

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Genetikai abnormalitások vizsgálata
plazmasejtes mielómában**

Dr. Kosztolányi Szabolcs Örs

*Doktori iskola: Klinikai Orvostudományok
Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos
Program: Molekuláris patomorfológia
Programvezető: Prof. Dr. Pajor László
Témavezető: Dr. Alpár Donát*

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2019.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés - irodalmi áttekintés.....	6
1.1. A plazmasejtes mielóma klinikai megjelenése	6
1.2. A mielóma sejtek biológiai jellemzői	12
1.2.1. Plazmasejtek fejlődése - karcinogenezis	12
1.2.2. Endoplazmatikus stressz - unfolded protein response (UPR)	13
1.2.3. Plazmasejtek és a csontvelői mikrokönyezet.....	14
1.3. A plazmasejtes mielóma genetikai háttere	14
1.3.1. Öröklött genetikai eltérések	17
1.3.2. Számbeli kromoszóma aberrációk	18
1.3.3. Kromoszóma transzlokációk	19
1.3.4. DNS kópiaszám eltérések	21
1.3.5. Szerzett mutációk	24
1.3.6. Genetikai heterogenitás és klonális evolúció	25
1.4. A mielóma genetikai és transzkriptomikai vizsgálómódszerei.....	26
1.4.1. Konvencionális citogenetika	27
1.4.2. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	28
1.4.3. DNS microarray	28
1.4.4. Génexpressziós analízis	29
1.4.5. Multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció (MLPA)	30
1.4.6. Új-generációs szekvenálás	31
1.5. Összegzés	31
2. Célkitűzés	33
2.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával	33
2.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával.....	33
2.3. Pontmutáció specifikus kimutatása digitális MLPA technikával.....	34
2.4. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye PCM-ben szenvedő betegein	34
2.5. Klonális evolúció vizsgálata egyedi sejt szinten.....	35
3. Anyagok és módszerek.....	36
3.1. Minták	36
3.2. Plazmasejt arány meghatározás és plazmasejt dúsítás	36
3.3. Multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció	37
3.4. Digitális multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció.....	37
3.5. Piroszekvenálás	39
3.6. Digitális droplet PCR	39
3.7. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	40
3.8. Motorizált mikroszkópia	41
3.9. Statisztikai értékelés.....	41
4. Eredmények.....	42
4.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával	42
4.1.1. MLPA által detektált aberrációk	42
4.1.2. MLPA és iFISH eredmények összehasonlítása.....	43
4.1.3. MLPA eredmények validálása	44
4.1.4. Az 1-es kromoszóma abnormalitásainak vizsgálata	45
4.1.5. Az azonosított aberrációk együttes megjelenése.....	46
4.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával.....	47

4.2.1. Számbeli kromoszóma aberrációk kimutatása	47
4.2.2. Szubkromoszómális kópiaszám eltérések azonosítása.....	48
4.2.3. Az 1-es kromoszóma abnormalitásainak részletes feltérképezése.....	48
4.2.4. Digitális MLPA, valamint MLPA és iFISH adatok összehasonlítása	49
4.3. Pontmutáció specifikus kimutatása digitális MLPA technikával.....	50
4.4. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye PCM-ben szenvedő betegein	51
4.4.1. Plazmasejtek mágneses dúsítása	51
4.4.2. IFISH vizsgálattal kimutatott aberrációk	51
4.4.3. MLPA technikával kimutatott aberrációk.....	52
4.4.4. MLPA és iFISH eredmények összehasonlítása.....	52
4.5. Klonális evolúció vizsgálata egyedi sejt szinten.....	53
4.5.1. Kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan aberrációk szűrése iFISH-sel ..	53
4.5.2. Genetikai aberrációk korrelált vizsgálata motorizált mikroszkópiával....	54
5. Megbeszélés.....	56
5.1. Genetikai aberrációk megjelenése a PCM onkogenezise során	56
5.2. Az MLPA lehetséges szerepe a mielóma genetikai vizsgálatában	58
5.3. Digitális MLPA által nyújtott lehetőségek.....	60
6. Az új eredmények összefoglalása	63
7. Irodalomjegyzék.....	64
8. Köszönetnyilvánítás	73
9. A disszertáció alapját képező publikációk.....	75
10. Egyéb publikációk.....	77

Rövidítések jegyzéke

BA	disszociációs szonda (break-apart probe)
BAC	bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial arteficial chromosome)
BMSC	csontvelői sztróma sejt (bone marrow stromal cell)
CCND1	cyclin D1 gén (cyclin D1 gene)
CEP	centromer-specifikus szonda (chromosome enumeration probe)
CSR	izotípusváltás rekombináció (class switch recombination)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol (4',6-diamidine-2-phenyl indole)
ddPCR	digitális droplet PCR (digital droplet PCR)
DF	dupla-fúziós szonda (dual-fusion probe)
DNS	dezoxi-ribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
eGFR	becsült glomeruláris filtrációs ráta (estimated glomerular filtration rate)
EMD	extramedulláris betegség (extramedullary disease)
F	fúziós iFISH szignál (fusion iFISH signal)
FISH	fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluoreszcein izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)
FGFR3	fibroblaszt növekedési faktor receptor 3 gén (fibroblast growth factor receptor 3 gene)
iFISH	FISH interfázis sejtmagon (FISH on interphase nucleus)
HGF	hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor-1 (insulin like growth factor-1)
IGH	immunglobulin nehézlánc gén (immunoglobulin heavy chain gene)
IL-6	interleukin-6 (interleukin 6)
IMWG	nemzetközi mielóma munkacsoport (international myeloma working group)
ISS	nemzetközi stádium besoroló rendszer (international staging system)
LSI	lókusz-specifikus szonda (locus specific identifier)
c-MAF	c-Maf Proto-Onkogén (c-maf proto-oncogene)
MAPK	mitogén-aktivált fehérje kináz (mitogen-activated protein kinase)
MGUS	bizonytalan jelentőségű monoklonális gammopátia (monolonal gammopathy of undetermined significance)

MLPA	multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció (multiplex ligation-dependent probe amplification)
MMSET	mielóma multiplex SET domén gén (multiple myeloma SET domain gene)
NDMM	újonnan diagnosztizált mielóma multiplex (newly diagnosed multiple myeloma)
NFκB	nukleáris faktor kappa-B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGS	új-generációs szekvenálás (next-generation sequencing)
OS	teljes túlélés (overall survival)
P	piros iFISH szignál (red iFISH signal)
PCM	plazmasejtes mielóma (plasma cell myeloma)
PCL	plazmasejtes leukémia (plasma cell leukemia)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PET/CT	pozitron emissziós tomográfia/computer tomográfia (positron emission tomography/computer tomography)
PFS	progressziómentes túlélés (progression free survival)
SD	standard deviáció (standard deviation)
SG	spectrum green (spectrum green)
SMM	parázsló mielóma (smouldering multiple myeloma)
SO	spectrum orange (spectrum orange)
t	transzlokáció (translocation)
TNF	tumor nekrozis faktor (tumor necrosis factor)
UPR	nem megfelelő szerkezetű fehérje válasz (unfolded protein response)
WBLDCT	teljes test alacsony-dózisú computer tomográfia (whole body low dose computer tomography)
XBP1	X-box fehérje 1 (X-box protein 1)
Z	zöld iFISH szignál (green iFISH signal)

1. Bevezetés - irodalmi áttekintés

1.1. A plazmasejtes mielóma klinikai megjelenése

A plazmasejtes mielóma (PCM) malignusan átalakult csontvelői plazmasejtek felszaporodásával járó betegség. A jellegzetes csontszerkezeti eltérésekkel, patológiás csonttörésekkel, vesekárosodással járó kórképről az első gyanítható feljegyzést 1844-ben Samuel Solly írta meg, aki két, fáradékonysággal, csontfájdalmakkal és többszörös csonttörésekkel jelentkező esetet publikált *mollities ossium* elnevezéssel [1]. A betegség a 2016-os WHO klasszifikációban már plazmasejtes mielómaként szerepel [2], de a mindennapi klinikai gyakorlatban továbbra is a klasszikus mielóma multiplex elnevezés használatos.

A PCM a vérképzőrendszeri kórképek 10-15%-át adva a második leggyakoribb hematológiai betegség, az összes daganatos betegség 1-2%-át teszi ki. Jellemzően idősebb korban jelentkezik, a betegek körülbelül 70%-a 65 évesnél idősebb a diagnózis felállításakor és csupán 10%-uk fiatalabb 50 éves kornál (40 év alatti incidenciája: 2%). A PCM világviszonylatban évente mintegy 130.000 betegnél kerül felismerésre, incidenciája egyértelműen nőtt az elmúlt 25 évben. Bár a legújabb kezelési módszerekkel drámaian javult a betegek várható túlélése, a PCM továbbra is gyógyíthatatlannak tekinthető, a betegséghez kapcsolódó mortalitás közel 100.000 fő/év világszerte [3]. A Magyar Rákregiszter adatai alapján a legutóbbi időszakban évente 450-600 új beteget diagnosztizáltak, így – a jelenlegi átlagosan várható, hazai terápiás viszonyok mellett elérhető 5-6 éves túlélést figyelembe véve – hazánkban prevalenciája körülbelül 1.500 fő egy adott időszakot tekintve [4].

A molekuláris genetikai technológiákkal nyert eredmények alapján mára egyértelműen igazolódott, hogy a PCM minden esetben egy pre-malignus állapotból, az ún. bizonytalan jelentőségű monoklonális gammopátiából (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS) fejlődik ki egy tünetmentes stádiumon, az ún. parázsló (*smouldering*) mielóma (SMM) állapoton keresztül [5]. A betegség ezen korai stádiumaira egységesen jellemző, hogy tünettel vagy következményes célszervkárosodással még nem járnak, így gyakran rejtve maradnak. Az MGUS és az SMM a PCM-től lényegében csak a daganatos sejttömeg mennyiségében térnek el, magukban hordozva a PCM-be való transzformálódás

emelkedett kockázatát: az MGUS-os betegeknek éves szinten 1%-a transzformálódik PCM-be, míg SMM-nél az első 5 évben ez az érték 10%, ezt követően fokozatosan csökken [6].

A már kifejlődött PCM betegségekre igen változatos, legtöbb esetben nem specifikus klinikai tünetegyüttes jellemző, mely nehezíti a korai felismerést és diagnózist. A betegek körülbelül 15%-a tünetmentes is lehet diagnóziskor, mely esetben legtöbbször a jelentősen gyorsult vörösvérsejt süllyedés, magasabb szérum összfehérje vagy mérsékelten emelkedett vesefunkciós értékek miatt indított kivizsgálás eredményeként derül ki a betegség. Az esetek 60-70%-ában anémia és a csontok érintettségéből adódó csontfájdalmak miatt fordulnak a betegek orvoshoz, a radiológiai vizsgálatok litikus csontléziókat, súlyos oszteopéniát, ritkábban patológiás csonttöréseket mutatnak ki. A betegek közel felénél beszűkült vesefunkciós laborértékek is észlelhetők – sokáig tünetszegényen –, de akár akut veseelégtelenséggel is indulhat a kórtörténet. A fokozott csontreszorpció kapcsán kialakult hiperkalcémia a betegek 20-25%-ánál észlelhető – legtöbbször szintén tünetmentesen –, mely akár súlyos tudatzavart is okozhat. A fent említett leggyakoribb, plazmasejtes szaporulattal összefüggésbe hozható célszervkárosodásokat CRAB-kritériumokként említi a szakirodalom (1. táblázat).

A plazmasejtek malignus átalakulásukat követően kezdetben a csontvelőben szaporodnak, az ennek hatására kialakuló mieloszuppresszió anémia mellett egyéb citopéniát is eredményezhet vérzéses panaszokban, illetve visszatérő infekciókban manifesztálódva. A kórlefolyás végső fázisában a sejtek függetlenítik magukat a csontvelői környezettől, a perifériás vérbe kijutva plazmasejtes leukémia (PCL), vagy egyéb lokalizációban szaporodva extramedulláris betegség alakulhat ki (EMD) az érintett szerv funkciójának károsításával.

1.1.2. A plazmasejtes mielóma diagnosztikája

A monoklonális plazmasejtek csaknem minden esetben (97-98%) monoklonális immunglobulinokat (IgG, IgA, IgD és M nehézláncokkal, csökkenő gyakorisági sorrendben), ritkábban csak kappa vagy lambda könnyűlánc komponenst szekretálnak. A tünetek vagy egyéb jellemző általános laboratóriumi eltérések (úgy mint jelentősen gyorsult süllyedés, ismeretlen etiológiájú normo- vagy enyhén makrociter anémia) alapján gyanút keltő esetekben ezek kimutatására irányuló szérum és

vizeletvizsgálatokkal indul a diagnosztikus folyamat. A mintákon végzett fehérje elektroforézis, valamint immunfixációs vizsgálatok különböző érzékenységgel képesek ezeket detektálni, utóbbiak azok immunfenotípusát is megadni. A csak könnyűláncot termelő plazmasejt szaporulat felismerésében a szérumban szabad könnyűlánc assay kifejlesztése hozott jelentős előrelépést, mely diagnosztikus értékén túl prognosztikus, illetve a terápia hatékonyságára vonatkozó eredménnyel is szolgál. Ezeknek az egyre érzékenyebb módszereknek a bevezetésével mára körülbelül 1-2%-ra csökkent a valóban non-szekretoros folyamatok diagnóziskor mutató gyakorisága, melyek felismerését különösen nehezíti, hogy csak a szöveti biopsziás minta citológiai vizsgálata igazolja a betegséget.

A definitív diagnózis a csontvelőben – vagy egyéb szöveti mintán – 10%-ot meghaladó monoklonális plazmasejt szaporulat kimutatásán alapul. A malignus mielóma sejtek a normális plazmasejtektől eltérő, sajátos immunfenotípussal rendelkeznek (CD38+, CD138+, CD56+, CD19-, CD45-), mely multiparaméteres áramlási citometriával vagy immunhisztokémiai módszerekkel azonosítható. A diagnosztikán túl ezen sejtfelszíni molekulák – elsősorban a CD138 – abnormális expressziója sejtszeparálás, mágnesgyöngyös sejtűdítés alapját is képezheti. Az eljárással koncentráltabb sejtszuszpenzió nyerhető, mely jelentősen könnyítheti a prognosztikus és/vagy prediktív jelentőséggel bíró genetikai eltérések mintából való kimutatását. A PCM klinikai diagnózisához a kóros mielómás sejtszaporulat azonosításán túl a betegséghez kapcsolódóan megjelenő specifikus célszervkárosodások (CRAB) valamelyikének kimutatása is hozzájárul, mely differenciál diagnosztikai paraméter a betegség SMM fázistól való elkülönítése tekintetében.

Több klinikai vizsgálat mintegy ezer SMM betegének közel egy évtizedes nyomon követésével azonosíthatóvá váltak olyan biológiai paraméterek is, melyek jelenléte esetén a célszervkárosodások két éven belüli kialakulásának valószínűsége meghaladta a 80%-ot [7-9]. Három független biomarker jelenléte mutatott szignifikáns összefüggést ezzel a kedvezőtlen klinikai kimenetellel:

1. >60%-os csontvelői plazmasejtes infiltráció [7]
2. érintett/nem érintett szérumban szabad könnyűláncok aránya >100 [8]
3. >1 fokális csontvelői lézió az mágnesesrezonancia-képzéskor (MRI) felvételen [9].

Bortezomibbal, lenalidomiddal ezen – korábbi kritériumok alapján SMM-ként azonosítható – betegeknél is jelentős, teljes túlélési előnyben is megnyilvánuló terápiás választ lehetett elérni, így a Nemzetközi Mielóma Munkacsoport (IMWG) 2014-ben módosította a diagnosztikus kritériumokat (2. táblázat), melynek nyomán a CRAB-kritériumok mellett ezek a biomarkerek is mielóma definiáló eltérésekként (*myeloma defining event*, MDE) kezelendők [10].

1.1.3. Plazmasejtes mielóma prognosztikus besorolása

Nemcsak a klinikai megjelenés, de a betegség lefolyása, az egyes terápiás vonalakra adott válaszok és a várható túlélés is igen heterogén képet mutat mielómában. A kórlefordást kezelésekként elért – terápiás vonalanként típusosan egyre rövidebb – remissziós periódusok és terápia rezisztencia kapcsán kialakult relapszusok váltakozása jellemzi. A betegek döntő többsége továbbra is a betegségével hal meg a kór vagy a kezelések okozta szövődményekben. Az új-generációs immunmodulánsok, proteaszóma gátlók vagy monoklonális antitestek egyre szélesebb körű alkalmazásával ugyan jelentősége valamelyest csökkenni látszik, az aktuális szakmai ajánlások szerint még továbbra is a jó választ eredményező indukciós kezelés után alkalmazott nagy dózisu kemoterápiát követő autológ hemopoetikus őssejt transzplantációval érhető el a leghosszabb progresszió mentes túlélés (PFS), ami teljes túlélési (OS) előnyben is megnyilvánul. A transzplantációra alkalmas betegek azonosítása így fontos feladat [11, 12].

Bár a túlélési eredmények jelentős variabilitást mutatnak a vizsgált betegpopuláció összetételétől, illetve az alkalmazott terápiától függően, általánosságban megállapítható, hogy a korábbi 3 éves medián túlélés az elmúlt évtizedben megduplázódott, köszönhetően az új támadáspontú hatóanyagok egyre szélesebb körű alkalmazásának, illetve a szupportív kezelések fejlődésének [6]. Az immunmodulánsok, proteaszóma gátlók, monoklonális antitestek kombinációs, illetve szekvenciális alkalmazásával egyre mélyebb és tartósabb terápiás válasz érhető el a betegek egyre szélesebb körében. Ennek köszönhetően növekszik a 10 évnél hosszabb teljes túlélést mutatók aránya (különösen az autológ átültetésen átesett, alacsony rizikójú betegek között), ugyanakkor a betegek körülbelül 20%-ánál továbbra is csupán 2 évnél rövidebb túlélés várható [13].

Ennek a változatos klinikai kimenetelnek a háttérében számos beteg-, illetve betegség-specifikus tényező azonosítható, melyek igen nehezen illeszthetők egy egységes, széles körben alkalmazható rizikóbecslő rendszerbe. Az 1975-ben Durie és Salmon által publikált rendszer csupán a tumortömeget reprezentáló paramétereket használta [14], figyelmen kívül hagyva több, terápiás hatást befolyásoló fontos tényezőt. Emellett ez a besorolás még olyan klasszikus kemoterápiák mentén került kidolgozásra, melyeket manapság már alig alkalmazunk, így a prognózis becslésére nem kellően informatív, használata idejétmúlt.

A betegek életkora, a társbetegségek, valamint a diagnóziskor észlelt mielóma okozta célszervkárosodások alapvetően befolyásolják a beteg általános állapotát (úgynevezett *performance* státuszát), ezzel behatárolva, hogy milyen terápia alkalmazható náluk. A betegség biológiai adottságai (esetleges blasztos morfológia, fokozott proliferációs aktivitás, PCL vagy EMD jelenléte) szintén rontják a túlélési esélyeket. A 2000-es években a nemzetközi stádium besoroló rendszer (*International Staging System, ISS*) használata vált egyre általánosabbá, mely két paraméter alapján kategorizálja a betegeket: 1. béta-2 mikroglobulin szint, ami egyfajta tumortömeg jelző paraméterként fogható fel, illetve 2. a szérum albumin koncentráció, mely a beteg tápláltságát, ezáltal fittségét jellemezi jó megközelítéssel [15]. Ezzel a módszerrel három, túlélési esélyek szempontjából jelentősen eltérő csoportot lehetett elkülöníteni (3. táblázat).

További intenzív kutató munka és a vizsgálati módszerek fokozatos fejlődése vezetett a patogenezist, progressziót irányító folyamatok, illetve az azok háttérében álló, visszatérő módon megjelenő genetikai eltérések egyre mélyebb megismeréséhez. Az immunglobulin nehézlánc (*IGH*) gént érintő kromoszóma transzlokációk előfordulásának elemzése, valamint kiterjedt génexpressziós profilozási tanulmányok alapján több, eltérő klinikai jelleggel és kórlefordulással társuló alcsoport vált elkülöníthetővé genetikai-transzkriptomikai paraméterek alapján. Ez vezetett többek között az ún. TC klasszifikáció kidolgozásához, melyben a T különféle *IGH* gént érintő transzlokációkat, míg a C specifikus ciklin fehérjék kifejeződését jelöli [16]. A háttérben álló citogenetikai eltérések egy részének prognózist befolyásoló szerepét azóta számos vizsgálat igazolta [17, 18]. Kellően szenzitív és átfogó módszer alkalmazásával szinte valamennyi mielómás betegben kimutathatók különféle – legtöbbször nem izoláltan jelentkező – genomikus eltérések. Bár több aberráció prognosztikus jelentősége még nem ismert, vannak bizonyos visszatérő

kromoszómális eltérések (pl. del(17p), t(4;14), 1q többlet), melyekről egyértelműen bebizonyosodott, hogy kedvezőtlenül befolyásolják a betegek túlélési esélyeit, ezért ezek interfázis fluoreszcens *in situ* hibridizáció (iFISH) módszerrel való vizsgálata ma már diagnosztikus alapkövetelmény [17].

Az IMWG 2014-ben publikálta átdolgozott rizikó besorolási rendszerét (*Revised International Staging System, R-ISS*), mely a korábbi paraméterek mellett a citogenetikai eltérések jelentőségére is hangsúlyt fektet. A betegek itt is három, szignifikánsan elkülönülő várható túlélést mutató csoportba sorolhatók [19]. Ez a prognosztikai klasszifikáció csupán három, a betegség klinikai kimenetelét kedvezőtlenül befolyásoló, iFISH módszerrel vizsgálható eltérést alkalmaz, úgymint a del(17p), t(4;14) és a t(14;16) (4. táblázat). A PCM-hez társultan megjelenő citogenetikai eltérések azonban ennél jóval komplexebb és heterogénebb képet mutatnak az egyes betegekben [20]. Éppen ezért léteznek egyéb stratifikáló rendszerek is (pl. a Mayo Klinika által használt mSMART), melyek olyan további – randomizált vizsgálatokban igazolt, szignifikáns hatással bíró – citogenetikai aberrációk figyelembevételét is javasolják, mint például az 1q többlet, vagy az 1p deléció [21].

