPN-ben az összes esetben igazolható volt HUMARA-val monoklonalitás és 4 eset mutatott párhuzamosan deléciót MS-PCR-rel ugyanazon sejtvonalakban. Az a jelenség, hogy feltehetően hasonló kimutatási érzékenység mellett jóval kevesebb esetben jelent meg deléció, mint monoklonális proliferáció tovább erősíti azt a feltételezést, hogy a vizsgált del(5q) és del(20q) a tumorfejlődés egy későbbi lépéseként alakulhatnak ki egy monoklonális proliferáció talaján.

Az MS-PCR vizsgálatokkal arra is kerestük a választ, hogy a hagyományos citogenetikai módszereknél jóval kisebb deléciók kimutatására is alkalmas molekuláris technika segítségével esetleg nagyobb arányban kimutatható-e a 20q és 5q deléció MDS-ben és MPN-ben. Eredményeink szerint MDS-ben nem volt gyakoribb egyik deléció sem. MPN-ben viszont sikerült 14%-ban kimutatnunk a del(5q)-t, ami nem jellemző erre a betegség csoportra. A del(20q) kb. kétszer akkora gyakoriságot mutatott (26%), mint a hagyományos metafázis citogenetikával kimutatható előfordulás.

Sejtvonal specifikus JAK2V617F mutáció vizsgálatok

A 28 MPN-es betegből végeztük el a vizsgálatot, akiknél a rutin diagnosztikai eljárás során a teljes vérből készült vizsgálat mutációt igazolt. Tizenegy esetben a JAK2V617F mutáció sejtvonal szintű előfordulását összevetettük HUMARA-val kimutatható monoklonalitással is. A JAK2V617F mutáció minden esetben kimutatható volt a mieloid sejtekben. A limfoid sejtek érintettsége 80% feletti volt PMF-ben és PV-ben, míg ET-ben is előfordult az limfoidok kétharmadában. Mindez arra utal, hogy a JAK2V617F mutáció az esetek jelentős többségében pluripotens őssejtben következik be.

A párhuzamos HUMARA vizsgálatok sejtvonal szintű monoklonalitás eredményei MPN-ben 11-ből 7 esetben (64%) megegyeztek a JAK2 mutációs érintettséggel. A maradék 4 esetben a HUMARA nem tudott monoklonalitást igazolni, valamelyik sejtvonalban, ahol a JAK2 mutációs vizsgálat pozitív volt. Ez magyarázható azzal, hogy a JAK2V617F PCR érzékenysége magasabb, mint a HUMARA-é, amelynél a pozitív eredményhez 50-60% monoklonális sejt szükséges a mintában.

Összefoglalás

A HUMARA X-inaktivációs vizsgálatokhoz új, 90%-os specificitású kritériumokat dolgoztunk ki, valamint meghatároztuk a módszer érzékenységét. A HUMARA vizsgálatok a patológiai diagnózissal összhangban, a vizsgált esetek több, mint négyötödében monoklonalitást igazoltak, így a HUMARA az általunk használt új kritériumokkal a diagnosztikában is alkalmazható monoklonalitás tesztnek bizonyulhat. A sejtvonal specifikus HUMARA X-inaktivációs vizsgálatok eredményei alapján arra lehet következtetni, hogy az MDS és az MPN esetek több, mint egyharmadában pluripotens őssejt eredetű a betegség.

Szintén sejtvonal specifikus MS-PCR segítségével kimutattuk, hogy a del(5q) mindkét betegségcsoportban elsősorban mieloid sejtekben jelentkezik, míg a del(20q) megtalálható a perifériás limfoid sejtekben is. A del(20q) limfoid megjelenése a del(5q)-nál korábbi, pluripotens őssejt szintjén bekövetkező delécióra utal. Mivel a HUMARA-val kimutatható monoklonalitás gyakorisága nagyobb, mint az MS-PCR-rel kimutatható deléciók gyakorisága, ezért feltételezzük, hogy a del(5q) és del(20q) a tumorfejlődés egy későbbi lépéseként jelenik meg, egy már fennálló monoklonális proliferáció talaján. A deléciók előfordulási gyakorisága szempontjából az MS-PCR módszer nem mutatott különbséget hagyományos citogenetikához képest MDS-ben. Azonban MPN-ben, ahol a del(5q) ritkán fordul elő, 14%-ban találtuk meg az eltérést. MPN-ben a del(20q) esetében az irodalomban leírt és hagyományos citogenetikával kimutatott előfordulási arányoknál magasabb, kb. 2-szeres gyakoriságot (26%) mutattunk ki.