Az egyre javuló terápiás eredmények mellett a magas rizikóval járó (*high risk*) citogenetikai aberrációt hordozó betegek túlélési eredményei jelentős heterogenitást mutatnak az ezt analizáló randomizált klinikai vizsgálatokban. Ez az alkalmazott citogenetikai vizsgálmódszerek, a pozitivitást jelentő határértékek megválasztása és a vizsgálati betegpopuláció eltérésein túl abból is adódhat, hogy az analízisek során nem mindig, és nem egységesen veszik figyelembe a társuló aberrációkat, melyek akár ronthatják, vagy enyhíthetik is egy adott eltérés prognosztikus hatását. Több magasrizikójú citogenetikai eltérés társulása esetén azok kedvezőtlen hatása additív módon érvényesül, míg például az 5-ös kromoszóma triszómiájának társulása esetén a kedvezőtlen hatás enyhébb lehet [18]. Mindezek alapján a jövőben az egyre bővülő információkat szolgáltató vizsgálatok feltehetőleg újabb kezelési és monitorozási irányelvek kidolgozásához fognak vezetni, figyelembe véve az egyes citogenetikai eltérések együttes megjelenését is.

Megjegyzendő, hogy ezen rizikó besorolási rendszerek a betegség diagnózisakor használatosak, az akkori helyzet alapján adnak becslést. Relapszus idején a prognózist további tényezők is árnyalják, úgymint a korábban alkalmazott kezelésre adott válasz mélysége és időtartama, illetve a kezelés szövődményei. Emellett fontos figyelembe venni a betegség specifikus tényezőinek időbeli változását

is, hiszen a betegség előrehaladásával a domináló plazmasejt populáció genetikai sajátosságai is folyamatosan módosulhatnak. Az új szerek egy része bizonyos citogenetikai eltérések negatív hatását közömbösítheti [13, 17], így a betegség folyamán a plazmasejtek genetikai jellemzőinek ismételt vizsgálata kiemelt jelentőségű lehet a terápiás döntéshozatal szempontjából is.

1.2. A mielóma sejtek biológiai jellemzői

A daganatok kezelését jelentősen javíthatja, ha megértjük az adott betegség biológiai hátterét. A patogenezis, progresszió és terápia-rezisztencia folyamatairól nyert eredmények vezettek a klasszikus DNS-károsító citosztatikumokon túl új terápiás célpontokon ható szerek, például az immunmodulánsok és a proteaszóma gátlók kifejlesztéséhez is, melyek manapság a kezelési arzenál kulcsszereplői. A malignus mielóma sejt kialakulásához, proliferációs és túlélési előnyéhez vezető mechanizmusok megismeréséhez közelebb kerülhetünk a normális plazmasejtek működésének megértése által.

1.2.1. Plazmasejtek fejlődése - karcinogenezis

A humán evolúció egyik legfontosabb követelménye a megfelelő immunitás, a fenyegető fertőzésekkel szembeni állandó védelem. Az immunrendszer működésében fontos szerepet töltenek be a plazmasejtek, melyek a humorális immunválasz részeként, adott antigén inger hatására kellő mennyiségű specifikus antitestet, immunglobulint termelnek.

A normális plazmasejtek fejlődése a csontvelőben kezdődik. A pre-pro-B-sejtekből az immunglobulin nehézlánc (*IGH*) gén variábilis (V), diverzitás (D) és junkcionális (J) szegmenseinek véletlenszerű rekombinációjával létrejövő produktív (azaz *in-frame*) B-sejt receptort expresszáló (IgM+ és IgD+), naiv B-sejtek képződnek. Ezen alacsony affinitású sejtek elhagyva a csontvelőt, a periférián antigén stimulus hatására a centrum germinativumba kerülnek, ahol a környező antigén-prezentáló sejtek közreműködésével magas affinitású, antigén epitópra specifikus plazmasejteké alakulnak, melyek fokozott effektivitású antitesteket szekretálnak [22]. A magas antigén specifitás az *IGH* gén hipervariábilis régiójában végbemenő szomatikus

hipermutáció (SHM), illetve a konstans régió izotípusváltást eredményező rekombinációja (CSR) nyomán alakul ki. Ezek a folyamatok az aktiváció-indukálta citidin-deamináz enzim által képzett kettős-szálú DNS törések létrejöttével és a megfelelő szakaszok rekombinációjával valósulnak meg. Fiziológias körülmények között az *IGH* gén mentén jelentkező töréseket a töréspontok két oldalán elhelyezkedő, génen belüli szakaszok összekapcsolódása követi, egyes esetekben azonban a genom távoli régióiban is megjelennek szimultán törések, melynek nyomán *IGH* gént érintő, interkromoszómális transzlokációk is kialakulhatnak. Egyetlen *IGH* gén törés 0,4-1%-os hibás korrekcióját alapul véve, naponta körülbelül 1000 abnormális kromoszóma transzlokációt hordozó sejt kialakulása valószínűsíthető az emberi szervezetben [20]. A transzlokációk egy része malignus folyamatokat indít el, melyre példák a PCM-ben visszatérő módon megjelenő *IGH* transzlokációk.

1.2.2. Endoplazmatikus stressz - unfolded protein response (UPR)

A centrum germinativumban centroblasztokból a fenti folyamatok révén kialakuló plazmasejtek fő funkciója, hogy a SHM és CSR során képződött magas affinitású antitesteket nagy mennyiségben termeljék mindaddig, amíg az antigén stimulus fennáll, majd annak megszűnését követően apoptózis révén elpusztuljanak. Ehhez a sejt G1 fázisban tartása mellett a jelentős fehérje szintézisből adódó fokozott endoplazmatikus stressz kivédése is szükséges. Előbbi a sejtciklust szabályozó D-típusú ciklin fehérjék transzkripciója, utóbbi a nem megfelelő szerkezetű fehérjék okozta stressz válasz (UPR), mint túlélési mentő útvonal megfelelő koordinációja révén történik. A nem megfelelő szerkezetű fehérjék felszaporodásakor fokozottan expresszáldó IRE1 α a plazmasejtek egyik legfontosabb növekedést és túlélést segítő faktorát, az XBP1 hasított formáját (XBP1s) hozza létre [20, 23]. A fenti komplex sejtfolymatokban bekövetkező szabályozási zavar mielóma kialakulásához vezethet [23]. A mielóma sejtek UPR függőségét igazolja, hogy teljes genom szekvenálási vizsgálatok több transzlációt szabályozó gén (pl. *IRF4*, *XBP1*) mutációját is igazolták mielómában [24]. Az XBP1s fokozott expressziója állatkísérletes modellekben mielóma jellegű eltérések kialakulásához vezetett [25], humán vizsgálatokban pedig kedvezőtlenebb klinikai kimenetellel társult [26].

1.2.3. Plazmasejtek és a csontvelői mikrokörnyezet

Az antigén stimulus elmúltával a plazmasejtek nagy része apoptózis által gyorsan elpusztul, míg egy kisebb hányaduk memória sejtként a csontvelő speciális részeibe (*niche*) vándorol, ahol több évig tartó nyugvó állapotban túlélnek. Plazmasejtes betegségekben a megváltozott csontvelői mikrokörnyezet alapvetően hozzájárul a betegség kialakulásához, progressziójához [27].

A normális plazmasejtekhez képest a malignusan transzformált mielóma sejtek csontvelői affinitása fokozott. A csontvelői sztróma sejtek (BMSC) VCAM1 sejt felszíni receptorához VLA4-en keresztül kapcsolódva, elsősorban az NF κ B jelátviteli útvonal stimulálásával különböző autokrin és parakrin módon ható citokinek szintézisét és szekrécióját indukálják. A fokozott IL-6, VEGF, IGF-1, TGF β szekréció a mielóma sejtek túlélését, proliferációját eredményezi. A VEGF emellett angiogenezist is indukál, mellyel a tumor fokozott nutritív igényei is kielégülnek. A BMSC-k fokozott RANKL és DKK1 szekréciója felelős – szintén az NF κ B útvonalon keresztül – a típusos litikus csontléziókban megnyilvánuló oszteoklaszt aktivációért és oszteoblaszt gátlásért [27].

A plazmasejtes mielóma progressziójával bizonyos sejtadhéziós molekulák expressziója (pl. CD56, CXCR4) – és ezzel a csontvelői függőség – csökken, ami alapját képezheti extramedulláris betegség vagy plazmasejtes leukémia kialakulásának [23].

1.3. A plazmasejtes mielóma genetikai háttere

A molekuláris biológiai technikák fejlődésének köszönhetően igazolódott, hogy a PCM nem csak klinikai megjelenésében és kórlefolysában, de genetikailag is igen heterogén, komplex betegség [20, 28]. Míg kariotipizálással a betegek mintegy 30-40%-ában mutatható ki valamilyen genetikai eltérés, a nagyobb felbontású, szenzitívebb módszerekkel (pl. iFISH, génexpressziós vizsgálatok, DNS microarray-alapú vizsgálatok, új-generációs szekvenálás) az esetek közel 100%-ában detektálható valamilyen aberráció [29, 30]. A kromoszómáisan és szubkromoszómáisan kialakuló strukturális, illetve mennyiségi eltérések (specifikus transzlokációk, kópiaszám változással járó eltérések, különböző jelátviteli utak génjeinek szomatikus mutációi) számos variációban fordulhatnak elő az egyes betegekben. Teljes genom (WGS),

illetve exom (WES) vizsgálatok átlagosan 35 betegség-releváns mutáció egyidejű jelenlétét igazolták betegenként, mellyel a PCM a közepesen komplex genetikai háttérrel rendelkező daganatok közé sorolható, több eltérést hordozva, mint a hematológiai betegségek többsége, de kevesebbet, mint a spektrum felső sávjában elhelyezkedő, akár több száz mutációval is járó epitheliális tumorok [31].

Más daganatos betegségekhez hasonlóan a PCM-re is jellemző, hogy a tumort többféle sejtpopuláció alkotja, melyek közös, valamennyi daganatos sejtből jelenlévő klonális eltéréseken túl különböző, csak a sejtek kisebb csoportjaiban kimutatható, szubklonális aberrációkkal is jellemezhetők. A klonális heterogenitás már a betegség korai, MGUS fázisában is igazolható [32, 33].

A tumorgenezist, progressziót, terápiás rezisztenciát szabályozó genomikus folyamatok szekvenciájának vizsgálatára a plazmasejtes megbetegedés informatív modellnek tekinthető, köszönhetően a betegség több, klinikailag jól elkülöníthető stádiumon keresztül való fejlődésének (MGUS-SMM-PCM-PCL). Nagyobb esetszámú, különböző stádiumokban lévő betegpopulációk összehasonlító elemzése, illetve ugyanazon betegek időbeli nyomon követése alapján vált ismertté, hogy a tumor kialakulását kísérő korai eltérések megjelenése után a betegség progressziójáért a random módon halmozódó és fennmaradó másodlagos (szekunder) genetikai eltérések felelősek, fokozva a daganat genomikai komplexitását, ami végül extramedulláris betegség, illetve plazmasejtes leukémia megjelenéséhez vezet [28, 33].

A korai genetikai eltérések egyik alapvető csoportját az *IGH* gént (14q32) érintő – legtöbbször kiegyensúlyozott – transzlokációk jelentik, melyek az újonnan diagnosztizált mielómás esetek körülbelül felénél mutathatók ki. A CSR során kialakuló DNS törések hibás javításakor létrejövő átrendeződések révén a plazmasejtekben aktívan átíródó *IGH* erős enhanszer hatása alá kerülhet több potenciális onkogén. A leggyakoribb érintett lókuszek a 11q13, 6p21, 4p16, 16q23 és 20q11, mellyel rendre a *CCND1*, *CCND3*, *FGFR3/MMSET*, *c-MAF* és *MAF-B* gének fokozott expressziója alakul ki. Előbbi kettő közvetlenül, utóbbi három indirekt módon fokozza a D-típusú ciklinek kifejeződését, ami a sejtek G1/S átmenetének eltolásával proliferációt eredményez. Ezek az aberrációk jellegzetesen nem-hiperdiploid kariotípussal társulva észlelhetők [16]. Diagnóziskor az esetek körülbelül 5%-ában a fentiekől eltérő transzlokációk is előfordulhatnak.

A primer eltérések másik fő formáját a jellemzően páratlan számú kromoszómákat (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 és 21) érintő triszómiák halmozott jelenléte

alkotja, ami hiperdiploid kariotípust eredményez. Ebben, a betegek 50-55%-át érintő csoportban a tumoros sejtmagokban számszerű, 48-75 (átlagosan 53) kromoszóma detektálható [16, 34].

A PCM esetek jellemzően vagy az *IGH* transzlokációk, vagy a hiperdiploiditás által definiált csoportba sorolhatók, a betegek 10%-ában azonban ezek a jellemzők kombináltan is megjelenhetnek [16]. Ritka, visszatérő módon jelentkező primer eltérés még a 14-es kromoszóma monoszómiája vagy az immunoglobulin könnyűláncok génjeit (IG kappa - *IGK* és IG lambda - *IGL*) érintő transzlokációk. A negatív eredménnyel záruló diagnosztikus citogenetikai vizsgálatok hátterében elsősorban az alkalmazott módszer alacsony szenzitivitása és reprezentativitása, a plazmasejtek alacsony proliferációs sebessége, illetve a minta alacsony tumorsejt tartalma állhat [35].

A primer eltérések a betegség valamennyi fázisában – már MGUS-ban is – kimutathatók, mely bizonyítja a mielomagenezis szempontjából meghatározó szerepüket [5, 20, 22, 32]. Másik jellegzetességük – szemben a szekunder eltérésekkel –, hogy már diagnóziskor a tumorsejtek döntő többségében, legtöbbször klonálisan vannak jelen. Domináns klónt jellemző abnormalitásokról lévén szó, a betegség lefolyása során változatlanul megmaradnak, vizsgálatuk a kórlefordulás során egyszer, a diagnóziskor elegendő, ismételt vizsgálatuk nem szükséges.

Az MGUS vagy SMM betegek nem elhanyagolható része azonban sosem progrediál PCM-be, mely arra utal, hogy a progresszióhoz további szekunder genetikai aberrációk társulása is szükséges. Ezzel összhangban, PCM diagnózisakor átfogó, kellően szenzitív technikák alkalmazásával a primer abnormalitásokon túl számos további genetikai eltérés is kimutatható az esetek többségében [36]. Ezek száma és összetettsége a genomikus instabilitás révén egyre fokozódik a betegség előrehaladásával, amit a sorozatos, random módon kialakuló szekunder genetikai eltérések és azok mikroköznyezet által is befolyasolt szubklonális szelekciója vezérel [28].

A kromoszómális és szubkromoszómális régiók mennyiségi és/vagy strukturális változásaiból adódó genetikai heterogenitás ismert jelenség PCM-ben. Korábbi tanulmányok számos, a betegség kimenetelével összefüggést mutató eltérést azonosítottak, mint például a -13/del(13), amp(1q), del(17p), del(1p), del(12p) és del(16q) [16, 22, 36]. A deléciók esetén tumor-szuppresszor gének, kópiaszám nyeréssel járó esetekben sejtproliferációt fokozó gének módosult expressziója

valószínűsíthető a hatásmechanizmus hátterében. Ezek pontos feltérképezésében a nagy felbontású átfogó vizsgálatok (pl. génexpressziós vizsgálatok, DNS-microarray analízis, új-generációs szekvenálás) segítenek. Ezek a vizsgálatok igazolták a MAPK és NFκB jelátviteli útvonalak több génjének érintettségét, valamint a DNS *repair*-ben közreműködő géneket vagy a *MYC* onkogént érintő aberrációk PCM progressziójában betöltött, számos esetben prognosztikus jelentőséggel is bíró szerepét [20, 22, 23, 28].

Irodalmi adatok alapján a fenti genomikus változások mellett a kórfolyamatot epigenetikus módosulások is vezérlik [23]. Microarray vizsgálatok a normális B-sejtekétől eltérő, és a betegség különböző stádiumait is egyedileg jellemző metilációs profilt azonosítottak. Az MGUS-PCM átmenetnél genomikus instabilitáshoz vezető általános DNS-hipometiláció volt megfigyelhető, míg a PCM-PCL átmenetet inkább gén-specifikus hipermetiláció jellemezte [37]. Ez utóbbi jelenség elsősorban jelátviteli útvonalak, illetve sejt adhéziót szabályozó gének fokozott metilációjában nyilvánult meg (például *CDKN2B*, *CALCA*). A gén-specifikus hipermetiláció gyakrabban figyelhető meg t(4;14) pozitív betegekben, ahol a hiszton metilációjának szabályozásában résztvevő *MMSET* fokozott működése alakul ki a transzlokáció révén [20, 37].

A mielóma kialakulását és progresszióját vezérlő genetikai folyamatokat az 1. ábra foglalja össze. A leggyakoribb primer és szekunder genetikai abnormalitásokat az 5. táblázat sorolja fel, melyek közül a legjelentősebbek a következő alfejezetekben kerülnek bemutatásra.

1.3.1. Öröklött genetikai eltérések

Az 50 évnél idősebb betegek között az MGUS incidenciája 3%, a PCM előfordulása az afro-amerikai fekete populációban körülbelül kétszeres a kaukázusi fehérekhez képest, legalacsonyabb az ázsiai népcsoportokban [6]. Epidemiológiai vizsgálatok családi halmazódást is igazoltak. Mindezek alapján feltételezhető, hogy léteznek öröklött („germline”) predispozíciót eredményező genetikai variánsok. Mielómás beteg családtagjaiban 2-4-szer magasabb valószínűséggel jelenik meg a betegség (relatív rizikó, RR=2,1; 95% CI: 1,6-2,9), MGUS vonatkozásában is hasonló családi rizikó áll fenn (RR=2,1; 95% CI: 1,5-3,1) [38, 39]. Több ezer mielómában szenvedő betegen és egészséges egyénen elvégzett, genom-szintű egyedi nukleotid polimorfizmus (SNP) vizsgálatok 7 genetikai lókuszt érintettsége esetén igazoltak

betegséggel való asszociációt (2p23.3, 3p22.1, 3q26.2, 6p21.33, 7p15.3, 17p11.2 és 22q13.1), melyek együttesen a családi halmazódás rizikójának körülbelül 13%-áért felelősek, így további régiók szerepe is valószínűsíthető [20, 40]. Lehetséges irányítóként a *DNMT3A* (2p), *ULK4* (3p), *CDCA7L* (7p) és *CBX7* (22q) géneket azonosították, melyek eltérései más daganatokban is leírásra kerültek korábban [40]. Ugyanezen lókusztok érintettségét igazolták MGUS kialakulásának vonatkozásában is, mely azt sugallja, hogy ezek az aberrációk a korai tumorgenezis folyamatában játszhatnak szerepet [41]. Annak felderítése, hogy az abnormalitások pontosan milyen mechanizmusok révén fokozzák a mielóma kialakulásának kockázatát, még további vizsgálatokat igényel.

1.3.2. Számbeli kromoszóma aberrációk

A hiperdiploiditás egyéb B-sejtes malignus folyamatokban (például akut limfoblasztos leukémia) is észlelhető, azonban PCM-ben jellemzően a páratlan számú (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 és 21-es) kromoszómák érintettsége figyelhető meg [42]. A leggyakrabban, csökkenő gyakorisági sorrendben a 9, 15, 19, 5 és 3-as kromoszómák triszómiái fordulnak elő [43]. A triszómiákból adódó hiperdiploiditás primer citogenetikai aberrációnak tekinthető, mivel a betegség korai fázisaiban is már kimutatható a domináns klónban. Kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, az általánosan elfogadott hipotézis szerint nem sorozatos események okozzák, hanem egyetlen „katasztrofális” mitózis során végbemenő kromoszóma szegregációs hiba eredményezi [20, 44]. Biológiai hatását tekintve az érintett betegek egy csoportjában sejtproliferációt szabályozó gének, úgymint IL-6 és HGF fokozott expressziója mutatható ki, másokban anti-apoptotikus hatást eredményező TNF/NF κ B jelátviteli útvonalat szabályozó gének módosulása jelentkezik [45]. Primer *IGH* transzlokációkkal való együttes előfordulása a betegek csekély részében (max. 10%) észlelhető, szekunder aberrációkkal (jellemzően *MYC*-transzlokáció, 17p hiány) azonban gyakran mutat együttes előfordulást, különösen a progrediáló esetekben.

A hiperdiploid betegek prognózisa ugyan rosszabb a normális kariotípussal rendelkezőkénél, de jobb, mint a hipodiploid (<45 kromoszómát hordozó) betegeké [46], bár az egyes tanulmányokat tekintve ezek az adatok nem mutatnak egységes képet. Amennyiben egyéb magas rizikójú eltéréssel (pl. del(17p), t(4;14), +1q) kombináltan észlelhető a hiperdiploiditás, a kimenetel már kevésbé kedvező, igaz jobb

annál, mintha ezek hiperdiploiditás nélkül fordulnának elő. A hiperdiploiditás kedvező prognosztikai hatása egyes irodalmi adatok alapján a 3-as és/vagy az 5-ös kromoszómák triszómiáinak köszönhető. Ezzel ellentétben a 21-es triszómia jelenléte több tanulmányban is kedvezőtlenebb túlélési eredménnyel társult [18, 47].

1.3.3. Kromoszóma transzlokációk

1.3.3.1. IGH gént érintő transzlokációk

Primer *IGH* transzlokációk esetében öt fő partner gén/lókuszt (*CCND1*-11q13, *FGFR/MMSET*-4p16, *c-MAF*-16q23, *MAFB*-20q11, *CCND3*-6p21) visszatérő érintettsége figyelhető meg, melyek az átrendeződés következtében az *IGH* (14q32) gén promoterének fokozott enhanszer hatása alá kerülnek [16, 20, 22]. Nem kizárólagosan, de többségében kiegyensúlyozott transzlokációkról van szó, melyek célzott kimutatásához az iFISH alkalmazása terjedt el széleskörben. A módszer a konvencionális citogenetikai vizsgálathoz képest gyorsabb, nagyobb érzékenységgel vizsgálható, tesztelhető, fokozottabb eredményességgel.

t(11;14)

A t(11;14)(q13;q32) a leggyakrabban előforduló, kiegyensúlyozott *IGH* transzlokáció, mely a betegek 15-20%-ában mutatható ki [16, 22]. Hatására a *CCND1* génnek – normális érett B-sejtekre nem jellemző – fokozott expressziója alakul ki, melynek következtében a mielómás sejtek G1-ből S fázisba kerülnek [48]. Morfológiailag limfoplazmociták jellegű és CD20-pozitivitás jellemző rá, klinikailag ebben a csoportban gyakoribb a λ-könnyűlánc érintettsége, illetve az amiloidózis kialakulása.

Hagyományosan jó prognózist jelentő eltérésnek tartják, de a vizsgálatok egy részében ez a megfigyelés a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el. Az érintett betegek egy kisebb alcsoportjában (kb. 10%) a *CCND1* gén egyidejű aktiváló mutációját is észlelték WES vizsgálat során, ami progresszív lefolyással, plazmasejtes leukémiával, kedvezőtlen klinikai kimenetellel társult [49]. Prognózis szempontjából az eltérés így összességében neutrálisnak vagy standard rizikójúnak tekintendő [16, 28].

t(4;14)

A t(4;14)(p16;q32) mielőmára nézve specifikus. A 4p16 lókuszon lévő növekedési faktor receptor *FGFR3* és a hiszton metilációban szerepet játszó *MMSET* fokozott expresszióját eredményező átrendeződés diagnózis idején iFISH vizsgálattal az esetek kb. 15%-ában mutatható ki. A töréspont a két gén között van, melyek közül az onkogenezis szempontjából az *MMSET* domináns szerepe feltételezhető, mivel az esetek 30%-ában a transzlokáció kiegyensúlyozatlan és *FGFR3* expresszió nem igazolható [50, 51]. Az *MMSET* fokozott működése számos gén – pl. *CCND2* – regulációját befolyásolja.

Klinikailag jellegzetes az IgA-mielómával való társulása és agresszív, rövid remissziós időszakokkal jellemzett gyors kórlefordulása, mely alapján az IMWG R-ISS *staging* rendszere a magas rizikójú eltérések közé sorolja [19], igaz a proteaszóma gátlók alkalmazása jelentősen javított az érintett betegek túlélési eredményein [52]. Ezt figyelembe véve a Mayo-klinika rizikó-stratifikáló rendszere (mSMART) inkább intermediér rizikót hordozó eltérésként tartja számon [21]. A t(4;14) gyakran egyéb abnormalitással társultan észlelhető, melyek közül némelyik enyhíti (pl. 5-ös triszómia), más fokozza kedvezőtlen hatását (pl. del(17p), +1q, del(1p), így szerepét a társuló eltérések figyelembe vételével kell értékelni [18, 53].

Ritka visszatérő *IGH* transzlokációk: t(6;14), t(14;16), t(14;20)

A 6p21 lókuszon a *CCND3* fehérje direkt expresszió fokozódása vezet a tumor kialakulásához. A transzlokáció alacsony incidenciája (kb. 2%) miatt prognosztikus jelentősége nehezen megállapítható, de hagyományosan standard eltérésnek tekintett [16]. A 16q23 lókuszt érintő átrendeződéssel a *c-MAF*-gén, a 20q11 érintettségével a *MAFB* onkogén aktivációja alakul ki. Előbbi vonatkozásában 4-5%-os, utóbbinál kevesebb, mint 1%-os előfordulással számolhatunk. Bár a t(14;16) abnormalitás ritka eltérés, plazmasejtes leukémiában gyakrabban észlelhető (PCL sejtekből képzett humán mielóma sejtvonalaknál akár 25%-os előfordulása is észlelhető [54]), így az IMWG R-ISS rendszere magas rizikójú aberrációként értékeli [19]. Mind a *MAF*, mind a *MAFB* fokozott expressziója *CCND2* aktivációt eredményez.

1.3.3.2. *MYC* onkogént érintő transzlokációk

A 8q24 lókuszs abnormalitásai nem ritkák mielőmában, génexpressziós vizsgálatok a *MYC* onkogén gyakran fokozott kifejeződését igazolták. Ez a jelenség a gén mutációja, amplifikációja mellett transzlokációk révén is kialakulhat [55, 56]. Ezek az

átrendeződések CSR-től függetlenül jönnek létre. A leggyakoribb partner régiók az immunglobulin nehéz-, illetve könnyűláncok lokuszai a 14-es, 22-es ill. 2-es kromoszómán (*IGH* - 16,5%, *IGL* - 16,5%, *IGK* - 6%, rendre), de emellett az 1-es, 6-os és X kromoszómák is visszatérően érintettek lehetnek, melyek által a *MYC* superenhanszerként funkcionáló gének (pl. *FAM46C*, *XBPI*, *FOXO3*, *BMP6*) hatása alá kerül [28, 56, 57].

A *MYC*-aberrációk másodlagosan kialakuló eltérések, MGUS-ban, SMM-ben ritkán (3-4%) észlelhetők, PCM-ben viszont már az esetek 15-20%-ában detektálhatók diagnóziskor [55]. Relabált/refrakter esetekben még magasabb incidencia is előfordul [57]. Leginkább nem-hiperdiploid mielómában észlelhető, t(4;14) eltéréssel jellemzően ritkán kombinálódik. Jelenléte agresszívebb kórlefyással, gyakran extramedulláris betegséggel társul, kedvezőtlen prognózist hordoz mind a PFS, mind az OS vonatkozásában [57].

1.3.4. DNS kópiaszám eltérések

Az előzőekben tárgyalt kiegyensúlyozatlan primer eltérések (triszómiák, 14-es monoszómia) mellett szekunder jellegű kópiaszám változással járó aberrációk is visszatérően megjelennek mielómában. A teljes kromoszómákat érintő abnormalitások mellett szubkromoszómális többletek/amplifikációk, illetve deléciók is mutatkoznak. Vizsgálatuk a klinikai diagnosztikában szintén elsősorban iFISH módszerrel történik. A szondák célzottabb tervezésével a minimálisan érintett régiók mérete egyre jobban körülhatárolható, de a patomechanizmusban lényeges szerepet játszó gének azonosítása számos aberráció kapcsán még további részletes vizsgálatokat igényel. Általánosságban elmondható, hogy deléciók esetén tumor növekedést gátló szuppresszorok, amplifikáció esetén proliferációt serkentő gének érintettsége valószínűsíthető. Kópiaszám nyereség leggyakrabban az 1q, 5q, 9q, 11q, 15q, míg veszteség az 1p, 6q, 8p, 13q, 16q, 17p kromoszóma karokra lokalizálódik [16, 20, 40, 43].

1.3.4.1. 13-as kromoszóma abnormalitások: 13-as monoszómia és 13q deléció

Az egyik leggyakoribb eltérés diagnózis idején, az esetek közel 50%-ában mutatható ki, jellemzően nem-hiperdiploid mielómához társul [16]. Bár MGUS-ban és SMM-ben valamivel ritkább az előfordulása, ezekben a korai stádiumokban is gyakran

klonálisan észlelhető. Ez alapján a betegség korai fázisában akvirált aberrációnak tartható, primer vagy szekunder jellegéről eltérő irodalmi adatok állnak rendelkezésre [16, 28]. Az esetek 85%-ában a teljes kromoszóma vesztese (13-as monoszómia) fordul elő, így kariotipizálás is egyértelműen detektálhatja [58], a fennmaradó 15%-ban azonban intersticiális deléció áll a háttérben, mely kromoszóma sávozási módszerrel nehezebben mutatható ki [59]. A deléció által minimálisan érintett lókuszt a 13q14.11-13q14.3 régióra lokalizálódik, mely 68 gént tartalmaz (többek között az *RBI*, *EBPL*, *RCBTB2*, valamint a *mir-16-1* és *mir-15a* mikroRNS géneket) [28]. Az, hogy a fentiek közül valójában melyik is a patogenetikus eltérés, intenzíven vizsgált kérdés. A legelfogadottabb hipotézis szerint a tumor szuppresszor *RBI* gén vesztese a meghatározó, azonban legtöbbször csak monoallélikus deléció igazolható, a másik allél mutációja ritka jelenség. További potenciális géneként a *DIS3* exoszóma endoribonukleáz szerepe merül fel, melynek a kópiaszám változás által nem érintett allélon való mutációja az újonnan diagnosztizált PCM esetek 10%-ában mutatható ki, 75%-ukban del(13q) fennállása mellett, ami magyarázná a biallélikus 13q funkcióvesztést [22].

A 13q deléciót korábban kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek tartották, azonban más kedvezőtlen citogenetikai eltérésekkel való szoros asszociációja megnehezíti önálló prognosztikus szerepének megítélését. A t(4;14) pozitív esetek 90%-ában alakul ki 13q hiány is, a jelenlegi nézet szerint iFISH-sel kimutatva nem önálló kedvezőtlen prognosztikus marker, csupán kiegészítő jelzője további kedvezőtlen citogenetikai aberrációk jelenlétének [16].

1.3.4.2. 17p deléció

Kedvezőtlen prognosztikai eltérés, mely az újonnan diagnosztizált esetek 7-10%-ában, relabált vagy refrakter mielómában viszont akár 80%-ban is kimutatható. Korai stádiumokban (MGUS) nem jellemző előfordulása, PCL-ben, EMD-ben viszont gyakran klonális megjelenése észlelhető, mely alátámasztja a betegség progressziójában betöltött meghatározó szerepét [16].

Legtöbbször a 17-es kromoszóma teljes rövid karjának deléciója alakul ki, a minimálisan deletált régió a 17p13 lókuszt tehető, mely a *TP53* tumor szuppresszor gént tartalmazza. A *TP53* delécióval jelentős genomikai instabilitás alakul ki a DNS-károsodásra adott normális protektív sejtprogramok (DNS-repair, apoptózis, sejtciklus

leállás) károsodása révén, ami további citogenetikai aberrációk megjelenését segíti az érintett klónban. A másik allél szimultán mutációja 30-40%-ban figyelhető meg 17p deléció esetén, ennek hiányában jóval ritkább [28]. Ez azt is jelenti, hogy az esetek 60-70%-ában eltérő gén/gének felelőssége is felmerül. Ezek azonosításában új-generációs szekvenálás (NGS), illetve egyéb nagy felbontású módszerek segíthetnek a jövőben.

A del(17p) negatív prognosztikus szerepét számos vizsgálat igazolta [60-62]. Jelenléte mind PFS, mind OS szempontjából kedvezőtlen kimenetellel párosul, agresszív, gyors betegségfolyás, illetve extramedulláris manifesztációk gyakori kialakulása jellemző. Valamennyi rizikó stratifikáló rendszer magas rizikót hordozó aberrációként kezeli, bár vannak irodalmi adatok arra vonatkozóan is, hogy kedvezőtlen hatása csak 60%-ot meghaladó klonális érintettség, illetve biallélikus aberráció esetén szignifikáns mértékű [60, 62].

1.3.4.3. 1-es kromoszóma abnormalitások: 1q többlet és 1p deléció

Az 1-es kromoszóma hosszú karjának többlete gyakori jelenség, az újonnan diagnosztizált esetek 35-40%-ában észlelhető. Az általában a teljes hosszú kar számfeletti kópiáját eredményező eltérés feltehetőleg az 1q12 pericentromerikus régióban lévő töréspontnál jön létre, jellemzően jumping transzlokáció révén. A minimálisan amplifikált régió az 1q21.1-1q23.3 lókuszekben mutatkozik, mely 679 gént tartalmaz [63]. Az aberrációban érintett kromoszóma régió kiterjedt méretéből adódóan egyelőre nem tisztázott, hogy pontosan melyik gén fokozott expressziója felelős elsődlegesen a biológiai hatásért, a legtöbb tanulmány a *CKS1B* gén szerepét hangsúlyozza, bár további potenciális gének meghatározó szerepe sem zárható ki (pl. *ANP32E*, *BCL9*, *PDZK1*) [20].

Az 1q többlet gyakran együtt észlelhető más magas rizikójú eltérésekkel (pl. t(4;14), 1p hiány, 17p hiány), így önálló prognosztikus jelentősége nehezen határozható meg, de a legtöbb vizsgálatban kedvezőtlen prognosztikai markernek mutatkozott [63-65]. Egyes irodalmi adatok alapján az 1q többlet kedvezőtlen hatása dózis-függést mutat: 4 vagy több kópia esetén (amplifikáció) a túlélési eredmények rosszabbnak tűnnek a csak 3 kópiával rendelkező (nyerés) esetekhez képest [66].

Az 1-es kromoszóma rövid karját érintő deléció sok esetben együttesen jelentkezik a hosszú kar eltéréssel, szintén gyakran pericentromerikus töréspontnál végbemenő kromoszóma törés révén. Az újonnan diagnosztizált esetek kb. 25%-ában

detektálható, sok esetben 1q többlettel, hipodiploiditással, t(4;14) transzlokációval és del(17p) abnormalitásokkal társulva. Alapvetően kedvezőtlen prognosztikai markernek tekintett, egy közel 1200 beteget vizsgáló tanulmányban mind a PFS, mind az OS vonatkozásában önálló független paraméterként rontotta a várható kimenetelt [67]. Az még nem teljesen tisztázott, hogy az aberráció által mely gének kópiaszám csökkenése áll a kedvezőtlen kórlefordulás háttérében, az 1p12 régióban kódolt ciklindependens kináz gátló *CDKN2C* és az apoptózis indukáló *FAF1*, valamint az 1p32.3 lókuszon a tumor-szuppresszor hatású *FAM46C* a legvalószínűbb célpontok [28].

1.3.5. Szerzett mutációk

Az új-generációs szekvenáláson alapuló módszerek megjelenésével a teljes genom, illetve a teljes exom nukleotid felbontású vizsgálatai is elérhetővé váltak, mely nagymértékben segítette a PCM genetikai háttérének alaposabb feltérképezését. Egy 2015-ben publikált tanulmányban 463 immunmoduláns-alapú kezelésben részesült, újonnan diagnosztizált mielómás (NDMM) betegen végeztek WES vizsgálatot és értékelték az eltérések túlélést befolyásoló hatásait [68]. Az *IGH* transzlokációkban érintett *CCND1* és *FGFR3* gének szimultán mutációja (12% és 17%, rendre) mellett a genom kódoló régióiban további visszatérő mutációkat azonosítottak, melyek jellemzően 2-3 jelátviteli útvonal vagy DNS-repair szempontjából fontos génekre korlátozódtak, alátámasztva ezen folyamatok kiemelkedő szerepét a mielóma kórlefordulásában. A mutációk lehetnek aktiváló vagy szuppresszor jellegűek, de közös vonásként a mielóma sejt proliferációját vagy túlélését fokozzák. Leginkább szekunder, szubklonálisan előforduló, progressziót vezérlő „*driver*” mutációk.

A leggyakoribb mutációk a MAPK jelátviteli útvonalat érintik, a *KRAS*, *NRAS* és *BRAF* génekben fordulnak elő, együttesen az esetek közel 50%-ában mutathatók ki (21%, 19%, 6% rendre) [68], viszont sem a PFS-t, sem az OS-t nem befolyásolják kedvezőtlenül. A BRAF V600E pontmutáció – bár nem gyakori jelenség – jelentőségét az adja, hogy kimutatása célzott BRAF gátló vemurafenib terápiát tehet lehetővé [69].

Az NFκB jelátviteli útvonal aktiváló mutációi szintén visszatérően, az NDMM esetek kb. 20%-ában észlelhetők anti-apoptotikus hatásban manifesztálódva. A leggyakrabban érintett gének a *TRAF3* (14q32), *CYLD* (16q), *BIRC2* és *BIRC3* (11q), *LTB* (6p21) és az *IKBKB* (8p11). A betegek túlélését azonban ezek a mutációk nem feltétlenül csökkentik [68].

A DNS-repair folyamatában szerepet játszó *TP53*, *ATM* és *ATR* gének szomatikus mutációi a PCM-es betegek kb. 15%-ban fordulnak elő diagnóziskor. A *DIS3* (13q) és *FAM46C* (1p) inaktiváló mutációi kb. 10-10%-ban detektálhatók, tumor szuppresszor hatásuk feltételezhető [20, 28, 68].

További, elsősorban a B-sejt differenciálódás folyamatát irányító gének mutációi is visszatérően kimutathatók PCM-ben. A transzkripció gátló *IRF4* és *PRDM1* (más néven *BLIMP1*) mutációi együttesen 10%-ban fordulnak elő. Az *IRF4* gén mutációjának jelenléte a betegek túlélési eredményeit kedvezően befolyásolja [68].

Az új-generációs szekvenáláson alapuló módszerek jövőbeli szélesebb körű alkalmazásával feltehetően tovább bővül majd az érintett gének listája, azonosításuk esetleges terápiás célpontokat is felfedhet a jövőben.

1.3.6. Genetikai heterogenitás és klonális evolúció

A PCM genetikailag heterogén betegség, mely a betegek közötti eltérő genomikus háttér mellett egy adott beteg mielómás sejtjeinek sokféleségében is megnyilvánul. A korábbi, hagyományos citogenetikai módszerekkel végzett vizsgálatok eredményei részben már felfedték az egyes betegek sejtpopulációinak változatosságát, ennek mértékéről azonban jóval pontosabb képet nyújtanak a modern, főleg új-generációs szekvenáláson alapuló molekuláris technikák. A genetikai eltérések típusaikban és az érintett sejtek mennyiségében is eltérést mutatnak a tumoron belül. Bizonyos aberrációk minden mielómás sejtben jelen vannak – így klonálisnak tarthatók –, más eltérések a kóros sejtek csak egy részét érintik, azaz szubklonálisak. A genetikai komplexitás már a daganat kialakulásakor, MGUS-ban is észlelhető [32], a betegség progressziójával pedig tovább fokozódik. Újjonnan diagnosztizált PCM esetekben WES módszerrel átlagosan 5 szubklón párhuzamos jelenlétét igazolták, melyek a közös klonális jellegek mellett (leggyakrabban primer aberrációk) változatos szekunder genetikai eltérésekben különböztek egymástól [28]. Ezen felül ugyanazon beteg különböző anatómiai lokalizációiból aspirált mintáiban is eltérhet a szubklonális összetétel, ami eltérő mikrokörnyezeti hatásra bekövetkező térbeli heterogenitásra utal [70].

A betegség progresszióját random módon megjelenő és a determinisztikus szelekció hatására fennmaradó genetikai aberrációk vezérlik (*driver* mutációk),

melyek az érintett sejtpopulációk eltérő biológiai viselkedését eredményezik. Az a szubklón „viszi” tovább a betegséget, amelyik proliferációs készsége, mikrokörnyezettel való kapcsolata és apoptózis gátláson keresztüli túlélési készsége kapcsán szelektációs előnyt nyer a mutációk által. A klonális evolúció ezen darwini jellege más daganatokhoz hasonlóan mielómában is megfigyelhető [71, 72]. Az alkalmazott terápia további szelektációs tényezőként alapvetően befolyásolhatja ezt a folyamatot, a szenzitív klónok háttérbe szorulhatnak, teret adva az adott kezelésre rezisztens sejtcsoport proliferációjának. Ez a klonális ár-apály jelensége, melyet a szekvenciális terápia megtervezésénél fontos szem előtt tartani.

Az említett biológiai törvényszerűségeket figyelembevéve több, klinikailag releváns következtetés is megállapítható: 1. kombinációs terápiától fokozottabb hatékonyság várható, mivel több támadásponttal több klón vehető célba; 2. egy korábban effektív terápia a kezelési szekvencia későbbi fázisában újra hatékony lehet, a klonális összetétel változásának függvényében; 3. a változó klonális összetétel miatt a genetikai vizsgálatokat nem elég egyszer, hanem minden progresszió esetén ajánlott újra elvégezni visszatérő szekunder eltérések irányában.

A teljes exom szekvenálási vizsgálatok a legtöbb mutáció vonatkozásában mind klonális, mind szubklonális előfordulást kimutattak. Bizonyos aberrációk gyakrabban mutathatók ki klonális formában, mint szubklonálisan (pl. del(17p), del(1p), mely alapján a progresszió korábbi szakaszában gyanítható a jelentőségük, emellett arra is utalhatnak, hogy erősebb túlélési szignált hordoznak a sejtek számára. Más abnormalitások jellemzően szubklonálisan észlelhetők (pl. *FAM46C*), mely alapján kialakulásuk a kórlefolyás késői fázisában valószínűsíthető [28].

1.4. A mielóma genetikai és transzkriptomikai vizsgálómódszerei

Az előző fejezetben említett sajátosságok értelmében a mielómához társuló genetikai eltérések átfogó és alapos felderítése komoly prognosztikus és terápiás jelentőséggel bír. A számos abnormalitás kimutatása azonban – az eredmények megfelelő együttes értékelése mellett – komoly diagnosztikus kihívást jelent. A genetikai abnormalitásokat vizsgáló módszerek az analizált régiók számában és méretében, feloldó képességükben, szenzitivitásukban jelentős variabilitást mutatnak, mely részben magyarázza ugyanazon abnormalitás különféle tanulmányokban megfigyelt,

eltérő incidencia adatait. A modern módszerek (pl. DNS-microarray, NGS) átfogóan, nagy felbontással képesek a genom eltéréseit vizsgálni, ezáltal egyre több régió aberrációját igazolva hozzájárultak a plazmasejtes betegségek genetikai heterogenitásának és komplexitásának feltérképezéséhez, finanszírozási korlátok miatt azonban nem egységesen elérhetőek. Széleskörű hazai alkalmazásuk ma még nem reális elvárás, így a klasszikus módszereknek továbbra is van létjogosultsága. A következőkben röviden áttekintjük a mielóma diagnosztikájában legmeghatározóbb szerepet játszó genetikai és transzkriptomikai módszerek jellemzőit.