A sejtvonal specifikus JAK2V617F mutációs vizsgálatok PMF-ben és PV-ben 80% feletti arányban, ET-ben az esetek kétharmadában a mutáció pluripotens őssejt eredetét igazolták mindkét sejtvonal érintettsége révén.

Konklúzióként elmondható, hogy 3 különböző vizsgálati módszerrel, illetve ezek kombinációjával sikerült igazolnunk, hogy az MDS-ek és MPN-ek jelentős része - betegség típusától függően 31-89% arányban - pluripotens őssejt eredetű betegségeknek tekinthető. Valószínűsíthető, hogy a JAK2V617F mutáció az esetek többségében a betegség korai, pluripotens őssejtet érintő stádiumában jelenik meg. A del(20q), ahol előfordul, ott szintén pluripotens őssejtben jelentkezik az MPN-ekben. Az MPN-ek nagyobb részében a del(20q) és

del(5q) jelenléte nélkül is kimutatható a HUMARA-val monoklonalitás, ezért valószínű, hogy ezek a deléciók szekunder elváltozásként jelennek meg a tumorfejlődésben.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 1.** Új, 90%-os specificitású, kontroll szövetet nem igénylő, limfoid és mieloid sejtvonalra specifikus klonalitätsi kritériumokat határoztunk meg a HUMARA X-inaktivációs klonalitás vizsgálathoz. Meghatároztuk a HUMARA szenzitivitását, mely szerint a módszer legalább 50-60% monoklonális sejtet tartalmazó mintákban alkalmas klonalitás vizsgálatra. Teszteltük és igazoltuk a HUMARA módszer kvantitatív jellegét poliklonális és monoklonális sejteket tartalmazó keverék mintákon.
- 2.** HUMARA klonalitätsi eredményeink alapján, kettős limfoid-mieloid monoklonalitás kimutatásával igazoltuk, hogy MDS-ben és MPN-ben egyaránt, a vizsgált esetek több, mint egyharmadában pluripotens hemopoetikus őssejtől indult ki a tumor.
- 3.** MS-PCR segítségével kimutattuk, hogy az del(5q) mindkét betegségcsoportban elsősorban mieloid sejtekben jelentkezik, míg a del(20q) megtalálható a perifériás limfoid sejtekben is. A del(20q) limfoid megjelenése a del(5q)-nál korábbi, pluripotens őssejt szintjén bekövetkező delécióra utal. Párhuzamos vizsgálatokban a HUMARA-val kimutatható monoklonalitás gyakorisága nagyobb volt, mint az MS-PCR-rel kimutatható deléciók gyakorisága, ezért feltételezzük, hogy a del(5q) és del(20q) a tumorfejlődés egy későbbi lépéseként, addíciónálisan jelennek meg, egy már fennálló monoklonális proliferáció talaján.
- 4.** A vizsgált 5q és 20q deléciók előfordulási gyakorisága szempontjából az MS-PCR módszer nem mutatott különbséget hagyományos citogenetikához képest MDS-ben. Magasabb előfordulást sikerült azonban kimutatni MPN-ben del(5q) (14%), ill. del(20q) (26%) esetében.
- 5.** Sejtvonal specifikus JAK2V617F mutációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy PMF-ben és PV-ben 80% feletti arányban, ET-ben a vizsgált esetek kétharmadában a mutáció pluripotens őssejtben következett be, mivel előfordult a limfoid és a mieloid sejtekben is. Eredményeink alapján a JAK2V617F mutációt hordozó MPN-ek túlnyomó többsége pluripotens őssejt eredetűnek tekinthető.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Pajor László Professor Úrnak, aki munkám feltételeit megteremtette és az elejétől a végéig támogatta, ösztönözte.