1.4.1. Konvencionális citogenetika

A kromoszóma G-sávozás közel 50 éve alkalmazott módszer. A metafázisban lévő sejtek analízise több (átlagosan 2-6) napos speciális stimulációs körülmények között történő *in vitro* sejtenyésztést követően végezhető el, az egyes kromoszómák speciális festési eljárás (Giemsa-sávozási technika) után analizálhatók. A módszer időigényes, továbbá a minta előkészítése, kiértékelése nagy gyakorlatot és szakértelmet kíván, így az eljárás teljes egészében nem igazán automatizálható.

Mielómában a konvencionális citogenetika alkalmazhatóságát alapvetően korlátozza a csontvelői aspirátum plazmasejtjeinek alacsony mitotikus aktivitása, melynek következtében a mintában jelen lévő nem neoplastikus vérképző szervrendszeri sejtek gyakran túlnövik a mielóma sejteket a tenyésztés során, melynek következtében sokszor nem kapunk reprezentatív eredményt. A 20 értékelhető metafázis kinyerését a plazmasejtek preparálás során bekövetkező sérülése is korlátozza. A módszer ugyan lehetőséget ad a teljes kromoszóma készlet egyedi sejt szintű vizsgálatára – és ezáltal a klinikai diagnosztikában elterjedt egyéb célzott vizsgálatokkal le nem fedett régiókról is nyerhetünk információt –, azonban 3-10 megabázisos feloldóképességéből adódóan kisebb kromoszóma régiókat érintő eltérések gyakran rejtve maradnak. Mindezekből következően ezzel a módszerrel az NDMM esetek csupán 30%-ában nyerhető értékelhető eredmény [40], aneuploiditás és kedvezőtlen klinikai kimenetellel társuló komplex kariotípus [73] kimutatása mellett esetleges terápia hatására bekövetkező mielodiszplázia igazolásában segíthet [35].

1.4.2. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

A módszer a konvencionális kariotipizálástól eltérően nem igényel sejtenyésztést, interfázisban lévő sejteken is elvégezhető. Bár az iFISH a PCM-re jellemző, gyakran komplex módon jelentkező citogenetikai aberrációk teljes genomot átfogó vizsgálatára nem alkalmas, számos kariotipizálással kimutathatatlan eltérést képes nagyszámú sejtben detektálni fokozott feloldóképességének köszönhetően. A 100 kilobázistól 1 megabázisig terjedő régiókat lefedő, fluoreszcensen jelölt szondákkal 24 órán belül eredményt adva, egyedi sejt szinten analizálhatók a prognózis becslés szempontjából legfontosabb kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan eltérések. Ennek köszönhetően a mindennapi diagnosztikában ez a standard módszer terjedt el, elérhetősége minden mielóma centrumban alapkövetelmény [74].

A vizsgálat hatékony elvégzésének egyik legfőbb akadály a csontvelői aspirátum alacsony plazmasejt tartalma (ez különösen MGUS-ban jelent gondot), melyen a minta specifikus (CD138-alapú) mágnesgyöngyös dúsításával lehet javítani [74]. A szondák által lefedett régió belüli strukturális változások, kisebb deléciók álnegatív eredményhez vezethetnek. További hátránya, hogy csak ismert régiók célzott analizására használható, spektrális detektálási korlátai miatt pedig egy reakcióban egyszerre csak 2-3 különböző színű szondával jelölt lókuszt vizsgálható. Több régiót célzó vizsgálatok elvégzését a rendelkezésre álló minta rendszerint alacsony mennyisége korlátozza.

Az IMWG által javasolt R-ISS rizikó besoroló rendszer a del(17p), t(4;14) és t(14;16) *high-risk* eltérések iFISH-sel történő vizsgálatát követeli meg, de ajánlásukban megjegyzik, hogy – tekintettel az egyre halmozódó bizonyítékokra – egyéb rizikót befolyásoló eltérések (úgy mint +1q, del(1p), +21 mint kedvezőtlen és +5, mint kedvező aberráció) vizsgálata is lehetőség szerint elvégzendő [17].

1.4.3. DNS microarray

Az array-alapú összehasonlító (comparative) genomiális hibridizáció (aCGH) során mikrochipeken rögzített egyszálú ismert oligonukleotidokhoz az analizált minta plazmasejtjeiből, illetve normális sejtből kinyert denaturált DNS-ek hibridizációs versengését vizsgálják. A két különböző forrásból származó DNS eltérő fluoreszcens festéssel van jelölve, a betegminta általában zöld, a normál kontroll minta piros színnel. Az analizált mintában az adott szakasz deléciójára vagy amplifikációjára a

detektált festékszín spektrum eltolódásából lehet következtetni. A módszer alkalmas a teljes genom 100 kilobázisnyi szakaszainak kópiaszám változással járó aberrációinak átfogó vizsgálatára. Kiegyensúlyozott genomikus eltérések (pl. *IGH* transzlokációk) kimutatására azonban nem alkalmas, így iFISH vizsgálattal kiegészítve alkalmazható PCM-ben. Rutin diagnosztikában nem elterjedt módszer, de segítségével a patogenezis és progresszió szempontjából fontos új genomikus régiók váltak ismertté.

A microchipekhez allél-specifikus oligonukleotidokat rögzítve a módszer egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) átfogó analizésére is alkalmas hasonló felbontással. Egy 2009-ben publikált tanulmányban 192 beteg mintáját vizsgálták SNP-array-vel, és 98%-ukban találtak kópiaszám változással járó eltérést. A leggyakoribb teljes kromoszómát érintő aberrációk a -13 (45%), +19 (43%), +9 (42%), +5 (38%) voltak, míg a +1q (31%), del(16q) (28%), del(1p) (24%), del(14q) (23%) jelentkeztek leggyakoribb szubkromoszómális eltérésként, melyek közül a del(1p) és del(12p) önálló kedvezőtlen, a +5 önálló kedvező prognosztikus hatással bírt [36].

1.4.4. Génexpressziós analízis

A DNS-ben bekövetkezett változások RNS-szintű kifejeződésének vizsgálatával akár több száz gén adott időpontban meghatározott relatív aktivitása analizálható kontroll mintákkal való összehasonlítást követően. Microarray-k alkalmazásával a teljes transzkriptum vizsgálata is lehetséges, mellyel a patogenezist, sejtproliferációt, tumoros propagációt szabályozó folyamatokat, vagy akár klinikai viselkedésükben jól elkülönülő betegcsoportokat jellemző sajátos génkifejeződési profilok határozhatók meg. A University of Arkansas munkacsoportja például egy 70 génből álló panel alkalmazásával a magas rizikójú betegekre jellemző, sajátos génkifejeződési profilt azonosított [64]. Egy másik tanulmányban egyéb klinikai szempontok alapján azonosított különböző betegcsoportokban tudtak eltérő profilt meghatározni: az ún. proliferációs csoportban például a sejtosztódásért felelős – jellemzően az 1-es kromoszóma hosszú karján lévő – gének magas kifejeződését találták, mely az érintett betegek kedvezőtlenebb klinikai kimenetelével társult. Egy másik, klinikailag megtartott csontszerkezettel jellemezhető „low-bone” csoportban jellemzően magas endothelin-1 és alacsony Dickkopff-1 expresszió volt igazolható, ami kedvezőbb kórlefordítással társult [75].

Fokozott költségigénye miatt ez a módszer megjelenését követően nem terjedt el széleskörben a hazai klinikai diagnosztikában.

1.4.5. Multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció (MLPA)

A módszerrel normál kontroll régiókhoz viszonyítva félkvantitatív módon, exon szintű feloldással vizsgálhatók DNS kópiaszám eltérések. A protokollban alkalmazott multiplex polimeráz-lánreakció (PCR) révén nem magát a vizsgált DNS szakaszt, hanem az ahhoz hibridizált 2 vagy 3 oligonukleotid szakaszból ligáció révén létrejövő, 60-80 bázispárnyi fluoreszcensen jelölt szondákat amplifikálunk. A módszer specificitását az adja, hogy az oligonukleotidok összekapcsolása csak tökéletes illeszkedés és hibridizáció esetén jön létre az alkalmazott ligáz-65 enzim fokozott érzékenysége miatt. A betegminta normál kontrollhoz viszonyított kópiaszámára a keletkezett, két eltérő forrásból származó PCR termék relatív mennyiségéből lehet következtetni: deléció esetén kevesebb, nyereség esetén több PCR-termék keletkezik. A módszer egyszerre 50-60 régió párhuzamos vizsgálatát teszi lehetővé. Az egyes szondák termékei a *primer* párokhoz kapcsolt szondaspecifikus toldalék szekvenciák ismert, eltérő hossza alapján választhatók szét kapilláris elektroforézissel, mennyiségi meghatározásuk pedig fluoreszcens intenzitás mérés alapján történik [76-77].

A viszonylag egyszerű, kis minta mennyiséget (50 nanogramm) igénylő, nem túl magas költségű módszer nagy felbontással képes az iFISH-nél jóval több régió célzott kópiaszám változásaival járó eltéréseiről 24 órán belül információt szolgáltatni. A teljes genom átfogó vizsgálatát, kiegyensúlyozott aberrációk analízisét nem teszi lehetővé, emellett a hibridizációs szakaszon megjelenő, kópiaszám változással nem járó esetleges pontmutációk álnegatív eredményhez vezethetnek. A vizsgálat informatív elvégzéséhez minimum 20%-os tumorsejt tartalmú mintára van szükség. A módszer 2002-es első publikálása óta [76] számos hematológiai kórképben (pl. gyermekkori akut limfoblasztos leukémia, krónikus mieloid leukémia, krónikus limfoid leukémia, mielodiszpláziás szindróma, akut mieloid leukémia) nyert igazolást használatának létjogosultsága, elsősorban a visszatérő módon megjelenő citogenetikai aberrációk szűrésében [78-82].

1.4.6. Új-generációs szekvenálás

Az új-generációs szekvenálási technikák forradalmasították a molekuláris diagnosztikát a 2000-es évek derekán. A több százezer vagy akár több száz millió DNS-fragmentum párhuzamos szekvenálásával a humán genom, exom, epigenom és transzkriptum minden korábbinál átfogóbb és mélyrehatóbb analízise vált elérhetővé. A legelterjedtebb NGS módszer az Illumina cég által alkalmazott, szintézis alapú szekvenálás. Ehhez a vizsgálandó DNS vagy cDNS molekulákat feldarabolják, majd a fragmentumokhoz speciális adapter szekvenciákat kapcsolnak. Az egyes szekvenálási ciklusok során a reakcióelegyhez adják mind a 4 nukleotidot (A, C, G, T), melyek reverzibilisen kötött, eltérő fluoreszcens jelölést hordoznak. A megfelelő nukleotid beépülését követően a felesleges nukleotidok kimosásra kerülnek. A fluoreszcens jel leolvasását követően a jelölő anyaggal együtt a nukleotidhoz szintén reverzibilisen kötött termináló oldallánc is leválasztásra és kimosásra kerül, mely után a reakció a következő, hasonló ciklussal folytatódhat. A különböző könyvtár molekulák szekvenálási olvasatait (*read*-ek) a referencia genom szekvenciájához illeszthetők és ahhoz viszonyítva értékelhetők. Az így keletkezett hatalmas mennyiségű adat feldolgozása a párhuzamosan fejlesztett bioinformatikai szoftverek segítségével nem lenne lehetséges. Az NGS-sel számos kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan abnormalitás egyidejű azonosítására nyílik lehetőség, így az egyes eltérések önálló prognosztikus, terápia szempontjából fontos prediktív szerepéről az eddigieknél minden bizonnyal összetettebb, tisztább képet nyerhetünk majd a jövőben. Jelenleg a módszer magas költsége, komoly technikai feltételei egyelőre még korlátozzák széleskörű hazai elterjedését, ez azonban a szekvenálási költségek fokozatos csökkenésével valószínűleg megváltozik a jövőben.

1.5. Összegzés

1. A plazmasejtes mielóma heterogén klinikai viselkedésének hátterében komplex, mind térben, mind időben változatos genetikai eltérések állnak, melyek egyedileg jellemezhetik az egyes betegeket.
2. A számos genomikus módosulásnak köszönhetően egyetlen általánosan hatékony terápiás célpont mind a mai napig nem került azonosításra, jelenleg

a kombinációs kezelések preferáltak. Kérdéses, hogy egyetlen univerzális „csodafegyver” fellelése egyáltalán reális elvárás-e?

3. A jelenlegi hazai körülmények között széles körben alkalmazott laboratóriumi módszerekkel a PCM genetikai komplexitásának átfogó vizsgálata legtöbbször nem kivitelezhető, a fokozottabb szenzitivitású és feloldóképességű új-generációs módszerek elterjedését viszont jelenleg még financiaális okok korlátozzák.
4. A számos visszatérő aberráció szimultán, átfogó – és nem utolsó sorban költséghatékony – analízisére alkalmas, gyorsan eredményt szolgáltató vizsgáló módszerek a genetikai összetétel klonális evolúció miatt bekövetkező időbeli változásainak megismerésén túl az egyes eltérések komplex feltérképezéséhez, azok egymásra gyakorolt hatásának megismeréséhez is hozzájárulhatnak. Az így nyert információk, akár a betegek terápiáját is befolyásoló pontosabb prognosztikai stratifikációval segíthetik a klinikus munkáját.

2. Célkitűzés

A PCM-ben szenvedő betegek korszerű, ugyanakkor költséghatékony genetikai karakterizálásához nagyszámú kromoszómális lókuszcélzott analízise szükséges. Vizsgálataink során célként tűztük ki olyan módszerek tesztelését, mellyel ez a feladat a klinikai rutin diagnosztikában, a hazai lehetőségeket is figyelembe véve reálisan megoldható. Technikai jellegű tanulmányaink mellett a PCM patogeneziséhez társuló klonális evolúciós folyamatokat is terveztük vizsgálni az egyes betegekben azonosított kromoszómális aberrációk megjelenési sorrendjének meghatározásával. Végül, összesíteni kívántuk azokat a kariotipizálással, iFISH-sel és MLPA-val nyert adatainkat, melyeket Baranya és Tolna megye PCM-mel diagnosztizált betegeinek vizsgálata során nyertünk az elmúlt több mint egy évtizedben. Tanulmányainkat a régió és a hazai PCM diagnosztika hatékonyságának növelése iránti igény vezérelte.

2.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával

A PCM-ben megjelenő genetikai aberrációk közül számos DNS kópiaszám változással járó eltérésnek van prognosztikai jelentősége. A standard módszernek tekintett iFISH technika egyszerre legfeljebb 2-3 genomikus lókuszcélzott vizsgálatát teszi lehetővé, így a módszer alkalmazásával a betegek átfogó molekuláris citogenetikai karakterizálása és pontos prognosztikai besorolása csak számos, párhuzamos preparátum elkészítésével és kiértékelésével lenne elvégezhető.

Első technikai jellegű munkánk során ezért teszteltük az MLPA módszer hatékonyságát egy olyan szondakeverékkel, mely a PCM-ben jellemzően mutatkozó, DNS kópiaszám változással járó aberrációk analíziséhez 42 genomikus lókuszcélzott vizsgálatával teszi lehetővé. Az MLPA eredményeket összevetettük és validáltuk iFISH technikával nyert adatokkal, így fel tudtuk térképezni az MLPA módszer előnyeit és limitációit is.

2.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával

Az elmúlt években az új-generációs szekvenálás forradalmasította a genetikai vizsgálatokat, melynek kapcsán számos új alkalmazás került kidolgozásra. Ennek

nyomán jelent meg a digitális MLPA technika is, mely az MLPA és az NGS ötvözésével többszáz genomikus lokusz egyidejű analizisét teszi lehetővé.

Második, szintén technikai jellegű vizsgálatunk során teszteltük a digitális MLPA módszert PCM-ben szenvedő betegek diagnosztikai mintáiban megjelenő DNS kópiaszám eltérések felderítéséhez, az eredményeket pedig összevetettük hagyományos MLPA és iFISH vizsgálatokkal nyert adatokkal. A digitális MLPA előnyeinek és korlátainak meghatározása mellett a módszer által biztosított magas áteresztőképességet is teszteltük.

2.3. Pontmutáció specifikus kimutatása digitális MLPA technikával

DNS kópiaszám eltérések mellett az MLPA alkalmas ismert pontmutációk specifikus kimutatására is, amennyiben az MLPA sonda ligációs helye éppen a mutáció által érintett genomikus pozíciót fedi. A digitális MLPA-t korábban erre a célra még nem alkalmazták, ezért munkánk során teszteltük a módszer alkalmasságát a PCM-ben szenvedő betegek 4-10%-ában megjelenő, terápiás célpontként használható *BRAF*^{V600E} mutáció kimutatására.

2.4. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye PCM-ben szenvedő betegein

A jelenleg alkalmazott rutin diagnosztikai munkafolyamathoz legközelebb álló tanulmányunkban összesíteni kívántuk azoknak a rosszindulatú plazmasejtes kórképekben szenvedő betegeknek a molekuláris citogenetikai eredményeit, akiknek az elmúlt évtizedben diagnosztikus mintái érkeztek a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetébe Baranya, illetve Tolna megyéből. IFISH vizsgálatot a teljes beteg populáción végeztünk, MLPA adat a betegek közel egyötödénél állt rendelkezésre. A két különböző módszerrel nyert eredmények általános értékelése mellett, azok összehasonlító elemzésével fel kívántuk fedni az egyes technikák által nyújtott valós hozzáadott értékeket, mely a jövőben segítségül szolgálhat a diagnosztikai munkafolyamat még hatékonyabbá tételéhez.

2.5. Klonális evolúció vizsgálata egyedi sejt szinten

Míg a PCM-ben megjelenő genetikai aberrációk jelentős részének biológiai és prognosztikai jelentőségét folyamatosan vizsgálják a különböző, nagy betegpopulációkon végzett klinikai tanulmányok, az egyes eltérések időbeli megjelenésének sorrendjéről jóval kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre. A PCM patogenezisét kísérő klonális evolúciós folyamatokat egyedi sejt szinten vizsgáltuk iFISH módszerrel annak érdekében, hogy felderítsük az egyes abnormalitások megjelenési sorrendjét, illetve információkat nyerjünk a betegség patogenezisének korai szakaszában megjelenő aberrációknak a betegség iniciálásában betöltött lehetséges szerepéről.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Minták

Tanulmányainkba, döntően a Pécsi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájának Hematológiai Tanszékén, általunk rosszindulatú plazmasejtes megbetegedéssel, plazmacitómával, plazmasejtes mielómával, vagy plazmasejtes leukémiával diagnosztizált betegeket vontunk be, de kisebb számban szekszárdi illetve kaposvári centrumból érkezett betegmintákat is analizáltunk. A betegeket az Egészségügyi Világszervezet (WHO), illetve az IMWG ajánlásainak megfelelően diagnosztizáltuk. A minták szövettani, immunhisztokémiai, áramlási citometriai és genetikai vizsgálatait a Pécsi Tudományegyetem Pathológiai Intézetében történtek a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetével, illetve a Leiden University Medical Center Molekuláris Sejtbiológiai Intézetével kollaborációban. A betegek túlnyomó többségénél csontvelői aspirátumból származó setjszuspenziót vizsgáltunk, másoknál csontvelői kenet vagy crista biopsziás minta állt csak rendelkezésre, míg néhány plazmasejtes leukémiában szenvedő beteg esetén perifériás vért analizáltunk. Negatív kontrollként malignus betegségben nem szenvedő betegek, illetve egészséges önkéntesek csontvelő, illetve perifériás vérmintáit használtuk.

3.2. Plazmasejt arány meghatározás és plazmasejt dúsítás

Az immunfenotípusos karakterizálást ötszínű áramlási citometriával, CD45-PerCP-Cy5.5, CD19-PE-Cy7, CD38-FITC, CD138-APC és CD56-PE markerekkel végeztük (CyFlow® space, Partec GmbH, Münster, Németország). Ha az áramlási citometriás mérés a csontvelői aspirátumban 20% alatti plazmasejt arányt igazolt, a mintán plazmasejt dúsítást végeztünk CD138 antitesttel konjugált mágneses gyöngyökkel (BD™ IMag, BD Biosciences, San Jose, USA, illetve EasySep™, STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanada). Dúsítást követően a plazmasejt arányt a CD38/CD138 expresszió ismételt áramlási citometriás mérésével, vagy MUM1 immuncitokémiai reakcióval ellenőriztük.

3.3. Multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció

Az MLPA reakciókhoz SALSA P425-A1 szondakeveréket (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) használtunk a gyártó ajánlásának megfelelően. A szondakeverék 42 olyan szondát tartalmazott, amik PCM-ben visszatérően megjelenő aberrációk által érintett kromoszómális régiókra specifikusak, úgymint 1p32 (*FAF1*, *CDKN2C*, *PLPP3* és *DABI* gének), 1p21, 1q21.3 (*CKS1B* gén), 1q23.3, 5q31.3, 12p13.31, 13q14 (*RBI* és *DLEU1/DLEU2* gének), 16q12 (*CYLD* gén), 16q23 (*WWOX* gén) és 17p13 (*TP53* gén) (6. táblázat). A reakciókat Carnoy-oldattal fixált sejtekből izolált DNS mintákon végeztük. A polimeráz láncreakcióval képzett MLPA szonda termékeket ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, USA) kapilláris elektroforézis készülékkel szeparáltuk méretük alapján. Az elektroferogramok analízisét és a relatív kópiaszámok meghatározását GeneMarker v1.95 szoftverrel (SoftGenetics, State College, PA), illetve Coffalyser.Net szoftverrel (www.mlpa.com) végeztük. Genomikus többletet 1,3-nál magasabb, vesztést 0,7-nél alacsonyabb relatív kópiaszám esetén határoztunk meg, a minta áramlási citometriával mért tisztaságát is figyelembe véve. A MLPA protokoll általános folyamatát a 2. ábra mutatja be.

3.4. Digitális multiplex ligáció-függő szonda amplifikáció

Digitális MLPA vizsgálatainkhoz a PCM-ben jellemzően megjelenő genetikai aberrációk specifikus kimutatására tervezett, D006 szondakeveréket (lot szám: X1-0613, MRC-Holland) használtuk, 40ng kiindulási DNS mennyiséggel. A szondakeverék (i) 268 target specifikus, elsősorban visszatérő szubkromoszómális DNS kópiaszám eltérések detektálására fejlesztett szondát tartalmaz, ezenkívül (ii) egy szondát a *BRAF*^{V600E} mutáció specifikus kimutatására, (iii) 105 referencia szondát, melyek kópiaszám eltérések által jellemzően nem érintett régiókhoz hibridizálnak, valamint (iv) 128 belső kontroll szondát minta azonosítás és minőség ellenőrzés céljából (7. táblázat). A referencia szondák a nyert adatok normalizálását teszik lehetővé, illetve a target specifikus szondák egy részével együtt használva teljes kromoszómákat érintő eltérések azonosítását segítik, lefedve minden kromoszóma centromer és telomer közeli régióit, valamint a kromoszóma karok középső tartományát.

A digitális MLPA protokoll kezdő lépése a minta DNS egyedi minta azonosítókkal (*barcode*) való összekeverése, melyet a minta denaturációja, illetve a digitális MLPA szondák elegyhez adása követ. Minden szonda két vagy három oligonukleotidból áll, melyek a cél régió 25-50bp hosszúságú szakaszaihoz hibridizálnak, közvetlenül egymás mellé rendeződve. Tökéletes hibridizáció esetén az egymás mellett elhelyezkedő szondák ligálással összekapcsolhatók, melyet a ligáz-65 enzimmel végeztünk. Ezt követően denaturáltuk a szonda-minta hibrideket és a különböző szondákat egy univerzális primer párral felsokszoroztuk (amplifikáltuk), ezáltal olyan PCR termékeket (könyvtár) létrehozva, melyek bármely új-generációs Illumina szekvenálón megszekvenálhatók. Az egymástól függetlenül, egyedi reakciókban előállított mintaszpecifikus termékeket összekevertük (*pooling*), majd az így létrehozott könyvtár keveréket hígítottuk, denaturáltuk és MiSeq v3 standard flow cell-be töltve (Illumina), 115 bázispár hosszúságban megszekvenáltuk.

Az adatok értékelését az exportált FASTQ file-ok minőségellenőrzése előzte meg (FastQC), melyet a generált szekvencia részletek (*read*-ek) azonosítása követett. Ennek során az egyedi könyvtár molekulákból származó „*read*”-eket illesztettük az ismert digitális MLPA szonda szekvenciákhoz és meghatároztuk, hogy egy adott szekvenálási „*read*” melyik eredeti szondának, azaz genomikus lókusznak feleltethető meg. Az értékelés, melyhez egy MRC-Holland által fejlesztett, egyedi értékelő szoftvert használtunk, két egymást követő lépést foglalt magában: (i) az egyes mintákon belül minden egyes szondához tartozó *read* számot normalizáltuk a genom konzervatív, aberráció által tipikusan nem érintett régióhoz hibridizáló referencia szondák medián *read* számaihoz, majd (ii) az így kiszámolt relatív értéket szondánként összevetettük a referencia minták vizsgálata során nyert megfelelő értékekkel (minták közötti normalizáció). Aberráció által nem érintett, normál kópiaszámmal rendelkező genomikus lókusznál ez a végső relatív kópiaszám 1,0 közeli értéket vett fel (0,8 - 1,2), míg a normál tartományánál alacsonyabb vagy magasabb érték hiány (deléción), illetve többlet jelenlétére utalt. A relatív kópiaszám normál tartományának meghatározásához figyelembe vettük minden egyes szonda negatív kontroll (referencia) mintákban mutatott értékeit, a tartományt átlag $\pm 3SD$ módszerrel számoltuk. Ezenkívül az eredmények interpretálásakor figyelembe vettük a minta áramlási citometriával meghatározott tumorsejt tisztaságát is. Ha például a relatív kópiaszám 0,6-os értéket vett fel, monoallélikus vesztést határoztunk meg 80%-os tumorsejt tisztaság mellett, míg 40%-os tisztaság esetén biallélikus vesztésként

értékeltek az eltérést. Betegminták vizsgálatakor szubklonális kópiaszám eltérést azonosítottunk, ha több egymást követő szonda relatív kópiaszáma a normál tartományon kívül esett, de ezek az értékek nem érték el a mintában monoallélikus vesztes vagy nyeres következtében elvárt értékeket, mely utóbbiakat más távoli genomikus lókuszonál adott esetben detektáltunk is.

A *BRAF*^{V600E} mutáció kimutatására tervezett szonda oligonukleotidjai csak abban az esetben voltak összekapcsolhatók (ligálhatók), ezáltal a teljes szonda PCR termék formában kimutatható, ha a vizsgált mintában jelen volt a keresett pontmutáció. A digitális MLPA általános folyamatát a 3. ábra mutatja be, a laboratóriumi protokoll és bioinformatikai analízis részletes leírását Benard-Slagter és mtsai. közölték korábban [84].

3.5. Piroszekvenálás

A *BRAF* gén V600E mutációjának kimutatását 100ng kiindulási DNS mintát használva, PyroMark Q24 műszerrel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A gén 600-as kodonjának amplifikációját követően a biotinizált PCR termékeket Streptavidinnel konjugált gyöngyökhöz kapcsoltuk, melyeket izoláltunk és többszöri mosást követően denaturálással piroszekvenálásra alkalmas egyszálú DNS-t hoztunk létre. A reverz irányban végzett szekvenálás normál mintákban vad típusú CAC szekvenciát, *BRAF*^{V600E} mutáció esetén pedig CTC genotípust eredményez. A nyert adatokat PyroMark Q24 szoftverrel értékeltük.

3.6. Digitális droplet PCR

A *BRAF*^{V600E} mutáció jelenlétének magasabb érzékenységgű validálásához digitális droplet PCR-t (ddPCR) alkalmaztunk. Kiindulási anyagként 50ng DNS-t használva, kereskedelmi forgalomban elérhető *BRAF* specifikus assay-k segítségével vizsgáltuk a vad típusú (dHsaCP2000028) és mutáns (dHsaCP2000027) allélokot, a gyártó által javasolt protokollt követve. A dropleteteket QX200 Droplet Generátorral állítottuk elő, a detektálást QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) rendszerrel végeztük (Bio-Rad,

Hercules, USA). Az eredmények értékeléséhez a Bio-Rad QuantaSoft szoftvert használtuk, a *BRAF*^{mut} allél mennyiségét a mutáns DNS molekulák, valamint a mutáns és vad típusú DNS molekulák összegének hányadosaként határoztuk meg.

3.7. Fluoreszcenes *in situ* hibridizáció

Az interfázisban lévő sejtmagokon végzett iFISH vizsgálatok során fluoreszcens szondákkal vizualizáltunk olyan genomikus lókuszokat, melyek a plazmasejtes mielómában jellemzően megjelenő kromoszómális aberrációk által érintettek. Kétszínű jelöléssel vizsgáltuk a 13-as kromoszóma monoszómiáját, illetve hosszúkar delécióját (Vysis LSI D13S319 SO/13q34 SG szonda, Abbott Molecular Inc., Lake Bluff, USA), a 17-es kromoszóma rövid karján mutatkozó hiányt (deléciót) (Vysis LSI TP53 SO/CEP17 SG szonda), az *IGH* gént érintő átrendeződéseket (Vysis LSI IGH DC BA szonda), utóbbi pozitivitása esetén pedig három specifikus *IGH* transzlokációt, úgymint a t(4;14)(p16;q32) (*IGH-FGFR3/MMSET* génfüzió, Vysis LSI IGH/FGFR3 DC DF szonda), a t(11;14)(q13;q32) (*IGH-CCND1* génfüzió, Vysis LSI IGH/CCND1 XT DC DF szonda) és a t(14;16)(q32;q23) (*IGH-cMAF* génfüzió, Vysis LSI IGH/MAF DC DF szonda) átrendeződéseket. Az 1-es kromoszóma rövid karján jellemzően megjelenő hiányt, illetve a hosszú karon mutatkozó többletet kereskedelembe elérhető szondával (LSI 1q21 SG/ SRD 1p36 SO, Kreatech Diagnostics, Amszterdam, Hollandia) és korábban közölt protokoll alapján létrehozott [85], 1p32.2, 1p21 és 1q21 régiókra specifikus bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) alapú szondákkal vizsgáltuk. Az MLPA-val vizsgált betegek mintáin az MLPA technikával látott eltérések validációjaként analizáltuk az 5-ös kromoszóma rövid és hosszú karjainak eltéréseit is (Vysis LSI EGR1 SO/D5S23, D5S721 SG DC szonda). Az iFISH jelek mintázatát Zeiss AxioImager A1 mikroszkóppal (Carl Zeiss Technika Kft, Budapest) és háromdimenziós (3D) vizsgálatot is lehetővé tevő Zeiss AxioPlan2ie MOT motorizált citometriai műszerrel (Metasystems, Altlußheim, Germany) értékeltük az Európai Mielóma Hálózat ajánlásainak megfelelően. Minden minta esetében szonda készletenként legalább 100 sejt vizsgálatára került sor, transzlokációk esetében 10%, számbeli eltérések esetében 20%-os küszöbértéket alkalmazva.

3.8. Motorizált mikroszkópia

A klonális evolúciós vizsgálatokhoz kombinált iFISH analíziseket végeztünk azokon a mintákon, melyekben a korábbi iFISH tesztek eredményei alapján egynél több genetikai aberráció mutatkozott. Ennek során az első iFISH jelöléssel vizualizáltuk az egyik genetikai aberrációt a sejtmagokban, majd a preparátumot motorizált mikroszkóppal (Axioplan2ie MOT, Metasystems) digitalizáltuk, a sejtmagok tárgylemezen való pontos elhelyezkedését, lokalizációját is eltárolva. Preparátumonként minimum 500 sejtmag iFISH jel mintázatát határoztuk meg, a vizsgált sejtmagok számát pedig szükség esetén addig növeltük, amíg 200 pozitív (aberrációt hordozó) és 200 negatív (normális jelmintázatot mutató) sejt rendelkezésre nem állt. Ezt követően az első iFISH jelölést eltávolítottuk 50% formamid/2xSSC oldattal, majd a sejtmagokon újabb hibridizálást végeztünk további genetikai aberrációk kimutatása végett. Az egyes sejtmagokat a korábban rögzített koordinátájuk alapján, motorizált mikroszkóppal visszakerestük, így a különböző aberrációk jelenlétét ugyanazon sejtekben tudtuk vizsgálni.

3.9. Statisztikai értékelés

Az iFISH, MLPA és digitális MLPA eredményeket Fisher-féle egzakt próbával vetettük össze, SPSS 15.0 szoftvert használva (SPSS Inc., Chicago, IL). A klonális evolúció vizsgálata céljából elvégzett, kombinált iFISH analízis során a csak szubklonálisan detektált specifikus *IGH*-transzlokációk előfordulási gyakoriságát Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze.

4. Eredmények

4.1. DNS kópiaszám eltérések szűrése MLPA technikával

A 2004 és 2012 között gyűjtött (3 - 94 hónapos), diagnosztikus csontvelő aspirátumokból származó DNS minták mindegyike magas integritást mutatott agaróz géll elektroforézissel ellenőrizve. Az MLPA protokollt minden esetben sikeresen hajtottuk végre, a reakciók minősége szempontjából a minták között jelentős variabilitás nem volt megfigyelhető, a 4. ábrán egy reprezentatív MLPA profil látható. Az iFISH jelek fluoreszcens intenzitása lehetővé tette a megbízható értékelést, a minta preparátumok között jelentős minőségbeli különbség nem mutatkozott. A legalacsonyabb jel/zaj arányt a *TP53* gént vizualizáló szonda mutatta, míg a legintenzívebb jeleket az LSI IGH/MAF DC DF szonda készlettel figyeltük meg, mely utóbbi így hatékonyá tette a t(14;16) transzlokáció kimutatását. Ugyanakkor a *c-MAF* génhez hibridizáló FISH szonda még optimalizálás után is gyakran mutatott diffúz, nem pontszerű jelmorfológiát, feltehetően a szonda sajátos tervezésének köszönhetően, mely két 350 kilobázis hosszan jelölt genomikus szakasz között egy 2,2 megabázis hosszúságú szakaszt jelöletlenül hagyott. Ez a körülmény számos esetben megnehezítette a piros (*c-MAF*) iFISH jelek számának meghatározását, így a 16q kromoszóma kar allél mennyiségét kizárólag MLPA módszerrel vizsgáltuk, iFISH módszerrel nem.

4.1.1. MLPA által detektált aberrációk

MLPA-val 81 beteget vizsgáltunk, 74 betegben (91%) azonosítottunk DNS kópiaszám eltéréseket, beleértve a 12-es kromoszóma rövid karján és a 16-os kromoszóma hosszú karján mutatkozó aberrációkat is, melyek vizsgálatát az alkalmazott FISH szondák nem tették lehetővé. A 13-as kromoszóma aberrációi mutatkoztak a legtöbbször, melyeket csökkenő gyakorisággal követett az 1q többlet, 1p hiány, 5q többlet, 12p hiány, 16q hiány és 17p hiány (8. táblázat). Az egyes aberrációk tekintetében az irodalmi adatokhoz hasonló gyakoriságokat figyeltünk meg. Egynél több kópiaszám eltérés azonos betegben való együttes előfordulását 33 különféle kombinációban, összesen 54 betegben figyeltük meg. Kettő, három, négy, illetve öt abnormalitás 21, 19, 11, illetve 3 betegben mutatkozott (9. táblázat).

4.1.2. MLPA és iFISH eredmények összehasonlítása

iFISH technikával 78/81 betegben (96%) detektáltunk genetikai eltérést. Az MLPA és iFISH módszerekkel megfigyelt kromoszómális eltérések gyakoriságát a 8. táblázat foglalja össze. *IGH* gént érintő transzlokációkat a betegek 58%-ában mutattunk ki. A specifikusan vizsgált *IGH* transzlokációk, az 1q többlet, az 5q többlet, illetve a 17p hiány gyakorisága nem tért el jelentősen az irodalmi adatoktól [86, 87]. A 13-as kromoszóma abnormalitásai (monoszómia vagy deléció) a vártnál magasabb előfordulást mutattak, az 52 érintett betegből 39-nél (75%) a kromoszóma monoszómiája volt megfigyelhető. Az 1-es kromoszóma rövid karjának hiánya volt az egyedüli aberráció, melyet irodalmi adatokhoz képest jóval alacsonyabb gyakorisággal láttunk. iFISH technikával több aberráció együttes előfordulását 31 különböző kombinációban, összesen 61 betegnél figyeltük meg. Kettő, három, négy, illetve öt abnormalitás 29, 23, 8, illetve 1 betegben mutatkozott (9. táblázat).

Az MLPA, mint a PCM klinikai diagnosztikájában potenciálisan alkalmazható technika teljesítményét a jelenleg standard módszerként használt iFISH eredményeihez hasonlítva értékeltük. A két módszerrel együttesen 79 betegben azonosítottunk legalább egy genetikai eltérést. Az összesen vizsgált 81 betegben öt aberrációt szűrtünk mindkét módszerrel, beleértve az 1p hiányt, 1q többletet, 5q többletet, a 13-as kromoszóma abnormalitásait, valamint a 17p hiányt. A 405 (5 x 81) összehasonlító teszt eredményből 368 (90,8%) esetben találtunk egyezést (10. táblázat). A két módszer között a legjelentősebb eltérést az 1p hiány vonatkozásában figyeltük meg. Huszonegy betegben kizárólag az MLPA mutatott ki deléciót, míg a sejtmagokban normál 1p kópiaszámra utaló iFISH jelmintázat mutatkozott. A jelenség a két módszer által vizsgált, eltérő genomikus régiókkal magyarázható. Míg az MLPA szondák az 1p21, 1p31 és 1p32 régiókhoz kapcsolódtak, az alkalmazott FISH szonda a *CHD5* gént fedve, az 1p36-os kromoszóma sávban hibridizált. Hasonló probléma jelentkezett két betegnél az 1q kromoszóma kar vizsgálatakor, melynek során az MLPA többletet detektált, míg az iFISH nem mutatott eltérést. Ebben az esetben az iFISH szonda által fedett *SI00A10* génhez viszonyítva mindegyik MLPA szonda disztálisan helyezkedett el a kromoszóma karon. Két további betegnél kizárólag az iFISH mutatott ki 1q többletet, mely a mielómás sejteknek csak egy részében

mutatkozott, ezzel olyan alacsony mértékű pozitivitást eredményezve, mely elmaradt az MLPA által kimutatható alsó detektálási küszöbtől.

A genetikai aberráció szubklonális jelenléte az iFISH-sel 5q többletet, illetve 13-as kromoszóma eltéréseket mutató betegek 19%-ában, illetve 11%-ában szintén negatív MLPA eredményhez vezetett. Egy beteg mintájában az MLPA kis kiterjedésű deléciót igazolt a 17p kromoszóma karon (*TP53* gén), melynek detektálását az iFISH alacsonyabb genomikus feloldóképessége nem tette lehetővé. Hét betegben további visszatérő aberrációként jelentkezett az 5q kromoszóma kar hiánya, mely 3 betegben csak MLPA-val, 1 betegben csak iFISH-sel volt kimutatható. A két módszer közötti eltérő eredmények hátterében a cél régiók közötti különbség (iFISH: *EGR1* gén, MLPA: *PCDHA1*, *PCDHAC1*, *PCDHB2*, *PCDHB10*, *SLC25A2*, *PCDHGA11* gének), kis kiterjedésű fokális deléció jelenléte, illetve az aberrációt hordozó sejtek alacsony aránya állt az egyes esetekben.

A különböző eltérések együttes előfordulása tekintetében az iFISH és az MLPA együttes használata az egyes módszerekkel nyert adatokhoz képest módosította az eredményt a betegek többségénél, 22 olyan új kombinációt is felfedve, melyek az egyes módszerekkel külön-külön nem lettek volna felismerhetők (9. táblázat). A beteg specifikus adatokat a 11. táblázat mutatja be részletesen.

4.1.3. MLPA eredmények validálása

Mivel az MLPA szondák iFISH-sel nem vizsgált genomikus régiókat is lefedtek, a módszer által kimutatott aberrációk egy része nem került eredetileg validálásra egy második, független technikával. Bár az MLPA hatékonyságát és megbízhatóságát számos korábbi tanulmány bizonyította, eredményeink megerősítése céljából további validációs vizsgálatokat végeztünk. Az iFISH adatoktól való legjelentősebb eltérést az 1-es kromoszóma aberrációi kapcsán figyeltük meg, ezért az MLPA által ezen a kromoszómán detektált abnormalitások ellenőrzéséhez specifikus iFISH analíziseket lehetővé tevő BAC klónokat szereztünk be az 1p32.2 (RP1-86A18 és RP11-253A20 klónok), 1p21 (RP11-421L21 klón) és 1q21 (RP11-307C12 klón) lókuszok vizualizálásához. A klónokat biotin vagy digoxigenin-dUTP-vel jelöltük, majd az így létrehozott FISH szondákat normál humán metafázisokhoz hibridizáltuk és avidin-FITC-cel vagy anti-digoxigenin-rhodaminnal előhívtuk, mely eljárással sikeresen ellenőriztük az összes szonda cél régióhoz való specifikus kapcsolódását.

A további iFISH analízisekhez 21 olyan beteg sejtmintáiból állt rendelkezésre elegendő mennyiség, akiknek korábbi iFISH és MLPA vizsgálataival eltérő eredményeket kaptunk az 1p hiány, vagy az 1q többlet vonatkozásában. Mind a 19 mintában, ahol korábban kizárólag az MLPA mutatott ki 1p hiányt, a specifikusan tervezett FISH szonda megerősítette az aberráció jelenlétét (1p32: 4., 40., 52. és 67. számú betegek; 1p21: 2., 8., 11., 20., 23., 25., 26., 27., 37., 44., 59., 60., 66., 67., 68. és 70. számú betegek). Ehhez hasonlóan, a 18-as számú betegben a korábban kizárólag MLPA-val detektált 1q többlet sikeresen validálásra került. Az 1-es számú betegben azonban ez az eltérés nem volt felismerhető az RP11-307C12 szondával. Mivel az MLPA-val megfigyelt relatív kópiaszám érték meggyőzően magas értéket mutatott ($1,40 <$), feltételezzük, hogy egy kis kiterjedésű, csupán a *CKS1B* génre korlátozódó többlet okozta az eltérő eredményeket. Az RP11-307C12 BAC klón több mint 180 kilobázis hosszúságú, míg a *CKS1B* gén, melyhez két különböző MLPA szonda is hibridizált, csupán 4,6 kilobázis kiterjedésű.

4.1.4. Az 1-es kromoszóma abnormalitásainak vizsgálata

Az MLPA szondakészlet kilenc különböző 1p és 10 különböző 1q kromoszóma karra specifikus szondát tartalmazott, mely lehetővé tette az 1-es kromoszómán megjelenő aberrációk helyének, kiterjedésének és mintázatainak vizsgálatát (12. táblázat). Ötvennégy beteg mintájában mutatkozott abnormalitás az 1p és/vagy az 1q karokon. Két betegben (53-as és 76-os számú) csak az iFISH jelmintázat utalt 1q többletre. A mielómás sejtek aránya mindkét mintában meglehetősen alacsony (25%) volt, mely nehezítette az MLPA eredmények megbízható értékelését, ezért ezekben a mintákban az 1-es kromoszóma abnormalitásait nem vizsgáltuk. A fennmaradó betegek közül 15-nek a mintájában mindkét kromoszóma karon mutatkozott kiegyensúlyozatlan genetikai eltérés, míg 13 betegben csak az 1p, 24 betegben pedig csak az 1q kar volt érintett.