Köszönöm Dr. Kovács Gyula Professor Úrnak, hogy az MS-PCR vizsgálatok elvégzését a Heidelbergi Egyetemen lehetővé tette.

Köszönettel tartozom Dr. Kereskai Lászlónak a patológiai diagnózisokért.

Köszönöm Radvánszky Lajosnének az áramlási citometriai mérések készítése során nyújtott segítségét, valamint Dr. Alpár Donátnak és Lacza Ágnesnek az értékes tudományos konzultációkat.

Végül köszönöm családom sokéves támogatását.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Közlemények

Jáksó P, Kereskai L, Molnár L, Pajor L. Lineage-specific clonality analysis of chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndrome by human androgen receptor assay.

Pathol Oncol Res. 2007;13(2):114-22.

IF: 1.241

Pajor L, Lacza A, Kereskai L, Jáksó P, Egyed M, Iványi JL, Radványi G, Dombi P, Pál K, Losonczy H. Increased incidence of monoclonal B-cell infiltrate in chronic myeloproliferative disorders.

Mod Pathol. 2004 Dec;17(12):1521-30. IF: 3.643

Jáksó P, Pajor L. Advantages of CD45 vs. side scatter based gating in the course of flow cytometric immuno-phenotyping in malignant hematologic diseases.

Orv Hetil. 1998 Oct 18;139(42):2509-13.

Idézhető absztraktok

Jáksó P, Pajor L. Sejtvonala specifikus monoklonalitás vizsgálatok myeloproliferatív betegségekben és myelodysplasiában.

Magyar Belorvosi Archivum. 2001;54(Supplementum 2001/1):22.

Jáksó P, Pajor L. X-kromoszóma inaktivációs klonalitätsi tesztek krónikus myeloproliferatív betegségekben és myelodysplasiában.

Hematológia Transzfúziológia. 2005;38(Supplementum 2005/1):34-35.

Jáksó P, Nagy Z, Kereskai L, Alpár D, Kajtár B, Pajor L. Analysis of polycythemia vera and essential thrombocythemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay.

Blood Reviews. 2007;21(Supplement 1):123

IF: 5.756

Kongresszusi poszterbemutatók

Jáksó P, Pajor L. A fényszórás alapján történő kapuzással kapcsolatban felmerülő problémák az áramlási cytometriás immunfenotipizálás során, malignus hematológiai kórképek esetén.

Pathológus Találkozó, Lillafüred, 1997

Jáksó P, Pajor L. Sejtvonala specifikus monoklonalitás vizsgálatok myeloproliferatív proliferatív betegségekben és myelodysplasiában.

A Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XVIII. Kongresszusa, Pécs, 2001.

Jáksó P, Pajor L. X-kromoszóma-inaktivációs klonalitätsi tesztek krónikus myeloproliferatív betegségekben és myelodysplasiában.

A Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2005.

Jáksó P, Nagy Z, Kereskai L, et al. Analysis of polycythemia vera and essential thrombocythemia by lineage specific investigation of JAK2V617F mutation and X-linked clonality assay.

International Society of Haematology, Congress of the European & African Division, Budapest, 2007.

Előadások tudományos kongresszusokon

Jáksó P, Pajor L. Sejtvonala specifikus monoklonalitás vizsgálatok myeloproliferatív betegségekben és myelodysplasiában.

A Magyar Haematológiai és Transzfúziológiai Társaság XVIII. Kongresszusa, Pécs, 2001.

Jáksó P, Pajor L. X-kromoszóma kötött molekuláris tesztek jelentősége a pathológiai diagnosztikában. 61. Pathológus Kongresszus, Győr, 2002.