Az 1p intersticiális deléciója 21 betegben volt kimutatható, míg 7 mintában az összes olyan szonda, mely ehhez a kromoszóma karhoz hibridizált, csökkent kópiaszámot mutatott. A rövid karon jelentkező deléciók helyét és méretét, valamint az eredményezett allél mennyiségeket vizsgálva jelentős heterogenitást figyeltünk meg, 9 különféle mintázattal. Az 1p deléciót hordozó 28 beteg közül 12-nél a hiány csak az 1p21 régióban mutatkozott. A *COL11A1*, *DPYD*, *RPE65*, *LEPR*, *DAB1*,

PPAP2B, *CDKN2C*, *FAF1* és *CHD5* gének 22, 23, 13, 11, 14, 13, 12, 12 és 7 mintában voltak érintettek. Biallélikus hiányt két mintában láttunk, a 4-es számú betegnél a *FAF1* gén, míg a 67-es számúnál a *FAF1* és *CDKN2C* gének érintettségével. Az 1p karon jelentkező hiány az összes többi esetben monoallélikusnak bizonyult.

Az 1q abnormalitást hordozó 39 betegből 34-nél az összes 1q specifikus MLPA szonda többletet jelzett, ebből 18 esetben 1 kópia többlet, míg 14 esetben 2-3 extra kópia jelenléte volt kimutatható mindegyik szondával. A 8-as számú beteg mintájában 2 kópia többlet mutatkozott az 1q21 régióban, míg csupán 1 extra kópia volt kimutatható az 1q23 lókusznál, demonstrálva, hogy a többlet akár változó mértékben is megjelenhet a hosszú kar mentén. A 20-as számú beteg mintájában mindegyik MLPA szonda két extra kópiát mutatott, az iFISH jelmintázat azonban két szubklón jelenlétére utalt a mielómás sejtpopuláción belül. A sejtek kétharmadában egy extra 1q kópia, míg egyharmadában három extra kópia mutatkozott. Bár a mintában mindkét módszer kópiaszám többletet detektált, ez az eset demonstrálja, hogy soksejtes mintából izolált DNS-t vizsgálva a mielómás sejtpopuláció szubklonális szerkezete nem fedhető fel, az MLPA adatok helyes interpretálása így óvatosságot igényel. Az *S100A10*, *CKS1B*, *NUF2* és *PBX1* géneket 37, 39, 35 és 34 esetben érintették DNS kópiaszám változással járó aberrációk.

4.1.5. Az azonosított aberrációk együttes megjelenése

Az iFISH és MLPA kombinált alkalmazása lehetővé tette számos kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan genetikai abnormalitás ugyanazon betegekben való együttes előfordulásának vizsgálatát. Hatvanhat beteg mintájában 53 különböző kombinációban figyeltünk meg egynél több genetikai eltérést, ebből 22 kombináció nem lett volna felismerhető, ha csupán az egyik módszert alkalmaztuk volna (9. táblázat). Az egyes aberrációk közötti kapcsolatok erősségét az 5. ábra és a 13. táblázat mutatja be.

A t(4;14) és t(14;16) pozitív betegek mindegyike hordozott 13-as kromoszóma abnormalitást is, mely összhangban áll korábbi irodalmi adatokkal. A 90-es években a 13-as kromoszóma abnormalitásait rossz prognózissal, rövidebb túléléssel társították [88, 89], később azonban kiderült, hogy az abnormalitás fent említett, rossz prognózisú markerekkel való gyakori együttes előfordulása félrevezette a 13-as kromoszóma eltérések klinikai jelentőségével kapcsolatos korábbi következtetéseket [16]. Bár a

vizsgált betegpopulációnk méretéből adódóan korlátozott számú t(14;16) transzlokációt hordozó esetet azonosítottunk, ennek az eltérésnek az 1-es kromoszóma aberrációival való együttes előfordulása így is gyakran volt megfigyelhető. Boyd és mtsai. részben ezt az erős asszociációt tették felelőssé a t(14;16) transzlokáció által definiált citogenetikai csoportban tapasztalt kedvezőtlen prognosztikai viselkedésért [90], melynek komoly jelentőségét mutatja az is, hogy az Intergroupe Francophone du Myelome korábban megkérdőjelezte az aberráció rossz prognosztikai jelentőségét [91]. Ezek a kiragadott példák is bizonyítják, hogy az iFISH és MLPA kombinált alkalmazása az általunk vizsgált betegpopuláción egy olyan genetikai jellemzést biztosított, melynek eredménye összhangban áll számos korábbi, nagyszámú beteget vizsgáló klinikai tanulmány adataival.

4.2. DNS kópiaszám eltérések kimutatása digitális MLPA technikával

A digitális MLPA célzottan 372 genomikus lókuszt tekintetében nyújtott informatív eredményt az általunk vizsgált 56 beteg diagnosztikus mintájában. Két, visszatérő szubkromoszómális eltérés kimutatását célzó sonda relatív kópiaszám értéke magas, 0,09-et meghaladó mértékű standard deviációt mutatott a negatív kontroll mintákban, ezért ezeket a szondákat kizártuk a további analízisből. A laboratóriumi protokoll 24 órán belül elvégezhetőnek bizonyult, beleértve a digitális MLPA szondák éjszakán át tartó hibridizációját és a könyvtárak MiSeq szekvenálóba való betöltését is. A standard, v3 (version 3) szekvenálási protokollt lehetővé tevő flow cell-lel a 115 bázispár hosszúságú, egyirányú szekvenálás körülbelül 9 és fél órát vett igénybe és átlagosan 1169 ± 184 szekvenálási read-et eredményezett szondánként.

4.2.1. Számbeli kromoszóma aberrációk kimutatása

A digitális MLPA 47/56 betegben (84%), összesen 65 teljes kromoszómát érintő hiányt és 145 többletet detektált. Leggyakoribb eltérésnek a 13-as kromoszóma monoszómiája mutatkozott, melyet többségében a nem hiperdiploid betegek között mutattunk ki. A triszómiák túlnyomó többségét (94%) azon 20 betegben figyeltük meg, akiknél hiperdiploid kariotípus mutatkozott. Ezekben az esetekben elsősorban páratlan számú kromoszómák többletét figyeltük meg, leggyakrabban a 3-as és 9-es

kromoszóma triszómiáját, melyet csökkenő gyakorisággal a 11-es, 19-es, 15-ös, 5-ös, 7-es és 21-es kromoszómák triszómiája követett (6. ábra).

4.2.2. Szubkromoszómális kópiaszám eltérések azonosítása

A vizsgált 56 betegben a digitális MLPA összesen 246 szubkromoszómális kópiaszám eltérést azonosított (7. ábra). A legalább három különböző betegben megfigyelt eltérések közül az 1q kromoszóma kar többlete jelentkezett leggyakrabban, melyet csökkenő sorrendben az 1p hiány, 8p hiány, 16q hiány, 12p hiány, 14q hiány, 8q többlet, Xq többlet, 13q hiány, 6q hiány, 14q többlet, 17p hiány, 20p hiány, 22q hiány, 5q hiány, 6p többlet és 9q többlet követett (14. táblázat). Betegenként átlagosan 4,4 (tartomány: 0 - 13) szubkromoszómális kópiaszám eltérést mutattunk ki, átlagosan 3,7-et a hiperdiploid és 4,8-at a nem-hiperdiploid betegekben. A betegek 95%-ában (53/56 beteg) mutattunk ki abnormalitásokat, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, illetve 13 aberrációt 9, 7, 7, 4, 8, 6, 4, 1, 1, 4, 1, illetve 1 betegben azonosítva. Biallélikus deléciót 10 betegben találtunk, a *CDKN2C*, *FAF1*, *BIRC3*, *TRAF3*, *CYLD*, illetve *TP53* géneket 2, 1, 2, 3, 2, illetve 1 betegben érintve.

4.2.3. Az 1-es kromoszóma abnormalitásainak részletes feltérképezése

Az 1-es kromoszóma régióihoz 44 különböző digitális MLPA szonda hibridizált, 19 a rövid, 25 a hosszú kromoszóma karhoz kapcsolódva, ezzel lehetővé téve az 1-es kromoszóma abnormalitásainak MLPA-nál részletesebb vizsgálatát (8. ábra). Harmincnyolc beteg mintájában figyeltünk meg 1-es kromoszóma aberrációt, 1p hiányt 20, míg 1q többletet 22 esetben, 15 betegben pedig mindkét kar érintettnek bizonyult.

A rövid kromoszóma karhoz kapcsolódó szondáknak csak egy része mutatott eltérést 15 betegben, hasonló jelenséget a hosszú kar vonatkozásában 7 betegnél láttunk. A fennmaradó esetekben az azonos karhoz hibridizáló szondák mindegyike, beleértve a centromerhez, illetve telomerhez közeli szondákat is, abnormalis kópiaszámot jelzett. Három betegben több, ugyanazon kart érintő, nem egybefüggő aberrációt láttunk. Szubklonális, illetve biallélikus 1p hiány 1, illetve 2 betegben mutatkozott. Több mint három 1q kópia jelenlétére utaló, magas relatív kópiaszámot 12 betegnél detektáltunk, az eredményeket az iFISH adatok is megerősítették. Három betegben ugyanazon kromoszóma kart érintő, különböző mértékű allél hiányt vagy

nyerést figyeltünk meg. A rövid karon jelentkező hiány leggyakrabban az 1p12 (*FAM46C* gén) és 1p21 (*DPYD* és *COL11A1* gének) régiókat, valamint az 1p32 (*FAF1* és *CDKN2C*) lókuszt érintették. Többletek leginkább az 1q21 (*BCL9*, *ANP32E*, *MCL1*, *NUP210L*, *ADAR*, *CKS1B*), valamint az 1q23 (*SLAMF7*, *NUF2*, *PBX1*) régiókban voltak megfigyelhetők.

Az 1-es kromoszómán jelentkező kópiaszám eltérések különböző jellemzőit együttesen vizsgálva 24 mintázatot tudunk elkülöníteni az eltérés elhelyezkedése és kiterjedése, valamint az aberráció eredményeként megjelenő allél mennyiség vonatkozásában.

4.2.4. Digitális MLPA, valamint MLPA és iFISH adatok összehasonlítása

A digitális MLPA eredmények validálása, illetve a módszer teljesítményének feltérképezése céljából az 56 mielómás beteg mintáján nyert digitális MLPA adatokat összevetettük a betegek korábbi, hagyományos MLPA és iFISH eredményeivel. Az MLPA a digitális MLPA-val analizált régiók egy részét vizsgálta olyan szondákkal, melyek specifikus ligálási helyei a digitális MLPA szondák ligálási lókuszeitől eltértek, ezáltal lehetővé téve a független validációt.

Az MLPA 121 DNS kópiaszám eltérést azonosított 49 betegben (88%), leggyakrabban a 13-as kromoszóma aberrációit kimutatva, melyet csökkenő előfordulási sorrendben az 1q többlet, 1p hiány, 16q hiány, 12p hiány, 17p hiány és 5q hiány követett (14. táblázat). Az iFISH 95 kiegyensúlyozatlan aberrációt mutatott ki, úgymint a 13-as kromoszóma aberrációi (36 beteg), 1q többlet (32 beteg), 1p hiány (17 beteg), 17p hiány (6 beteg) és 5q hiány (4 beteg). A 12p hiányt és a 16q hiányt nem vizsgáltuk iFISH-sel, így a digitális MLPA adatokat 6, illetve 4 aberráció vonatkozásában tudtuk összehasonlítani az MLPA, illetve az iFISH eredményekkel. A három módszer kombinált összevetése a 336 adatpontból (56 beteg x 6 aberráció) 319 esetben (94,9%) mutatott egyezést. A módszerek szisztematikus páros összehasonlítása szintén magas egyezést mutatott az egyes aberrációk kimutatása tekintetében (Fisher-féle egzakt próba: $p < 0,0001$, 15. táblázat). A különböző módszerek eredményei közötti eltérések többsége a digitális MLPA szonda keverékben található magasabb szonda számra volt visszavezethető, mely lehetővé tette a visszatérő DNS kópiaszám eltérések nagyobb kiterjedésű és/vagy magasabb

genomikus feloldású analízisét. A három módszer eredményeinek egyezését demonstráló, reprezentatív esetet mutat be a 9. ábra.

A digitális MLPA lehetővé tette a 20 hiperdiploid kariotípust mutató betegben megjelenő számbeli kromoszóma eltérések átfogó analízisét, melyet az MLPA és iFISH adatok nem biztosítottak. Ezenkívül, leginkább a módszer által nyújtott kiterjedtebb genomikai vizsgálatnak köszönhetően, digitális MLPA-val a nem-hiperdiploid betegekben is azonosítottunk 58 olyan teljes kromoszóma aberrációt, melyek a másik két módszerrel nem voltak kimutathatók. Szubkromoszómális aberrációkat tekintve a digitális MLPA 156 olyan eltérést azonosított 45 hiperdiploid és nem-hiperdiploid betegben, melyeket kizárólag ezzel a technikával detektáltunk. Ugyanakkor az iFISH 28 olyan kiegyensúlyozott kromoszóma átrendeződést mutatott ki, melyek felderítése az MLPA és digitális MLPA technikákkal nem lehetséges. Ezek közül az *IGH* gén *FGFR3-MMSET*, *CCND1*, illetve *c-MAF* génekkel, valamint ismeretlen partner génnel való fúziója 8, 10, 4, illetve 6 betegben volt kimutatható. A három módszer által detektált leggyakoribb aberrációkat a 14. táblázat mutatja be.

4.3. Pontmutáció specifikus kimutatása digitális MLPA technikával

Specifikus tervezésének köszönhetően a D006 digitális MLPA szonda keverék egyik szondája lehetővé teszi a *BRAF* gén 15-ös exonjában megjelenő, c.1799T>A (p.V600E) mutáció kimutatását. Ennek alapját a szonda ligálási helyének mutációs 'hotspot'-ra való tervezése adja, melynek köszönhetően a szonda oligonukleotidok összekapcsolása, majd ezt követően a PCR termékek generálása kizárólag mutáció jelenlétében kivitelezhető. A lókuszt normál, csírvonal konfigurációja esetén teljes szonda és PCR termék nem képezhető.

BRAF^{V600E} mutációt két betegben azonosítottunk digitális MLPA-val. Az eltérést az 51-es számú betegben sikeresen validáltuk piroszekvenálással (10. ábra), mely azonban az 55-ös számú beteg mintájában negatív eredményt mutatott. Mivel a mutációt egy második digitális MLPA reakcióval ismét kimutattuk mindkét betegben, a piroszekvenálásnál nagyobb érzékenységű ddPCR analízist végeztünk az 55-ös beteg mintáján, mely megerősítette az aberráció jelenlétét.

4.4. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye PCM-ben szenvedő betegein

A Pécsi Klinikai Központ és a Tolna Megyei Balassa János Kórház plazmasejtes mielómában szenvedő betegein 2005 és 2018 között elvégzett molekuláris citogenetikai vizsgálatok eredményeit összesítettük és az analizált minták minőségét tekintve megállapítottuk, hogy az említett időszakban csontvelői aspirátumot 191 betegnél tudtunk vizsgálni, csontvelőből származó kenetet 4 betegnél, további 4 betegnél perifériás vért analizáltunk, míg 32 betegnél kizárólag crista biopsziás minta állt rendelkezésre.

4.4.1. Plazmasejtek mágneses dúsítása

A 231 betegminta egy részén kivitelezett mágneses sejtdúsítás a csontvelői minták plazmasejt arányát jelentősen megemelte. Negyvennyolc esetben került sor a módszer alkalmazására, amikor a plazmasejtek aránya nem haladta meg a 20%-ot; az átlagos plazmasejt arány ezekben a mintákban 5% (tartomány: 0,3 - 20,0%) volt. A dúsítást követően átlagosan 72%-ra emelkedett a plazmasejtek aránya (tartomány: 20 - 100%), csupán három esetben (6,7%) maradt az érték 30% alatti, a dúsulás mértéke átlagosan tizennyolcszorosnak bizonyult. A magasabb plazmasejt tartalom az iFISH és MLPA vizsgálatok megbízható értékelését jelentősen fokozta, néhány minta esetében pedig kifejezetten a dúsítás tette lehetővé az összes genetikai vizsgálat sikeres elvégzését azáltal, hogy 30% fölé emelte az abnormális sejtek arányát.

4.4.2. iFISH vizsgálattal kimutatott aberrációk

A teljes beteganyagban elvégzett iFISH vizsgálatok eredményeit az 16. táblázat foglalja össze. Az *IGH* transzlokációt hordozó betegeken belül közel azonos gyakorisággal mutatkoztak az *IGH-CCND1* (26,8%) és az *IGH-FGFR3/MMSET* (24,7%) génfúziót hordozó esetek, míg *IGH-MAF* pozitivitást a betegek 10,7%-ában figyeltünk meg. Az 1q kromoszóma kar többletét, a 13-as kromoszóma abnormalitásait, valamint a 17p kromoszóma kar vesztesét az irodalomban ismert gyakoriságokhoz hasonló arányban mutattuk ki, míg az 1p kromoszóma kar strukturális vesztesége elmaradt a korábbi, DNS microarray alapú nemzetközi tanulmányok alapján feltételezett tartománytól. Ennek a fentebb is említett, legvalószínűbb oka abban keresendő, hogy az alkalmazott,

kereskedelmi forgalomban elérhető FISH szonda az 1p36 kromoszóma lókuszt vizualizálta, míg az 1p hiány gyakran lokalizálódik az 1p32, 1p31 vagy 1p21 régiókra. A mielóma iFISH diagnosztikája során gyakran megjelenő jellemző aberrációs jelmintázatokat, valamint néhány általunk megfigyelt, ritkább alternatív jelmintázatot szemléltet a 11. ábra.

4.4.3. MLPA technikával kimutatott aberrációk

MLPA módszerrel 89 DNS veszteséssel vagy többlettel/sokszorozódással járó, kiegyensúlyozatlan aberrációt azonosítottunk 42 beteg csontvelő mintájában. A betegek több mint felében mutatkozott 13-as kromoszómát érintő monoszómia vagy deléció, melyet csökkenő gyakorisággal követett az 1q többlet, 1p hiány, 5q többlet, a 16q hiány, valamint a 12p és 17p hiány (17. táblázat). Emellett 3 betegben az 5q kromoszóma kar hiányát, illetve 1 betegben a 16q kromoszóma kar többletét azonosítottuk.

4.4.4. MLPA és iFISH eredmények összehasonlítása

Az MLPA és FISH eredményeket a mindkét módszerrel vizsgált 42 betegben, 5 kromoszóma kar (1p, 1q, 5q, 13q, 17p) vonatkozásában tudtuk összehasonlítani. A 210 (42 x 5) adatpontból 202 esetben egyezett meg a vizsgálatok eredménye, mely 96,2%-os konkordanciának felel meg (18. táblázat). Az 1p kromoszóma kar vizsgálatánál tapasztalt nagymértékű egyezést az ennél a 42 betegnél specifikusan validációs célból alkalmazott, BAC klón alapú iFISH vizsgálat is segítette. A 8 eltérő eredmény közül 5-nél az iFISH teszt mutatott ki pozitivitást az 1q, 5q, 13q és 17p kromoszóma karokon; az MLPA negatív eredménye nagy valószínűséggel a minták 30%-ot meg nem haladó plazmasejt tisztaságának volt köszönhető. Három esetben kizárólag az MLPA fedett fel aberrációt, két betegben az 1p kromoszóma kar azon régiójában, melyet egyik alkalmazott iFISH szonda sem fedett, egy betegben pedig a 17p kromoszóma kar olyan rövid szakaszán mutatva ki eltérést, mely az iFISH vizsgálat feloldóképességét nem érte el. Összességében az MLPA 21 olyan aberrációt mutatott ki 16 betegben (38%), melyek az általunk végzett iFISH vizsgálatokkal rejtve maradtak. Ugyanakkor iFISH analízissel összesen 38 olyan kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan aberrációt mutattunk ki a 42 betegben, melyeket az alkalmazott MLPA kittel nem voltunk képesek detektálni.

4.5. Klonális evolúció vizsgálata egyedi sejt szinten

Klonális evolúciós vizsgálataink során visszatérő citogenetikai aberrációk egyedi sejt szintű korrelált analízisét végeztük el mielómás betegekben, mely az esetek egy részében lehetővé tette a vizsgált abnormalitások időbeli sorrendjének meghatározását. Ha például a mintában két különböző, genetikai aberráció(k) által érintett mielómás sejtpopuláció volt kimutatható, és az egyik sejscsoport csupán 'A' aberrációt hordozta, míg a másik 'A' mellett 'B'-t is, akkor valószínűsíthető volt, hogy 'A' aberráció előbb jelent meg a betegség kialakulása során mint 'B'. Ennél a megközelítésnél önkényesen kizártuk azt a valószínűtlen lehetőséget, hogy egy aberráció az adott sejtben megjelent, majd rövid időn belül el is tűnt.

Ezenkívül közvetve vizsgáltuk a mielóma fejlődés korai szakaszában megjelenő aberrációknak a betegséget iniciáló lehetséges szerepét oly módon, hogy meghatároztuk az adott eltérést hordozó sejtek arányát a minta plazmasejt populációján belül. Amennyiben egyértelműen megállapítható volt, hogy az aberrációt a plazmasejtek jelentős része nem tartalmazta, az eltérés iniciáló szerepe kizárható volt.

4.5.1. Kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan aberrációk szűrése iFISH-sel

A tanulmányba bevont 185 beteg mintáiban a megjelenő aberrációk kezdeti szűrését független iFISH vizsgálatokkal végeztük, melynek során a betegek 47,2%-ában 13-as kromoszóma abnormalitásokat (monoszómia vagy deléción), 7,5%-ában *TP53* gén deléciót, 58,8%-ában pedig *IGH* gént érintő transzlokációkat figyeltünk meg. A $t(4;14)(p16;q32)$, $t(11;14)(q13;q32)$ és $t(14;16)(q32;q23)$ transzlokációk az *IGH* génátrendeződést hordozó esetek 22,6, 21,7 és 6,6%-ában mutatkoztak. Hatvannégy (34,6%) betegben több mint egy genetikai aberrációt detektáltunk, a specifikus aberrációkat, beleértve az *IGH* partner génjeit is, 35 betegben tudtuk azonosítani (19. táblázat).

4.5.2. Genetikai aberrációk korrelált vizsgálata motorizált mikroszkópiával

Huszonöt beteg (24 PCM, 1 PCL) mintáiból állt rendelkezésre elegendő sejtmennyiség további, kombinált iFISH analízis elvégzéséhez. Huszonegy betegben egyetlen klónt tudtunk azonosítani, mely az összes korábban kimutatott eltérést hordozta, így ezekben az esetekben nem tudtuk felderíteni a citogenetikai evolúció időbeli lépéseit. Négy betegben (16%) a genetikai eltérések alapján egynél több abnormalis sejtpopuláció mutatkozott (12. ábra). A kombinált iFISH analízissel azonosított szubklónokat és azok arányát a tisztított plazmasejt populáción belül a 20. táblázat foglalja össze. A 13-as kromoszóma abnormalitásait megelőzték a $t(4;14)(p16;q32)$ és $t(14;16)(q32;q23)$ transzlokációk (41-es, illetve 45-ös betegben). A *TP53* gén deléciója szekunder aberrációnak bizonyult a $t(11;14)(q13;q32)$ transzlokációhoz és a 13-as kromoszóma abnormalitásához viszonyítva (124-es, illetve 159-ös betegben).

Hat beteg mintájában a megjelenő transzlokáció specifikus kimutatásához használt dupla-fúziós FISH szondával több különféle, pozitivitást jelző jelmintázatot is láttunk, mely az *IGH* transzlokációban érintett gének citogenetikai evolúciója következtében megjelenő, addicionális eltérések jelenlétére utalt. Ha ezekben az esetekben a vizsgálat kizárólag a tipikusan elvárt, 2 fúzió - 2 piros - 2 zöld pozitív jelmintázatra korlátozódott volna, azzal jelentősen alulbecsültük volna az aberrációt hordozó sejtek arányát a mintában. Ennek a jelenségnek a felismerése segített elkerülni azt a hibás következtetést is, miszerint a 13-as kromoszóma abnormalitás kialakulása időben megelőzte az *IGH* transzlokációk megjelenését. Adataink arra utalnak, hogy a tanulmányunkban vizsgált genetikai eltérések közül a visszatérő *IGH* transzlokációk a legkorábban kialakuló aberrációk, míg a 13-as kromoszóma defektusa és a *TP53* gén deléciója a betegség kialakulásának későbbi stádiumában vezet az érintett szubklónok szelekciós előnyéhez.

A 24 *IGH* gén átrendeződést hordozó beteg közül 6-nál (25%) a kombinált iFISH analízis eredménye arra utalt, hogy a transzlokáció a plazmasejtek csupán egy részében (tartomány: 29,5 - 61,9%) volt jelen (20. táblázat). Ezt a megfigyelést követően ezirányú vizsgálatainkat kiterjesztettük a tanulmányba bevont mind a 185 betegre. A specifikusan azonosított *IGH* transzlokációt hordozó esetek 21,8%-ában az aberráció a plazmasejtek kevesebb mint kétharmadában volt kimutatható: *IGH/FGFR3* 20,0%, *IGH/CCND1* 16,7% és *IGH/MAF* 28,6%. A három csoport közötti különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (Kruskall-Wallis teszt:

IGH/FGFR3 vs. *IGH/CCND1* vs. *IGH/MAF*, $p = 0,786$). Két különböző *IGH* transzlokáció ugyanazon mintában való jelenléte kizárható volt ezekben az esetekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az *IGH* gént érintő transzlokációk betegséget iniciáló funkciója megkérdőjelezhető, sőt kizárható az érintett betegek legalább egyötödében.

5. Megbeszélés

A PCM genetikailag heterogén onkohematológiai betegség, mely változatos klinikai lefolyással társul [16]. Számos tanulmány vizsgálta e két jelenség közötti összefüggéseket, hatékony rizikóbecslési rendszerek kidolgozása, illetve a betegek különféle kezelések mellett várható klinikai válaszána előjelezése céljából. Ezeknek az erőfeszítéseknek az eredményeként született meg a genetikai aberráció alapú TC ('Translocation and cyclin D') és a génexpresszió alapú UAMS-GEP ('University of Arkansas for Medical Science gene expression profiling') klasszifikáció is [92, 63]. A két klasszifikációs rendszer összehasonlító vizsgálatát követően a Nemzetközi Mielóma Munkacsoport egy új molekuláris citogenetikai klasszifikáció bevezetését javasolta, melynek két fő genetikai alcsoportját a hiperdiploid kariotípus és az *IGH* gént érintő transzlokációk határozzák meg [16]. Az ezt követő időszakban számos, nagyszámú betegmintán elvégzett molekuláris citogenetikai és új-generációs szekvenálást alkalmazó kutatás bővítette tovább a PCM genetikai hátterével kapcsolatos ismereteket [28, 33, 63, 68, 93]. Egy Boyd és mtsai. által közölt tanulmány például a legrosszabb prognózist mutató betegek genetikai hátterét vizsgálva rámutatott arra, hogy a kedvezőtlen molekuláris citogenetikai markerek (pl.: 1q21 többlet, 17p13 - *TP53* hiány) növekvő mértékű halmozódása a túlélés fokozatos hanyatlásával társul [90]. Az ilyen típusú eredmények alapján létrehozott, bővített prognosztikai rendszerek klinikai alkalmazása megköveteli a PCM-mel társuló genetikai aberrációk hatékony és átfogó karakterizálását az egyes betegekben.

5.1. Genetikai aberrációk megjelenése a PCM onkogenezise során

A PCM-ben visszatérő módon megjelenő aberrációk közül molekuláris citogenetikai módszerekkel a t(4;14), t(11;14) és t(14;16) transzlokációk, valamint a 13-as kromoszóma abnormalitásai és a *TP53* gén hiánya a legintenzívebben vizsgált eltérések. Míg ezeknek az aberrációknak biológiai és/vagy prognosztikai jelentőségük meggyőzően bizonyított [16], vizsgálataink idején erősen korlátozott mértékű információ állt rendelkezésre az egyes eltéréseknek a betegség kialakulása során való megjelenési idejére és sorrendjére vonatkozóan. Az irodalomban elérhető adatok

többsége csupán közvetett bizonyítékokon alapult, leginkább a betegség különböző fázisaiban (MGUS-PCM-PCL) kimutatható eltérések gyakoriságát figyelembe véve [87, 94]. Néhány munkacsoport tanulmányozta ugyan egyes citogenetikai abnormalitások arányát tisztított plazmasejt populációkon belül is, a különféle aberrációk jelenlétét azonban nem ugyanazon sejtmagokban vizsgálták [94-97]. Egyedi sejt szintű, kombinált iFISH vizsgálatainkkal elsőként szolgáltatunk olyan közvetlen bizonyítékokat a PCM kialakulását kísérő citogenetikai eltérések megjelenési sorrendjére vonatkozóan, mely strukturális aberrációkat is magában foglalt. Eredményeink összhangban állnak a PCM fejlődésére vonatkozó legelterjedtebb modellel, mely szerint az *IGH* transzlokációk jellemzően korán alakulnak ki, míg a 13-as kromoszóma aberrációira és a *TP53* gén deléciójára későbbi megjelenés jellemző [98].

Klonális evolúciós tanulmányainkkal továbbá felfedtük azt is, hogy a vizsgált *IGH* transzlokációk az aberrációt hordozó betegek legalább egyötödénél bizonyíthatóan nincsenek jelen az összes mielómás sejtben, ezáltal a malignus folyamat iniciálásában való meghatározó szerepük kizárható. Korábban más munkacsoportok MGUS mintákat vizsgálva szintén megfigyelték, hogy az *IGH* transzlokációk alkalmanként a plazmasejteknek csak egy részében mutathatók ki [94, 97]. Az MGUS azonban a betegség korai stádiuma, melynél a mintában lévő normál plazmasejtek potenciálisan magasabb, mielómás sejtekkel összemérhető relatív aránya korlátozhatja az eredmények értelmezését. Az általunk vizsgált PCM és PCL mintákban a normál plazmasejtek mennyisége a mielómás sejtekhez képest elenyésző volt, így a fent említett, MGUS-nál jelentkező 'hígító hatás' nem befolyásolta jelentősen eredményeinket. Míg az általunk vizsgált *IGH* transzlokációknak a PCM patogenezise során való korai megjelenése mára már széleskörben elfogadott tény, azok iniciáló szerepével kapcsolatban még jelenleg is eltérő értelmezések olvashatók az irodalomban. Az általunk publikált adatokat, miszerint az *IGH* transzlokációk az esetek legalább egy részében nem töltenek be iniciáló szerepet, közleményünk megjelenése után további olyan meghatározó tanulmányok is alátámasztották, melyek a klonális evolúció szelekciós egységét reprezentáló, egyedi sejteket vizsgáltak molekuláris citogenetikai, illetve molekuláris genetikai módszerekkel [99, 100].

5.2. Az MLPA lehetséges szerepe a mielóma genetikai vizsgálatában

A PCM terápiája jelentős fejlődésen ment keresztül az elmúlt két évtizedben, a betegek túlélési esélyei jelentősen javultak az új terápiás lehetőségeknek köszönhetően [4]. A proteaszóma gátlók és immunmodulátorok kombinált, illetve egymást követő alkalmazásával a várható medián túlélés a korábbi „kemoterápiás” korszakban elérhető, átlagosan 3-4 évről 7-8 évre nőtt. Mindezek ellenére a PCM továbbra is változatos klinikai lefolyást mutat, és a betegek 15-20%-a még mindig 2 éven belül meghal a betegség progressziója következtében [101]. A PCM kezelésének változásához szorosan társult a betegség biológiai, ezen belül genetikai hátterének alaposabb megismerése [33, 63, 68]. Számos tanulmány talált egyértelmű összefüggést a PCM változatos progressziója, klinikai lefolyása, a különféle gyógyszerek mellett észlelt terápiás válasz és az egyes betegek által mutatott eltérő genetikai háttér között [28, 36, 90, 102, 103]. Ennek nyomán a Nemzetközi Mielóma Munkacsoport jelenlegi ajánlásai az emelkedett LDH, csökkent szérum albumin és magas béta-2 mikroglobulin paraméterek mellett magukban foglalják prognosztikailag meghatározónak tűnő, tipikusan iFISH-sel kimutatott markerek vizsgálatát is, mint a del(17p), a t(4;14) és a t(14;16), valamint újabban az 1-es kromoszóma hosszúkarjának többlete [10, 17, 104]. Ezzel összhangban a hazai hematológiai gyakorlatban is felmerült az igény az adott esetben akár terápiás döntést is meghatározó aberrációk kimutatása iránt, mint a t(4;14) (*IGH-FGFR3/MMSET* génfúzió), a t(14;16) (*IGH-MAF* génfúzió) és a del(17p) (*TP53* gén hiány); emellett klinikai szempontból fontosnak tartott az 1q kromoszóma kar többletének, illetve az 1p kar hiányának vizsgálata is [4].

A PCM klinikai menedzsmentjének szempontjából relevánsnak gondolt genetikai aberrációk száma még mindig egyre növekvő tendenciát mutat, amire a rutin hematopatológiai diagnosztikának bizonyos mértékben, a hazai kezelési lehetőségeket és finanszírozási kereteket is figyelembe véve válaszolnia kell. Ezzel a szándékkal történt meg 15 évvel ezelőtt Pécsen az iFISH módszer céltudatos bevezetése a PCM diagnosztikájába, mellyel a leggyakoribb kiegyensúlyozott transzlokációk és kiegyensúlyozatlan kópiaszám eltérések gyorsan és specifikusan kimutathatók. A tanulmányainkban bemutatott, több mint egy évtized alatt összegyűjtött iFISH eredmények nagymértékű egyezést mutatnak korábbi, nemzetközi tanulmányok keretében nyert adatokkal, mind a vizsgált *IGH* transzlokációk gyakorisága, mind a

kópiaszám hiányok és többletek előfordulása tekintetében [20, 28]. Az egyetlen kivétel ez alól az 1p deléción volt, melynek optimális vizsgálatához a jövőben alternatív szonda, vagy akár több szonda párhuzamos használata is szükséges lehet az egyes betegekben előforduló aberrációk jelentősen eltérő lokalizációja miatt. Technikai szempontból elmondható, hogy az iFISH egyaránt alkalmazható csontvelői aspirátum és perifériás vér mintán, ha pedig reprezentatív mintaként csupán crista biopsziás anyag áll rendelkezésre, szöveti körülmények között is.

Az iFISH analízis lehetőségeit azonban korlátozza, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető szonda készletek többsége reakciónként csak egy vagy két aberráció kimutatását teszi lehetővé, a rendelkezésre álló sejtszuspenzió/szövetminta mennyisége pedig gyakran limitált. Ez különösen igaz olyan esetekben, amikor a minta alacsony tisztasága miatt plazmasejt dúsításra van szükség. A mágneses plazmasejt szelekcióval nyert eddigi tapasztalataink arra utalnak, hogy a módszer valóban képes jelentősen növelni a vizsgálandó sejtszuspenzió tisztaságát, ezáltal lehetővé téve informatív genetikai vizsgálatok elvégzését. Az eljárás azonban jelentősen csökkentheti a minta mennyiségét, ezért a betegek hatékony genetikai karakterizálásához szükség lehet olyan módszerek alkalmazására is, melyekkel több genomikus lokusz vizsgálható egyidejűleg.

A hagyományos citogenetikai eljárás (kariotipizálás) során a teljes genom vizsgálatára lehetőség nyílik, azonban a mieloma sejtek korlátozott tenyésztetősége és *in vitro* sérülékenysége miatt a vizsgálat korlátozott szereppel bír a PCM diagnosztikájában. Speciális tenyésztési körülmények nélkül a kariotipizálás gyakran nem reprezentatív, hiszen a mintában lévő, nem neoplasztikus vérképző sejtek gyakran túlnövik a neoplasztikus sejteket. A módszerrel lehetőség nyílik a teljes kromoszóma készlet átfogó analízisére, ezáltal olyan eltérések is felismerhetők vele, melyek kimutatását a rutin diagnosztikában alkalmazott célzott vizsgálatok nem teszik lehetővé, genomikus feloldása azonban legfeljebb 3-10 megabázisos nagyságrendet ér el.

A nagyobb feloldást teljes genom szinten biztosító microarray alapú és új-generációs szekvenálási technikák magas költsége jelenleg nem teszi lehetővé azok széleskörű alkalmazását a hazai molekuláris patológiai diagnosztikában. Az MLPA ebben a környezetben kézenfekvő alternatívának tűnik költséghatékonyasága, valamint viszonylag egyszerű és gyors kivitelezhetősége miatt. A módszer alkalmas a jelenlegi hazai kezelési protokollok mellett potenciális jelentőséggel bíró összes

kiegyensúlyozatlan aberráció egyidejű kimutatására, ezáltal egyértelműen segítheti a PCM-ben szenvedő magyarországi betegek mintáinak átfogóbb genetikai karakterizálását. Az MLPA technikai lehetőségeit vizsgáló tanulmányunkban a módszerrel a betegek 65%-ában tudtunk olyan aberrációkat azonosítani, melyeket az alkalmazott iFISH vizsgálatok nem mutattak ki. Ezenkívül eredményeink alapján az MLPA exon szintű genomikai feloldása néhány esetben lehetővé teszi olyan kis kiterjedésű aberrációk kimutatását is, melyek iFISH-sel nem detektálhatók, igaz a reakció elvégzéséhez az iFISH-nél megszokottnál képest valamivel magasabb minta tisztaság szükséges (30% vs 20%), ami adott esetben a plazmasejtek mágneses dúsításával a minták több, mint 90%-ánál elérhető. Ugyanakkor az iFISH képes a PCM genetikai karakterizálása szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró kiegyensúlyozott transzlokációk kimutatására, valamint egyedi sejt szintű vizsgálatra, mely segíthet a mielómás sejtpopuláció betegeken belüli heterogenitásának, klonális evolúciós folyamatainak feltérképezésében is [105]. Az MLPA és iFISH módszerek összehasonlításával nyert eredményeink, valamint a fentebb említett technikai előnyök és hátrányok alapján megállapítható, hogy a két módszer egymást kiegészítő vizsgálati eljárásnak tekinthető, együttes alkalmazásukkal pedig majdnem az összes mielómás betegben azonosítható valamilyen betegség releváns genetikai eltérés.

5.3. Digitális MLPA által nyújtott lehetőségek

A közelmúltban az MLPA új-generációs szekvenálással való kombinálása által került kidolgozásra a digitális MLPA technika [106], melyet nemzetközi szinten elsők között tesztelhettünk mielómás betegek mintáinak vizsgálatához. A többszáz genomikus lókuszt egyidejű analízisére lehetőséget adó módszerrel szubkromoszomális kiegyensúlyozatlan aberrációk mellett teljes kromoszómákat érintő többleteket és hiányokat is megbízhatóan ki tudtunk mutatni. A PCM genetikai hátterét figyelembe véve ennek kiemelt jelentősége van, hiszen a tipikusan páratlan kromoszómák triszómiájával járó hiperdiploid kariotípus a betegek közel felére jellemző [16]. A digitális MLPA sejttenyésztés nélkül képes a hiperdiploiditás kimutatására, ezenkívül alkalmas specifikus kromoszóma többletek és hiányok azonosítására is. Ennek jelentősége lehet olyan irodalmi adatok alapján, melyek szerint a triszómia által érintett kromoszómák egyes betegeken megjelenő különféle kombinációi eltérő prognosztikai hatással társulhatnak [46].

Digitális MLPA-val egyetlen eset kivétellel minden beteg mintájában sikerült legalább egy genetikai aberrációt azonosítanunk. A teljes kromoszóma eltérések túlnyomó többségét, valamint a szubkromoszómális citogenetikai aberrációk 63%-át nem detektálták az alkalmazott iFISH és MLPA vizsgálatok. A prognosztikai jelentőséggel bíró eltérések mellett, a digitális MLPA terápiás célpontokat érintő aberrációkat (pl.: *MCL1* és *SLAMF7*), illetve prediktív markereket (pl.: *CRBN* hiány immunmodulátor terápia vonatkozásában [107]) is sikeresen azonosított. Ezenkívül a technikával a célzott terápia szempontjából szintén releváns *BRAF^{V600E}* mutációt is kimutattuk két beteg mintájában, mellyel elsőként demonstráltuk, hogy a módszer specifikus pontmutációk célzott kimutatásához is alkalmazható.

A PCM diagnosztikájához és kutatásához elterjedten használt módszerekhez viszonyítva a digitális MLPA legfontosabb előnyei az alábbiakban foglalhatók össze: (i) nagyszámú genomikus lókuszt egyidejű vizsgálatával olyan aberrációk kimutatását is lehetővé teszi, melyek a jelenleg kereskedelmi forgalomban elérhető FISH és MLPA kitekkel nem vizsgálhatók; (ii) az MLPA-val is vizsgált lókusznál jelentkező aberrációkat az ugyanazon genomikus régiókat nagyobb számú szondával lefedő digitális MLPA nagyobb biztonsággal mutatja ki; (iii) ugyanebből az okból kifolyólag a digitális MLPA nagyobb genomikus felbontású vizsgálatot tesz lehetővé, ezáltal részletgazdagabb képet nyújtva bizonyos kópiaszám eltéréssel járó aberrációk elhelyezkedéséről, mértékéről és kiterjedéséről, melynek egyes esetekben klinikai jelentősége is lehet; (iv) a módszerrel specifikus teljes kromoszóma eltérések is kimutathatók, mely DNS index méréssel nem lehetséges, kariotipizálással pedig nehézkes, sokszor nem eredményes; (v) a digitális MLPA tipikusan 70-90 bázispáros feloldása jelentősen meghaladja a kariotipizálás (3-10 megabázis) és a rutin diagnosztikában használt iFISH tesztek (100 kilobázis - 1 megabázis) hasonló értékeit, ezzel exon szintű vizsgálatokat is lehetővé téve; (vi) a minták laboratóriumi preparálásához 20-40 nanogramm DNS elegendő; (vii) a microarray alapú módszerekhez (aCGH, SNP-array) képest a digitális MLPA-val jóval nagyobb számú, akár 192 minta is vizsgálható egyidejűleg; (viii) a módszer 36 órán belül informatív eredményt szolgáltat; (ix) specifikus szonda kompozíciójának köszönhetően digitális MLPA-val a kereskedelmi array és NGS módszerekhez képest fókuszáltabban és gazdaságosabban mutathatók ki teljes kromoszóma aberrációk, szubkromoszómális kópiaszám eltérések, valamint specifikus pontmutációk egyetlen reakció elvégzésével;

(x) célzott vizsgálat lévén az adatfeldolgozás és értékelés a teljes exom vagy genom szekvenáláshoz képest kevesebb számítógépes kapacitást igényel.

A betegséghez asszociáltan megjelenő genetikai aberrációk átlagos száma alapján a PCM a skála közepén helyezkedik el a különféle daganatos megbetegedések között, átlagosan több abnormalitást hordozva, mint a legtöbb hematológiai malignitás, de kevesebbet, mint a szolid tumorok többsége [13]. Ebből következően a PCM minták vizsgálatához kézenfekvőnek tűnik a digitális MLPA alkalmazása, mely nagyszámú genomikus lókuszt egyidejű, célzott vizsgálatát teszi lehetővé, rövid időn belül információt nyújtva az egyes genetikai aberrációk adott betegben való együttes jelenlétéről is.

Számos előnye mellett a digitális MLPA alkalmazását korlátozza, hogy a módszer (i) kópiaszám változással nem járó (kiegyensúlyozott) aberrációk vizsgálatára nem alkalmas; (ii) relatív kópiaszámot határoz meg, így abszolút kópiaszám felderítésére önmagában nem használható; (iii) egyedi sejt szintű információt nem nyújt; (iv) szubklonális biállélikus deléciókat nem képes azonosítani olyan esetekben, amikor a kópiaszám profil klonális monoallélikus delécióhoz hasonló mintázatot mutat; (v) más diagnosztikus módszerekhez hasonlóan érzékeny az alacsony plazmasejt arányra, mely előzetes plazmasejt dúsítással enyhíthető és (vi) óvatos interpretációt igényel, mivel a relatív kópiaszám egy-egy szonda által mutatott változása nem csak DNS kópiaszám változás eredménye lehet, hasonló jelenséget idézhet elő egy ligációs pont közelében megjelenő pontmutáció is. Ez utóbbi jelenség több, egymás közelében elhelyezkedő szonda együttes alkalmazásával kiküszöbölhető, adott esetben pedig az észlelt aberráció független módszerrel való megerősítése is indokolt lehet.

Összességében elmondható, hogy munkánk során sikerült beállítanunk olyan molekuláris módszereket (MLPA és digitális MLPA), melyek alkalmazásával a hazai PCM-ben szenvedő betegek diagnosztikája jelentősen és gazdaságosan javítható. Egyedi sejt szintű vizsgálatainkkal továbbá sikerült nemzetközi érdeklődést is kiváltó új adatokat nyernünk a PCM patogenezisét kísérő citogenetikai aberrációk megjelenési sorrendjére, illetve azoknak a betegség iniciációjában betöltött lehetséges szerepére vonatkozóan.

6. Az új eredmények összefoglalása

1. A nemzetközi irodalomban elsőként közöltük az MLPA módszer alkalmazását PCM-ben megjelenő kiegyensúlyozatlan genetikai aberrációk kimutatásához. Feltérképeztük a technika által nyújtott előnyöket és hátrányokat, az eredményeket pedig validáltuk a jelenleg legszélesebb körben használt, standard módszernek tekintett iFISH analízissel.

2. Nemzetközi szinten elsőként alkalmaztuk a digitális MLPA módszert PCM-ben mutatkozó kiegyensúlyozatlan genetikai aberrációk átfogó kimutatásához. Megállapítottuk, hogy a módszer a szubkromoszómális eltérések mellett teljes kromoszóma többletek és hiányok megbízható detektálását is lehetővé teszi, ezáltal segítve a betegség egyik fő citogenetikai alcsoportjába tartozó, hiperdiploid kariotípussal rendelkező betegek azonosítását is.

3. Nemzetközi szinten elsőként alkalmaztuk a digitális MLPA módszert pontmutáció kimutatásához. Az általunk vizsgált *BRAF*^{V600E} mutáció a PCM-ben szenvedő betegek 4-10%-ában jelentkezik, detektálása célzott terápia megkezdését teszi lehetővé. A digitális MLPA-val kimutatott mutációkat piroszekvenálással és digitális droplet PCR-rel validáltuk.

4. Elsőként összegeztük és értékeltük a Pécsi Klinikai Központ és a Tolna Megyei Balassa János Kórház plazmasejtes mielómában szenvedő betegein több mint egy évtized alatt elvégzett molekuláris citogenetikai vizsgálatok eredményeit. Ennek alapján megállapítottuk, hogy az MLPA és az iFISH együttes alkalmazása jelentősen segíthetné a jövőben a plazmasejtes mielómában szenvedő hazai betegek átfogóbb genetikai jellemzését.

5. Kombinált iFISH analízist végezve, nemzetközi szinten elsőként vizsgáltunk PCM-ben strukturális citogenetikai aberrációkat is magában foglaló klonális evolúciós folyamatokat egyedi sejt szinten. Eredményeink megerősítették, hogy az *IGH* gént érintő transzlokációk a betegség patogenezise során korán jelennek meg, adataink alapján azonban a transzlokációk betegségét iniciáló funkciója megkérdőjelezhető, sőt kizárható az érintett betegek legalább egyötödében.

7. Irodalomjegyzék

1. Solly S. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans.* 1844; 27:435-98.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016; 127:2375-90.
3. Corwan AJ, Allen C, Barac A, et al. Global burden of multiple myeloma: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *JAMA Oncol.* 2018; 4: 1221-7.
4. Varga G, Mikala G, Váróczy L, et al. Management of multiple myeloma in Hungary in 2016. (A myeloma multiplex megközelítése Magyarországon 2016-ban.) *Orv Hetil.* 2016; 157: 123-37.
5. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009; 113: 5412-7.
6. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2018; 93(8): 981-1114.
7. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011; 365: 474–5.
8. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* 2013; 27: 941–6.
9. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 1606–10.
10. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014; 15: e538-48.
11. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1996; 335: 91-7.
12. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Onco.* 2017; 28: 52–61.

13. Lonial S, Boise LH, Kaufman J. How I treat high-risk myeloma. *Blood*. 2015; 126: 1536-43.
14. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975; 36: 842-54.
15. Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3412-20.
16. Fonseca R, Bergsagel PL, Avet-Loiseau H, et al. International myeloma Working Group: International classification of multiple myeloma: Spotlight review. *Leukemia*. 2009; 23: 2210-21.
17. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016; 127: 2955-62.
18. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, et al. Development and validation of a cytogenetic prognostic index predicting survival in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2019; 37: 1657-65.
19. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from the International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 2863-9.
20. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 335-48.
21. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (mSMART). Consensus Guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88: 360-76.
22. Barwick BG, Boise LH et al. Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma. *Front Immunol*. 2019; 10: 1121.
23. Boyle EM, Davies FE, Leleu X, et al. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*. 2014; 99: 605-12.
24. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011; 471: 467-72.
25. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell*. 2007; 11: 349-60.

26. Bagratuni T, Wu P, Gonzalez CD, et al. XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. *Blood*. 2010; 116: 250–3.
27. Manier S, Sacco A, Leleu X, et al. Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 157496.
28. Manier S, Salem KZ, Park J, et al. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14: 100–13.
29. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, et al. High resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell*. 2006; 9: 313-25.
30. Walker BA, Leone PE, Jenner MW, et al. Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2006; 108: 1733-43.
31. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013; 500:415-21.
32. Walker BA, Morgan GJ, et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014; 28: 384-90.
33. Bolli N, Avet-Loiseau H, Munshi NC et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014; 16:2997.
34. Bergsagel PL, Chesi MV. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol*. 2013; 31(suppl.1): 38-41.
35. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*. 2015; 5: e365.
36. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in mutiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4585-90.
37. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2011; 117: 553–62.
38. Kristinsson SY, Björkholm M, Goldin LR, et al. Patterns of hematologic malignancies and solid tumors among 37,838 first-degree relatives of 13,896 patients. *Int J Cancer*. 2009; 125: 2147-50.
39. Altieri A, Chen B, Bermejo JL, et al. Familial risks and temporal incidence trends of MM. *Eur J Cancer*. 2006; 42: 1661-70.

40. Talley PJ, Chantry A, Buckle CH. Genetics in myeloma: genetic technologies and their application to screening approaches in myeloma. *Br Med Bull*, 2015; 113: 15-3.
41. Weinhold N, Johnson DC, Rawstron AC, et al. Inherited genetic susceptibility to monoclonal gammopathy of unknown significance. *Blood*. 2014; 123: 2513-7.
42. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia*. 1998; 12: 960-9.
43. Gutiérrez NC, García JL, Hernández JM, et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood*. 2004; 104: 2661-6.
44. Onodera N, McCabe NR, Rubin CM. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992; 80: 203-8.
45. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, et al. Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res*. 2007; 67: 2982-9.
46. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 98: 2229-38.
47. Chretien ML, Corre J, Avet-Loiseau H, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 2015; 126: 2713-9.
48. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, et al. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IGH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996; 88: 674-81.
49. Walker BA, Wardell CP, Murisen A, et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2015. 6: 6997.
50. Santra M, Zhan F, Tian E, et al. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood*. 2003; 101: 2374-6.
51. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. In multiple myeloma t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*. 2003; 101: 1520-9.

52. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, et al. Bortezomib plus dexamethson induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. 2010; 28: 4630-4.
53. Perrot A, Corre J, Avet-Loiseau H. Risk stratification and targets in multiple myeloma: From genomics to the bedside. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018; 23:675-80.
54. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood*. 2015; 125: 1870-6.
55. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, et al. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 2001; 98: 3082-6.
56. Affer M, Chesi M, Chen WD, et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28: 1725-35.
57. Walker BA, Wardell CP, Brioli A, et al. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor super-enhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2014; 4: e191.
58. Avet-Loiseau H, Daviet A, Sauner S, et al. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol*. 2000; 111: 1116-7.
59. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001; 15: 981-6.
60. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone de Myelome. *Blood*. 2007; 109: 3489-95.
61. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Van Wier SA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. 2008; 22: 1044-52.
62. Thanendrarajan S, Tian E, Qu P, et al. The level of deletion 17p and bi-allelic inactivation of *TP53* has a significant impact on clinical outcome in multiple myeloma. *Haematologica*. 2017; 102: e364-7.
63. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, et al. A compendium of myeloma associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010; 116: e56-65.

64. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007; 109: 2276-84.
65. Sawyer JR. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genet*. 2011; 204: 3-12.
66. Shah GL, Landau H, Londono D, et al. Gain of chromosome 1q portends worse prognosis in multiple myeloma despite novel agent-based induction regimens and autologous transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2017; 58: 1823-31.
67. Hebraud B, Leleu X, Lauwers-Cances V, et al. Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*. 2014; 28: 675-9.
68. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 3911-20.
69. Andrulis M, Lehnert N, Capper D, et al. Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov*. 2013; 3: 862-9.
70. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 2017; 8: 268.
71. Bahlis NJ. Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma. *Blood*. 2012; 120: 927-8.
72. Landau DA, Carter SL, Getz G, et al. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 2014; 28: 34-43.
73. Nemecek P, Zemanova Z, Kuglik P, et al. Complex karyotype and translocation t(4;14) define patients with high-risk newly diagnosed multiple myeloma: results of CMG2002 trial. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53: 920-7.
74. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2012; 97: 1272-7.
75. Szalat R, Avet-Loiseau H, Munshi NC. Gene Expression profiles in myeloma: Ready for the real world? *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 5434-42.
76. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: e57.

77. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagn Mol Pathol*. 2012; 21: 189-206.
78. Alpar D, de Jong D, Savola S, et al. MLPA is a powerful tool for detecting lymphoblastic transformation in chronic myeloid leukemia and revealing the clonal origin of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet*. 2012; 205: 465-9.
79. Buijs A, Krijtenburg PJ, Meijer E. Detection of risk-identifying chromosomal abnormalities and genomic profiling by multiplex ligation-dependent probe amplification in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2006; 91: 1434-5.
80. Coll-Mulet L, Santidrián AF, Cosiáls AM, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2008; 142: 793-801.
81. Donahue AC, Abdool AK, Gaur R, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2011; 35: 1477-83.
82. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010; 49: 1104-13.
83. Kiss R, Kosztolányi S, Gángó A, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification in oncohematological diagnostics and research. (Multiplex ligatíofüggő szondaamplifikáció az onkohematológiai kutatásban és diagnosztikában.) *Orv Hetil*. 2018; 159: 583-92. (Hungarian)
84. Benard-Slagter A, Zondervan I, de Groot K, et al. Digital Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Detection of Key Copy Number Alterations in T- and B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *J Mol Diagn*. 2017; 19: 659-72.
85. Alpár D, Pajor G, Varga P, et al. Sequential and hierarchical chromosomal changes and chromosome instability are distinct features of high hyperdiploid pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2014; 61: 2208-14.
86. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC*, Lyon, 2008; pp. 202-8.

87. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, et al. Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*. 2002; 99: 2185-91.
88. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*. 1995; 86: 4250-6.
89. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 2000; 95: 1925-30.
90. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. 2012; 26: 349-55.
91. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, et al. Intergroupe Francophone du Myélome. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood*. 2011; 117: 2009-11.
92. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 6333-8.
93. Robiou du Pont S, Cleynen A, Fontan C, et al. Genomics of Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2017; 35: 963-7.
94. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2002; 100: 1417-24.
95. Kaufmann H, Ackermann J, Baldia C, et al. Both IGH translocations and chromosome 13q deletions are early events in monoclonal gammopathy of undetermined significance and do not evolve during transition to multiple myeloma. *Leukemia*. 2004; 18: 1879-82.
96. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH, et al. UK Myeloma Forum. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*. 2009; 94: 1708-13.
97. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a

- multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myélome. *Cancer Res.* 1999; 59: 4546-50.
98. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, et al. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007; 20: 571-96.
 99. Schmidt-Hieber M, Gutiérrez ML, Pérez-Andrés M, et al. Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica.* 2013; 98: 279-87.
 100. Pawlyn C, Melchor L, Murison A, et al. Coexistent hyperdiploidy does not abrogate poor prognosis in myeloma with adverse cytogenetics and may precede IGH translocations. *Blood.* 2015; 125: 831-40.
 101. Avet-Loiseau H. Ultra high-risk myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 2010: 489-93.
 102. Jacobus SJ, Kumar S, Uno H, et al. Impact of high-risk classification by FISH: an eastern cooperative oncology group (ECOG) study E4A03. *Br J Haematol.* 2011; 155: 340-8.
 103. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood.* 2012; 119: 2100-5.
 104. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014; 28: 269-77.
 105. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood.* 2012; 120: 1067-76.
 106. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood.* 2011; 118: 4771-9.
 107. Boyle EM, Proszek PZ, Kaiser MF, et al. A molecular diagnostic approach able to detect the recurrent genetic prognostic factors typical of presenting myeloma. *Genes Chromosome Cancer.* 2015; 54: 91-8.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném elsőként kifejezni témavezetőmnek, Alpár Donátnak, aki rengeteg segítséget nyújtott a kutatási terv megtervezésétől kezdve a vizsgálatok elvégzésén és az eredmények kiértékelésén át egészen a tudományos közlemények összeállításáig. Őszintén köszönöm, hogy a kellő pillanatokban a megfelelő mondatokkal és gesztusokkal segített átlendülni az idáig vezető hosszú út akadályain és nehézségein. Köszönöm továbbá Dr. Pajor László Professzor Úrnak, hogy engedélyezte számomra PhD munkámnak a Molekuláris patomorfológia doktori program keretében való elkészítését.

Köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem Pathologiai Intézetének dolgozóit, különös tekintettel Dr. Kajtár Bélára, Dr. Kereskai Lászlóra, Dr. Jáksó Pálra, Dr. Nagy Zsófiára és Lacza Ágnesre, akik önzetlen segítséget nyújtottak a csontvelői minták patológiai feldolgozásában, immunfenotipizálásában és a *BRAF^{V600E}* mutáció piro szekvenálással való validálásában.

Szeretnék köszönetet mondani a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében Dr. Bödör Csaba tudományos főmunkatársnak és teljes munkacsoportjának - kiemelve Dr. Kiss Richárdot, Dr. Király Péter Attilát, Dr. Gángó Ambrust és Kotmayer Lilit - akik segítséget nyújtottak az MLPA, digitális MLPA és digitális droplet PCR vizsgálatokban, valamint megengedték, hogy a laboratóriumban nyomon követhessem a fenti munkafolyamatokat.

Köszönöm Dr. Szuhai Károlynak és a Leiden University Medical Center-ben dolgozó munkacsoportjának, továbbá Dr. Suvi Savolának és az MRC Holland cégnek, hogy segítették az MLPA módszer onkohematológiai betegségekben való alkalmazásának hazai meghonosítását, és iránymutatást adtak az MLPA és digitális MLPA adatok kiértékelése során.

Köszönöm a PTE Klinikai Központ I. sz. Belgyógyászati Klinika Hematológiai Tanszéke dolgozóinak (Dr. Alizadeh Hussain, Dr. Nagy Ágnes, Dr. Szomor Árpád, Dr. Tóth Orsolya és Dr. Csalódi Renáta kollégáimnak) a csontvelői minták

összegyűjtésében nyújtott segítségét, valamint a kutatómunka miatti távollétemben a betegellátás feladatainak átvállalására fordított idejüket és energiájukat.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Családomnak, Juditnak, Lizának, Rózának és Borinak, valamint szüleimnek és anyósomnak, hogy megteremtették számomra a munka elvégzéséhez elengedhetetlenül szükséges, támogató otthoni környezetet.

Köszönöm!

A disszertáció alapját képező tanulmányok elvégzését a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal – NKFIH, K_16-119950, NVKP_16-1-2016- 0004 és KH_17-126718 számú pályázata, a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programjának LP95021. számú pályázata és Bolyai János Kutatási Ösztöndíj programja, a Széchenyi 2020 program EFOP 3.6.1-16.2016.00004 projektje, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-4-III-SE és ÚNKP-18-4-SE-62 kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programja támogatta. Az MLPA és digitális MLPA vizsgálatokhoz a szondakeveréket az MRC-Holland bocsátotta a szerzők rendelkezésére.

9. A disszertáció alapját képező publikációk

Eredeti közlemények

Nagy Z, Kajtár B, Jáksó P, Dávid M, **Kosztolányi S**, Hermes J, Kereskai L, Pajor L, Alpár D. Evolutionary sequence of cytogenetic aberrations during the oncogenesis of plasma cell disorders. Direct evidence at single cell level. *Leuk Res.* 2011;35(8):1114-6. IF.: 2,923

Alpár D, de Jong D, Holczer-Nagy Z, Kajtár B, Savola S, Jáksó P, Dávid M, **Kosztolányi S**, Kereskai L, Pajor L, Szuhai K. Multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization are complementary techniques to detect cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013;52(9):785-93. IF.: 3,836

Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, de Groot K, Steenkamer M, Jáksó P, Matolcsy A, Kajtár B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. High-throughput copy number profiling by digital multiplex ligation-dependent probe amplification in multiple myeloma. *J Mol Diagn.* 2018;20(6):777-88. IF.: 4,426

Kosztolányi S, Horváth B, Hosnyánszki D, Kereskai L, Sziládi E, Jáksó P, Alizadeh H, Szuhai K, Alpár D*, Kajtár B*. Molekuláris citogenetikai vizsgálatok Baranya és Tolna megye plazmasejtes mielómában szenvedő betegein. *Orv Hetil.* 2019;160(24):944-51. IF.: 0,564

Összefoglaló közlemény

Kiss R, **Kosztolányi S**, Gángó A, Szuhai K, Bödör C, Alpár D. Multiplex ligáció függő szonda amplifikáció az onkohematológiai kutatásban és diagnosztikában. *Orv Hetil.* 2018;159(15):583-92. IF.: 0,322

Idézhető absztraktok

Alpár D, Nagy Z, Kajtár B, Jáksó P, Dávid M, **Kosztolányi S**, Kereskai L, Pajor L. Investigation of cytogenetic aberrations in plasma cell myeloma using combined I-FISH analysis and motorized microscopy. *Chromosome Res.* 2011;19:S130.

Alpár D, de Jong D, Kajtár B, Savola S, Jáksó P, Dávid M, **Kosztolányi S**, Kereskai L, Pajor L, Szuhai K. Combined application of multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization to detect cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. *Haematologica* 2013;98:393.

Kosztolányi S, Kiss R, Atanesyan L, Gángó A, De Groot K, Steenkamer M, Jáksó P, Matolcsy A, Kajtár B, Pajor L, Szuhai K, Savola S, Bödör C, Alpár D. Rapid and comprehensive screening for disease relevant copy number alterations in multiple myeloma using digital multiplex ligation dependent probe amplification. *Mol Cytogenet.* 2019;12(Suppl 1):43.

10. Egyéb publikációk

Eredeti közlemények

Kosztolányi S, Gasztonyi B, Vincze A, Battyány I, Hegedűs G, Czakó M, Pár A, Mózsik G. Az autoszomális recesszív polycystás vesebetegségért felelős gén lokuszának vizsgálata egy congenitalis májfibrosisban és polycystás májbetegségben szenvedő 21 éves nőbetegnél. *Orv Hetil.* 2002;143(46):2593-6.

Nádasi E, Gyűrűs P, Czakó M, Bene J, **Kosztolányi S**, Fazekas S, Dömösi P, Melegh B. Comparison of mtDNA haplogroups in Hungarians with four other European populations: a small incidence of descents with Asian origin. *Acta Biol Hung.* 2007;58(2):245-56.

Szomor Á, Csalódi R, **Kosztolányi S**, Nagy Á, Pammer J, Tóth O, Losonczy H, Alizadeh H, Miltényi Z, Reményi P, Piukovics K. Autológ haemopoeticus őssejt-transzplantáció szerepe T-sejtes lymphomában. Magyar Adatok. *Orv Hetil.* 2017;158(41):1615-9.

Idézhető absztraktok

Kosztolányi S, Gasztonyi B, Vincze A, Battyány I, Dávid M, Hegedűs G, Pár A, Mózsik G. Congenitalis májfibrózis, polycystás máj és polycystás vese együttes előfordulása egy 21 éves betegünkben. *Magyar Belorvosi Archivum* 2001;54(S1): 80.

Dávid M, **Kosztolányi S**, Szomor Á, Alpár D, Kajtár B, Nagy Á, Kovács G, Csalódi R, Hermes J, Tábori J, Szalontay C, Losonczy H, Pajor L. Genetic prognostic factors and the outcome of autologous stem cell transplantation in plasma cell disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(S1):S149.